

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037297**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К  
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (15) Информация об исправлении  
Версия исправления: 2 (W2 B1)  
исправления в описании  
Предшествующие публикации исправленных  
документов:  
B8, 30.04.2021, Бюллетень №4'2021 (W1)
- (48) Дата публикации исправления  
2021.11.24, Бюллетень №11'2021
- (45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.03.05
- (21) Номер заявки  
202000370
- (22) Дата подачи заявки  
2020.11.09
- (51) Int. Cl. *A61K 39/215* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)  
*C12N 7/00* (2006.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ  
ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ТЯЖЕЛОГО  
ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА SARS-COV-2 (ВАРИАНТЫ)**

- (31) 2020127980  
(32) 2020.08.22  
(33) RU  
(43) 2021.03.02  
(86) PCT/RU2020/000591  
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И  
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ  
ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.  
ГАМАЛЕИ" МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)
- Викторович, Гроусова Дарья  
Михайловна, Джаруллаева Алина  
Шахмировна, Тухватулин Амир  
Ильдарович, Тухватулина Наталья  
Михайловна, Щербинин Дмитрий  
Николаевич, Есмагамбетов Ильяс  
Булатович, Токарская Елизавета  
Александровна, Ботиков Андрей  
Геннадьевич, Ерохова Алина  
Сергеевна, Ижаева Фатима  
Магометовна, Семихин Александр  
Сергеевич, Борисевич Сергей  
Владимирович, Народицкий Борис  
Савельевич, Логунов Денис Юрьевич,  
Гинцбург Александр Леонидович (RU)
- (74) Представитель:  
Месяшная Н.В. (RU)
- (72) Изобретатель:  
Зубкова Ольга Вадимовна,  
Ожаровская Татьяна Андреевна,  
Должикова Инна Вадимовна,  
Попова Ольга, Щебляков Дмитрий
- (56) KR-B1-102050616  
US-B1-6251677  
WO-A2-2000012740  
US-A1-20190134178  
WO-A2-2010037027

- (57) Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

**B9****037297****037297****B9**

виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3. Также создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3. Создано также фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3. При этом каждое фармацевтическое средство находится в жидкой или лиофилизированной форме, а компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках. Каждое фармацевтическое средство применяют для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, при этом используют компонент 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели. Изобретение обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2, при этом обеспечивается повышенный уровень иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

В9

037297

037297

В9

### Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Предложенное средство может применяться для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

### Уровень техники

В конце 2019 г. в г. Ухань провинции Хубэй (КНР) была зафиксирована вспышка атипичной пневмонии неизвестной этиологии. Проведенные научные исследования позволили установить, что она была вызвана одноцепочечным РНК-содержащим вирусом, относящимся к семейству Coronaviridae, к линии Beta-CoV В. 11 февраля 2020 г. Всемирная Организация Здравоохранения присвоила новому вирусу официальное название SARS-CoV-2, а болезнь, возбудителем которой он является, получила название COVID-19 ("Coronavirus disease 2019").

В течение нескольких месяцев SARS-CoV-2 распространился по всему миру, став причиной пандемии, затронувшей более 200 стран. К 1 августа 2020 г. количество заболевших превысило 17,5 млн человек, а количество погибших - 683 тыс. человек.

Коронавирус передается от человека к человеку воздушно-капельным, воздушно-пылевым и контактным путями. Инкубационный период составляет в среднем 5-6 дней, после чего развиваются первые симптомы заболевания. Для COVID-19 характерными симптомами являются повышение температуры тела, сухой кашель, одышка, утомляемость. Реже встречаются - боль в горле, в суставах, насморк, головная боль.

Диагностика COVID-19 осложняется тем, что симптомы данного заболевания характерны для многих вирусных инфекций. Окончательный диагноз ставится на основании результатов лабораторных исследований, для которых необходимо специализированное оборудование, высококвалифицированный персонал и дорогостоящие реактивы.

COVID-19 может протекать как в легкой, так и тяжелой форме. При этом тяжелая форма заболевания чаще развивается у пациентов старше 60 лет, имеющих хронические заболевания. Наиболее грозными осложнениями данного заболевания являются пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, острая дыхательная недостаточность, острая сердечная недостаточность, острая почечная недостаточность, септический шок, кардиомиопатии и др. При этом средств этиотропного лечения в настоящее время не разработано.

Быстрое распространение SARS-CoV-2 и высокий процент смертности создали острую необходимость в разработке эффективных средств профилактики заболеваний, вызываемых данным вирусом. Все исследования в данной области опираются на многолетний опыт по разработке препаратов для профилактики заболеваний, вызываемых другими представителями семейства коронавирусов.

Известно решение (патент US 7452542 B2), в котором для профилактики заболеваний, вызванных коронавирусом, используют живую аттенуированную вакцину. Данная вакцина содержит живой аттенуированный коронавирус, который характеризуется как содержащий геном, кодирующий (i) EхoN, содержащий замену на тирозин<sup>6398</sup>MHV-A59 или аналогичной позиции, (ii) полипептид Orf2a, содержащий замену на лейцина<sup>106</sup>MHV-A59 или аналогичной позиции и фармацевтически приемлемый разбавитель. При этом данное изобретение распространяется на ряд коронавирусов животных и птиц и коронавирус человека OC34.

Известно решение (WO 2006136448 A2), в котором для получения вакцины против SARS-CoV используют нуклеиновую кислоту, кодирующую аттенуированный вирус SARS-CoV.

При этом максимальный титр вируса в клеточной культуре по крайней мере в 2 раза ниже, чем максимальный титр вируса SARS-CoV дикого типа в той же культуре клеток.

Известно решение (RU 2332457 C2B), в котором для профилактики коронавирусной инфекции, возбудителем которой является SARS-CoV, используют живую бактериальную вакцину, в которой на поверхности бактерии представлены антигены SARS-CoV, заякоренные с помощью синтетазы поли-гамма-глутаминовой кислоты (pgsBCA).

Известно решение (WO 2016116398 A1), где для получения вакцины против коронавируса MERS-CoV используют нуклеокапсидный белок N MERS-CoV и/или его иммуногенный фрагмент или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую N-нуклеокапсидный белок MERS-CoV и/или его иммуногенный фрагмент. Также в изобретении раскрыто использование генетических векторов на основе вируса коровьей оспы, авиопоксвируса, аденовируса, альфа-вируса, рабдовируса и герпесвируса для получения вакцины против коронавируса MERS-CoV.

Известно решение (WO 2006071250 A2), где в качестве вакцины против SARS-CoV предложено использование векторных систем на основе поксвирусов и бакуловирусов, содержащих гены S белка SARS-CoV и его антигенных фрагментов.

Известно решение (CN 1276777 C), в котором предложена вакцина против тяжелого острого респираторного синдрома на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, содержащего последовательность S белка вируса SARS-CoV.

Филогенетические исследования позволили установить, что вирус SARS-CoV-2 более близок к коронавирусам, поражающим летучих мышей (bat-SL-CoVZC45, bat-SL-CoVZXC21), чем к коронавирусам,

циркулирующим в человеческой популяции. Так, например, S белок SARS-CoV-2 гомологичен S белку SARS-CoV не более чем на 75% (Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798):270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7). Таким образом, кандидатные вакцины против заболеваний, вызываемых SARS-CoV, не эффективны против COVID-19.

В настоящее время не зарегистрировано ни одного препарата для индукции специфического иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2. Известно, что несколько фармацевтических компаний ведут разработку кандидатных вакцин, часть из которых основана на технологии рекомбинантных аденовирусных векторов.

Фармацевтическая компания SanSino (Тяньцзинь, Китай) совместно с Пекинским институтом биотехнологии (Пекин, Китай) разработала кандидатную вакцину против COVID-19, которая включает вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа (с удаленными E1 и E3 областями), содержащий оптимизированный ген S белка коронавируса SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (GenBank YP\_009724390) с сигнальным пептидным геном активатора тканевого плазминогена. Вакцина представляет собой жидкую форму, содержащую  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц/0,5 мл. Данное решение было выбрано авторами заявляемого изобретения за прототип.

Существенным недостатком данного решения является то, что вакцина может быть не эффективна у некоторых групп населения за счет наличия предсуществующего иммунитета к аденовирусу человека 5 серотипа. Так, например, согласно опубликованным данным однократного введения данной кандидатной вакцины было недостаточно, чтобы вызвать высокий уровень гуморальных иммунных реакции у людей в возрасте 55 лет или старше (Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial [published online ahead of print, 2020 Jul 20]. *Lancet*. 2020; S0140-6736(20)31605-6. doi:10.1016/S0140-6736(20)31605-6). Тогда как именно люди пенсионного возраста находятся в зоне риска тяжелого течения COVID-19.

Таким образом, в области техники существует потребность в разработке фармацевтического средства, которое является безопасным и способно индуцировать иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2 у широких слоев населения.

### **Осуществление изобретения**

Технической задачей заявленной группы изобретений является создание средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

Технический результат заключается в создании безопасного и эффективного фармацевтического средства, которое обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у различных групп населения за счет использования двух различных аденовирусных векторов. Кроме того, технический результат заключается в создании фармацевтического средства, обеспечивающего повышенные уровни иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

Указанный технический результат достигается тем, что создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 (вариант 1).

Также создано фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 (вариант 2).

Создано также фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 (вариант 3).

При этом каждое фармацевтическое средство находится в жидкой или лиофилизированной форме. Причем буферный раствор фармацевтического средства для жидкой формы содержит, мас. %:

трис	от 0,1831 до 0,3432
хлорид натрия	от 0,3313 до 0,6212
сахароза	от 3,7821 до 7,0915
магния хлорида гексагидрат	от 0,0154 до 0,0289
ЭДТА	от 0,0029 до 0,0054
полисорбат -80	от 0,0378 до 0,0709
этанол 95%	от 0,0004 до 0,0007
вода	остальное.

А буферный раствор фармацевтического средства для лиофилизированной формы содержит, мас. %:

трис	от 0,0180 до 0,0338
хлорид натрия	от 0,1044 до 0,1957
сахароза	от 5,4688 до 10,2539
магния хлорида гексагидрат	от 0,0015 до 0,0028
ЭДТА	от 0,0003 до 0,0005
полисорбат -80	от 0,0037 до 0,0070
вода	остальное.

Компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках.

Каждое фармацевтическое средство применяют для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, при этом используют компонент 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена схема экспрессионной кассеты, где

- 1 - промотор,
- 2 - целевой ген,
- 3 - сигнал полиаденилирования.

На фиг. 2 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD4+ лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации испытуемых животных.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - сформированные группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);

- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

● - Данные по одному животному.

■ - Среднее геометрическое значение, рассчитанное для каждой группы.

На фиг. 3 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, рестимулированных гликопротеином S SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации мышей.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - сформированные группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

● - Обозначены данные по каждому животному.

■ - Среднее геометрическое значение, рассчитанное для каждой группы.

На фиг. 4 представлена выживаемость сирийских хомячков, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством, и контрольных групп на модели летальной инфекции вируса SARS-CoV-2.

Ось ординат - выживаемость животных, %.

Ось абсцисс - дни после заражения вирусом SARS-CoV-2.

● - Обозначена выживаемость сирийских хомячков, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством, сформированные группы:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2),

которая во всех группах составила 100%.

◆ - Отрицательный контроль, группа:

- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2).

■ - Отрицательный контроль, группа:

- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2).

× - Отрицательный контроль, группа:

- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2).

▲ - Отрицательный контроль, группа:

- 32) фосфатно-солевой буфер.

На фиг. 5 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у приматов, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1.

Ось ординат - реципрокный титр IgG к RBD вируса SARS-CoV-2.

Ось абсцисс - дни.

● - Иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (Ad26-CMV-S-SARS-CoV-2; Ad5-CMV-S-SARS-CoV-2).

○ - Плацебо.

На фиг. 6 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD4+ лимфоцитов, рестимулированных RBD фрагментом S антигена SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации приматов.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

Черным цветом обозначена группа животных, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (Ad26-CMV-S-SARS-CoV-2; Ad5-CMV-S-SARS-CoV-2).

Серым цветом обозначена группа контрольных (не вакцинированных) животных.

Среднее арифметическое значение представлено в виде пунктирной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями вакцинированных и контрольных (невакцинированных) животных обозначена скобкой и символом \* ( $p < 0,05$  по критерию Манна-Уитни).

На фиг. 7 представлены результаты оценки эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих CD8+ лимфоцитов, рестимулированных RBD фрагментом S антигена SARS-CoV-2, на 8 день после иммунизации приматов.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

Черным цветом обозначена группа животных, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (Ad26-CMV-S-SARS-CoV-2; Ad5-CMV-S-SARS-CoV-2).

Серым цветом обозначена группа контрольных (невакцинированных) животных.

Среднее арифметическое значение представлено в виде пунктирной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями вакцинированных и контрольных (невакцинированных) животных обозначена скобкой и символом \* ( $p < 0,05$  по критерию Манна-Уитни).

На фиг. 8 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев жидкой формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD8+ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 9 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев жидкой формой разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD4+ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 10 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD8+ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 11 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD4+ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дней обозначена скобкой и символами \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 12 представлен прирост концентрации ИФН $\gamma$  (в размах) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев, иммунизированных жидкой формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1, после рестимуляции их S антигеном SARS-CoV-2 до иммунизации (0 день) и через 14 и 28 дни исследования.

Ось ординат - увеличение концентрации гамма-интерферона, разы.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически



достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,001$  по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 13 представлен прирост концентрации ИФН $\gamma$  (в размах) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев, иммунизированных лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1, после рестимуляции их S антигеном SARS-CoV-2 до иммунизации (0 день) и через 14 и 28 дни исследования.

Ось ординат - увеличение концентрации гамма-интерферона, разы.

Ось абсцисс - дни.

● - Обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день,

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день,

▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Точками обозначены значения по каждому добровольцу, участвующему в исследовании. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 0, 14 и 28 дня обозначена скобкой и символами \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,001$  по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 14 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у добровольцев, иммунизированных жидкой формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1,

Ось ординат - титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2.

Ось абсцисс - дни.

▲ - Данные по каждому добровольцу.

На фиг. 15 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у добровольцев, иммунизированных лиофилизированной формой разработанного фармацевтического средства по варианту 1,

Ось ординат - титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2.

Ось абсцисс - дни.

▲ - Данные по каждому добровольцу.

#### Реализация изобретения

Для создания безопасного и эффективного фармацевтического средства для индукции специфического иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 была выбрана векторная система на основе аденовирусов. Аденовирусные векторы обладают целым рядом преимуществ: они не способны размножаться в клетках человека, проникают как в делящиеся, так и неделящиеся клетки, способны индуцировать клеточный и гуморальный иммунные ответы, обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого антигена.

Вместе с тем клиническое применение данных векторов может быть затруднено из-за наличия у части населения преобладающего иммунного ответа к аденовирусам, который возникает в результате перенесенного заболевания. Результаты научных исследований показывают, что титры антител к аденовирусному вектору увеличиваются с возрастом, а также отличаются в различных популяциях. Так, например, высокие уровни серопревалентности к аденовирусу человека 5 серотипа наблюдаются у 40-45% населения в США и до 90% населения стран Африки к югу от Сахары (Nwanegbo E., Vardas E., Gao W., et al. Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004; 11(2):351-357; Dudareva M., Andrews L., Gilbert S.C., et al. Prevalence of serum neutralizing antibodies against chimpanzee adenovirus 63 and human adenovirus 5 in Kenyan children, in the context of vaccine vector efficacy. Vaccine. 2009; 27(27):3501-3504; Zhang S., Huang W., Zhou X., Zhao Q., Wang Q., Jia B. Seroprevalence of neutralizing antibodies to human adenoviruses type-5 and type-26 and chimpanzee adenovirus type-68 in healthy Chinese adults. J. Med. Virol., 2013; 85(6):1077-1084).

Нейтрализующие антитела к вектору значительно снижают специфический иммунный ответ против трансгена и могут отрицательно влиять на эффективность вакцинации.

Авторы изобретения на основании проведенных исследований определили серотипы аденовирусных векторов, которые настолько отличаются генетически, чтобы при последовательной иммунизации не влиять на генерацию антиген-специфических иммунных ответов против вакцинного антигена. Для дальнейшей работы было выбрано 3 вируса - аденовирус человека 26 серотипа, аденовирус человека 5 серотипа и аденовирус обезьян 25 серотипа. Затем были отобраны вирусные клоны, отличающиеся повышенными ростовыми свойствами, и на их основании, с помощью генно-инженерных подходов, были разработаны рекомбинантные аденовирусные векторы.

Таким образом, использование комбинации нескольких типов генетических векторов позволило создать арсенал фармацевтических средств, что обеспечит преодоление трудностей, связанных с наличием преобладающего иммунного ответа к некоторым аденовирусам у людей, в частности к аденовирусам человека 5-го серотипа.

При этом появляется возможность использования изобретения, по которому вариант фармацевтического средства выбирается после оценки иммунного статуса пациента к серотипам аденовирусных векторов, входящих в состав средства (аденовирусу человека 26 серотипа, аденовирусу человека 5 серотипа,

аденовирусу обезьян 25 серотипа).

С помощью методов генной инженерии в рекомбинантные аденовирусные векторы вставили экспрессионные кассеты, которые включали ген вакцинного антигена и элементы регуляции экспрессии (промотор, сигнал полиаденилирования). Схема экспрессионной кассеты представлена на фиг. 1.

Для достижения максимально эффективной индукции иммунных реакций авторы разработали различные варианты экспрессионных кассет.

В качестве антигена во всех кассетах был выбран S белок (Spikeprotein) вируса SARS-CoV-2, который был оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих. S белок является одним из структурных белков коронавируса. Он экспонирован на поверхности вирусной частицы и отвечает за связывание с рецептором ангиотензин-превращающего фермента II типа (Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). Результаты проведенных исследований показали, что к данному белку формируются вируснейтрализующие антитела, благодаря чему он является перспективным антигеном для создания фармацевтического средства.

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 1 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. CMV промотор - это промотор ранних генов цитомегаловируса, который обеспечивает конститутивную экспрессию во множестве типов клеток. Однако сила экспрессии гена-мишени, управляемая промотором CMV, варьируется в зависимости от типов клеток. Кроме того, было показано, что уровень экспрессии трансгена под контролем CMV-промотора уменьшается с увеличением времени культивирования клеток из-за подавления экспрессии генов, которое связано с метилированием ДНК [Wang W., Jia Y.L., Li Y.C., Jing C.Q., Guo X., Shang X.F., Zhao C.P., Wang T.Y. Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells// Scientific Reports. - 2017. - Vol. 8. - p. 10416].

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. CAG-промотор - синтетический промотор, который включает ранний энхансер промотора CMV, промотор β-актина курицы и химерный интрон (β-актина курицы и β-глобин кролика). Экспериментально показано, что транскрипционная активность промотора CAG выше, чем у промотора CMV [Yang C.Q., Li X.Y., Li Q., Fu S.L., Li H., Guo Z.K., Lin J.T., Zhao S.T. Evaluation of three different promoters driving gene expression in developing chicken embryo by using in vivo electroporation// Genet. Mol. Res. - 2014. - Vol. 13. - p. 1270-1277].

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. Промотор EF1 - промотор человеческого эукариотического фактора элонгации трансляции 1β (EF-1α). Промотор является конститутивно активным в широком диапазоне типов клеток [PMID: 28557288. The EF-1α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells]. Ген EF-1α кодирует фактор элонгации-1α, который является одним из наиболее распространенных белков в эукариотических клетках и экспрессируется почти во всех типах клеток млекопитающих. Данный промотор EF-1α часто активен в клетках, в которых вирусные промоторы не способны экспрессировать контролируемые гены, и в клетках, в которых вирусные промоторы постепенно заглушаются.

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 4 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

Таким образом, в результате проведенной работы было разработано 3 варианта фармацевтического средства.

1. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

2. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

3. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой сред-

ство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

При этом компоненты фармацевтического средства могут находиться в разных упаковках.

Также авторами изобретения были разработаны жидкая и лиофилизированная формы фармацевтического средства.

Кроме того, авторами изобретения были подобраны варианты буферного раствора, которые позволяют хранить разработанное фармацевтическое средство как в замороженном виде при температуре ниже  $-18^{\circ}\text{C}$ , так и в виде лиофилизата при температуре от 2 до  $8^{\circ}\text{C}$ .

Также был разработан способ применения фармацевтического средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, включающий использование компонента 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели.

Осуществление изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Получение экспрессионного вектора, содержащего геном рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа.

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pAd26-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса человека 26 серотипа (два плеча гомологии), и ген устойчивости к ампициллину. Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса человека 26-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую pDC белок. Второе плечо гомологии содержит последовательность нуклеотидов после ORF3 E4 области до конца генома. Синтез конструкции pAd26-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Выделенную из вирионов ДНК аденовируса человека 26-го серотипа смешивали с pAd26-Ends. В результате гомологичной рекомбинации между pAd26-Ends и вирусной ДНК была получена плазида pAd26-dlE1, несущая геном аденовируса человека 26-го серотипа с делетированной E1-областью.

Затем в полученной плазмиде pAd26-dlE1 с использованием стандартных методов клонирования была заменена последовательность, содержащая открытую рамку считывания 6 (ORF6-Ad26), на аналогичную последовательность из генома аденовируса человека 5-го серотипа для того, чтобы аденовирус человека 26-го серотипа был способен эффективно размножаться в культуре клеток HEK293. В результате была получена плазида pAd26-dlE1-ORF6-Ad5.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd26-dlE1-ORF6-Ad5 была удалена E3-область генома аденовируса (примерно 3321 п.о. между генами pVIII и U-exon) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате этого был получен рекомбинантный вектор pAd26-only-null на основе генома аденовируса человека 26-го серотипа с открытой рамкой считывания ORF6 аденовируса человека 5-го серотипа и с делецией E1 и E3-областей. В качестве материнской последовательности human adenovirus 26-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 5.

Кроме того, авторами было разработано несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 1 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

На основе плазмидной конструкции pAd26-Ends генно-инженерным методом были получены конструкции pArms-26-CMV-S-CoV2, pArms-26-CAG-S-CoV2, pArms-26-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно, а также несущие плечи гомологии генома аденовируса 26-го серотипа. После этого, конструкции pArms-26-CMV-S-CoV2, pArms-26-CAG-S-CoV2, pArms-26-EF1-S-CoV2 линеаризовали по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии, каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pAd26-only-null. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd26-only-CMV-S-CoV2, pAd26-only-CAG-S-CoV2, pAd26-only-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа с открытой рамкой считывания ORF6 аденовируса человека 5-го серотипа и с делецией E1 и E3-областей, с экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно.

На четвертом этапе плазмиды pAd26-only-CMV-S-CoV2, pAd26-only-CAG-S-CoV2, pAd26-only-EF1-S-CoV2 гидролизовали специфическими эндонуклеазами рестрикции для удаления векторной части. Полученными препаратами ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293.

Таким образом, был получен экспрессионный вектор, содержащий геном рекомбинантного штамма

human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Пример 2. Получение иммунобиологического средства в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

На данном этапе работы экспрессионные векторы, полученные в примере 1, очищали методом анионообменной и эксклюзионной хроматографии. Готовая суспензия содержала аденовирусные частицы в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства или в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Таким образом, были получены следующие иммунобиологические средства на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5:

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad26-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

2. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad26-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

3. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad26-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

4. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad26-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad26-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

6. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad26-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 1 в варианте 1 и в варианте 2 разработанного фармацевтического средства.

Пример 3. Получение экспрессионного вектора, содержащего геном рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа.

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pSim25-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса обезьян 25-го серотипа (два плеча гомологии). Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса обезьян 25-го серотипа (от левого инвертированного концевого повтора до E1-области) и последовательность от конца E1-области до pIVa2 белка. Второе плечо гомологии содержит последовательность конца генома аденовируса, включая правый инвертированный концевой повтор. Синтез конструкции pSim25-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Выделенную из вирионов ДНК аденовируса обезьян 25-го серотипа смешивали с pSim25-Ends. В результате гомологичной рекомбинации между pSim25-Ends и вирусной ДНК была получена плазида pSim25-dlE1, несущая геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делетированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pSim25-dlE1 была удалена E3 область генома аденовируса (3921 п.о. от начала гена 12,5К до гена 14,7К) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате была получена плазмидная конструкция pSim25-null, кодирующая полный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делецией E1 и E3-

областей. В качестве материнской последовательности simian adenovirus 25-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 6.

Кроме того, авторы разработали несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 4 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

Далее генно-инженерным методом на основе плазмидной конструкции pSim25-Ends были получены конструкции pArms-Sim25-CMV-S-CoV2, pArms-Sim25-CAG-S-CoV2, pArms-Sim25-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно, а также несущие плечи гомологии из генома аденовируса обезьян 25-го серотипа. После этого, конструкции pArms-Sim25-CMV-S-CoV2, pArms-Sim25-CAG-S-CoV2, pArms-Sim25-EF1-S-CoV2 линейаризовали по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии, каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pSim25-null. В результате гомологичной рекомбинации были получены рекомбинантные плазмидные векторы pSim25-CMV-S-CoV2, pSim25-CAG-S-CoV2, pSim25-EF1-S-CoV2, содержащие полный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делецией E1 и E3-областей и экспрессионную кассету SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно.

На третьем этапе плазмиды pSim25-CMV-S-CoV2, pSim25-CAG-S-CoV2, pSim25-EF1-S-CoV2 гидролизировали специфической эндонуклеазой рестрикции для удаления векторной части. Полученными препаратами ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293. Полученный материал был использован для накопления препаративных количеств рекомбинантных аденовирусов.

В результате были получены рекомбинантные аденовирусы человека 25 серотипа, содержащие ген S белка вируса SARS-CoV-2: simAd25-CMV-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 4), simAd25-CAG-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 2), simAd25-EF1-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 3).

Таким образом, был получен экспрессионный вектор, содержащий геном рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Пример 4. Получение иммунобиологического средства в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

На данном этапе работы экспрессионные векторы, полученные в примере 3, очищали методом ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Готовая суспензия содержала аденовирусные частицы в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства или в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Таким образом, были получены следующие иммунобиологические средства на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области.

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (simAd25-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

2. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (simAd25-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

3. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (simAd25-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

4. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (simAd25-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (simAd25-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

6. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 про-

мотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (simAd25-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 2 в варианте 1 разработанного фармацевтического средства и компонентом 1 в варианте 3 разработанного фармацевтического средства.

Пример 5. Получение экспрессионного вектора, содержащего геном рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа.

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pAd5-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса человека 5-го серотипа (два плеча гомологии). Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса человека 5-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую pIX белок. Второе плечо гомологии содержит последовательность нуклеотидов после ORF3 E4-области до конца генома. Синтез конструкции pAd5-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Выделенную из вирионов ДНК аденовируса человека 5-го серотипа смешивали с pAd5-Ends. В результате гомологичной рекомбинации между pAd5-Ends и вирусной ДНК была получена плазида pAd5-dIE1, несущая геном аденовируса человека 5-го серотипа с делетированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd5-dIE1 была удалена E3 область генома аденовируса (2685 п.о. от конца гена 12,5K до начала последовательности U-exon) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате этого был получен рекомбинантный плазмидный вектор pAd5-too-null на основе генома аденовируса человека 5-го серотипа с делецией E1 и E3 областей генома. В качестве материнской последовательности human adenovirus 5-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 7.

Кроме того, авторы разработали несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 1 состоит из CMV промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 2 состоит из CAG промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования;

экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования.

Далее генно-инженерным методом на основе плазмидной конструкции pAd5-Ends были получены конструкции pArms-Ad5-CMV-S-CoV2, pArms-Ad5-CAG-S-CoV2, pArms-Ad5-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно, а также несущие плечи гомологии из генома аденовируса 5-го серотипа.

После этого, конструкции pArms-Ad5-CMV-S-CoV2, pArms-Ad5-CAG-S-CoV2, pArms-Ad5-EF1-S-CoV2 лианеризовали по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии, каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pAd5-too-null. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-GAC-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с делецией E1 и E3 областей и экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 соответственно.

На четвертом этапе плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-GAC-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2 гидролизировали специфической эндонуклеазой рестрикции для удаления векторной части. Полученным препаратом ДНК трансфицировали клетки культуры НЕК293. Полученный материал был использован для накопления препаративных количеств рекомбинантного аденовируса.

В результате были получены рекомбинантные аденовирусы человека 5-го серотипа, содержащие ген S белка вируса SARS-CoV-2: Ad5-CMV-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 2), Ad5-EF1-S-CoV2 (содержащий экспрессионную кассету SEQ ID NO: 3).

Таким образом, был получен экспрессионный вектор, содержащий геном рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Пример 6. Получение иммунобиологического средства в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

На данном этапе работы экспрессионные векторы, полученные в примере 5, очищали методом анионообменной и эксклюзионной хроматографии. Готовая суспензия содержала аденовирусные частицы в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства или в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Таким образом, были получены следующие иммунобиологические средства на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области.

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор,

ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad5-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

2. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 1 (Ad5-CMV-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

3. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad5-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

4. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad5-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad5-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства.

6. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad5-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 1 в варианте 1 и в варианте 2 разработанного фармацевтического средства.

Каждое из представленных иммунобиологических средств является компонентом 2 в варианте 1 и в варианте 3 разработанного фармацевтического средства.

Пример 7. Получение буферного раствора.

Разработанное фармацевтическое средство по данному изобретению состоит из двух компонентов, находящихся в разных флаконах. При этом каждый компонент представляет собой иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса с экспрессионной кассетой в буферном растворе.

Авторами изобретения был подобран состав буферного раствора, обеспечивающий стабильность рекомбинантных аденовирусных частиц. Данный раствор включает:

- 1) трис-(гидроксиметил)аминометан (трис), который необходим для поддержания pH раствора;
- 2) хлорид натрия, который добавляют для достижения необходимой ионной силы и осмолярности;
- 3) сахарозу, которая используется в качестве криопротектора;
- 4) магния хлорида гексагидрат, который необходим в качестве источника двухвалентных катионов;
- 5) ЭДТА, который используется в качестве ингибитора свободно-радикального окисления;
- 6) полисорбат-80, который используется в качестве поверхностно-активного вещества;
- 7) этанол 95%, который применяют в качестве ингибитора свободно-радикального окисления;
- 8) воду, которая используется в качестве растворителя.

Авторами изобретения было разработано 2 варианта буферного раствора: для жидкой формы фармацевтического средства и для лиофилизированной формы фармацевтического средства.

Для определения концентрации веществ, входящих в состав буферного раствора для жидкой формы фармацевтического средства, было получено несколько вариантов экспериментальных групп (табл. 1). В каждый из полученных буферных растворов добавляли один из компонентов фармацевтического средства.

1. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования,  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц.

2. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования,  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц.

3. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса обезьяны 25-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования,  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц.

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав фармацевтического средства. Полученные фармацевтические средства хранили при температуре  $-18$  и  $-70^\circ\text{C}$  в течение 3 месяцев, затем размораживали и оценивали изменение титрарекомбинантных аденовирусов.

Таблица 1  
Состав экспериментальных буферных растворов для жидкой формы фармацевтического средства

№ группы	Состав буферного раствора							Вода
	Трис (мг)	Хлорид натрия (мг)	Сахароза (мг)	Магния хлорида гексагидрат (мг)	ЭДТА (мг)	Полисорбат-80 (мг)	Этанол 95% (мг)	
1	0,968	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
2	1,815	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
3	1,21	1,752	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
4	1,21	3,285	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
5	1,21	2,19	20	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
6	1,21	2,19	37,5	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
7	1,21	2,19	25	0,0816	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
8	1,21	2,19	25	0,153	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл
9	1,21	2,19	25	0,102	0,0152	0,25	0,0025	до 0,5 мл
10	1,21	2,19	25	0,102	0,0285	0,25	0,0025	до 0,5 мл
11	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,2	0,0025	до 0,5 мл
12	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,375	0,0025	до 0,5 мл
13	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,002	до 0,5 мл
14	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,00375	до 0,5 мл
15	1,21	2,19	25	0,102	0,019	0,25	0,0025	до 0,5 мл

Результаты проведенного эксперимента показали, что титр рекомбинантных аденовирусов после их хранения в буферном растворе для жидкой формы фармацевтического средства при температурах -18 и -70°C в течение 3 месяцев не изменялся.

Таким образом, разработанный буферный раствор для жидкой формы фармацевтического средства обеспечивает стабильность всех компонентов разработанного фармацевтического средства в следующем диапазоне действующих веществ: трис от 0,1831 до 0,3432 мас.%; хлорид натрия от 0,3313 до 0,6212 мас.%; сахароза от 3,7821 до 7,0915 мас.%; магния хлорида гексагидрат от 0,0154 до 0,0289 мас.%; ЭДТА от 0,0029 до 0,0054 мас.%; полисорбат-80 от 0,0378 до 0,0709 мас.%; этанол 95% от 0,0004 до 0,0007 мас.%; растворитель - остальное.

Для определения концентрации веществ, входящих в состав буферного раствора для лиофилизированной формы фармацевтического средства, было получено несколько вариантов экспериментальных групп (табл. 2). В каждый из полученных буферных растворов добавляли один из компонентов фармацевтического средства.

1. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26-го сероти-



па с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования,  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц.

2. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования,  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц.

3. Иммунобиологическое средство на основе рекомбинантного аденовируса обезьяны 25-го серотипа с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования,  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц.

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав фармацевтического средства. Полученные фармацевтические средства хранили при температуре 2 и 8°C в течение 3 месяцев, затем размораживали и оценивали изменение титра рекомбинантных аденовирусов.

Таблица 2

Состав экспериментальных буферных растворов

№ группы	Состав буферного раствора						Вода
	Трис (мг)	Хлорид натрия (мг)	Сахароза (мг)	Магния хлорида гексагидрат (мг)	ЭДТА (мг)	Полисорбат-80 (мг)	
1	0,1936	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
2	0,363	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
							мл
3	0,242	1,1224	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
4	0,242	2,1045	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
5	0,242	1,403	58,8	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
6	0,242	1,403	110,25	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл
7	0,242	1,403	73,5	0,01632	0,0038	0,05	до 1 мл
8	0,242	1,403	73,5	0,0306	0,0038	0,05	до 1 мл
9	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,00304	0,05	до 1 мл
10	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0057	0,05	до 1 мл
11	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,04	до 1 мл
12	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,075	до 1 мл
13	0,242	1,403	73,5	0,0204	0,0038	0,05	до 1 мл

Результаты проведенного эксперимента показали, что титр рекомбинантных аденовирусов после их хранения в буферном растворе для лиофилизированной формы фармацевтического средства при температуре 2 и 8°C в течение 3 месяцев не изменялся.

Таким образом, разработанный буферный раствор для лиофилизированной формы вакцины обеспечивает стабильность всех компонентов разработанного фармацевтического средства в следующем диапазоне действующих веществ: трис от 0,0180 до 0,0338 мас.%; хлорид натрия от 0,1044 до 0,1957 мас.%; сахароза от 5,4688 до 10,2539 мас.%; магния хлорида гексагидрат от 0,0015 до 0,0028 мас.%; ЭДТА от 0,0003 мас.% до 0,0005 мас.%; полисорбат-80 от 0,0037 до 0,0070 мас.%; растворитель - остальное.

Пример 8. Определение эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке гуморального иммунного ответа.

Одной из основных характеристик эффективности иммунизации является титр антител. В примере представлены данные, касающиеся изменения титра антител против гликопротеина SARS-CoV-2 через 21 день после введения фармацевтического средства лабораторным животным.

В эксперименте использовались млекопитающие - мыши линии BALB/c, самки 18 г. Все животные

были разделены на 31 группу по 5 животных, которым внутримышечно вводили компонент 1 фармацевтического средства в дозе  $10^8$  вирусных частиц/100 мкл, а затем с интервалом в 2 недели компонент 2 в дозе  $10^8$  вирусных частиц/100 мкл. Таким образом, были получены следующие группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

Через три недели у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) по следующему протоколу.

1) Белок (S) адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 ч при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ .

2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществлялась "забивка" планшета 5% молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  на протяжении 1 ч.

3) Методом 2-кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.

4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.

5) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ .

6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.

8) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ .

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 мин добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в табл. 3.

Таблица 3

Титр антител к белку S в сыворотке крови мышей  
(среднее геометрическое значение титра антител)

№	Название группы животных	Титр антител
1	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779
2	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	29407
3	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	33779
4	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	38802
5	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	38802
6	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2	38802

	(КОМПОНЕНТ 2)	
7	Ad26- EF1 -S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 1), Ad5-CMV-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 2)	33779
8	Ad26- EF1 -S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 1), Ad5-CAG-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 2)	38802
9	Ad26- EF1 -S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (КОМПОНЕНТ 2)	33779
1 0	Ad26- null (КОМПОНЕНТ 1), Ad5-null (КОМПОНЕНТ 2)	0
1 1	Ad26-CMV-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 1), simAd25-CMV-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 2)	38802
1 2	Ad26-CMV-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 1), simAd25-CAG-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 2)	38802
1 3	Ad26-CMV-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 1), simAd25-EF1-S -CoV2 (КОМПОНЕНТ 2)	33779
1 4	Ad26- CAG -S- CoV2 (КОМПОНЕНТ 1), simAd25-CMV-S- CoV2 (КОМПОНЕНТ	33779

	2)	
1 5	Ad26- CAG -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S -CoV2 (компонент 2)	33779
1 6	Ad26- CAG -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S- CoV2 (компонент 2)	33779
1 7	Ad26- EF1 -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S- CoV2 (компонент 2)	38802
1 8	Ad26- EF1 -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S- CoV2 (компонент 2)	33779
1 9	Ad26- EF1 -S- CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S- CoV2 (компонент 2)	33779
2 0	Ad26- null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2)	0
2 1	Ad25-CMV-S- CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S- CoV2 (компонент 2)	33779
2 2	simAd25-CMV-S- CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-	29407

	CoV2 (компонент 2)	
2 3	simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	25600
2 4	simAd25- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779
2 5	simAd25- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	29407
2 6	simAd25- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	29407
2 7	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	33779
2 8	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	38802
2 9	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	33779
3 0	simAd25- null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2)	0
3 1	фосфатно-солевой буфер	0

Как видно из представленных данных, все варианты фармацевтического средства индуцируют гуморальный иммунный ответ к гликопротеину SARS-CoV-2.

Пример 9. Определение эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по сравнению с контрольным препаратом, содержащим один серотип рекомбинантного аденовируса.

Целью данного эксперимента являлось сравнение титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей после их иммунизации различными вариантами разработанного фармацевтического средства, содержащей 2 различных серотипа рекомбинантного аденовируса, с титрами антител к S белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей после их двукратной иммунизации контрольным препаратом, содержащим один серотип рекомбинантного аденовируса.

Для данного эксперимента использовали мышей линии BalB/c, 18 г, 35 шт.

Животные были иммунизированы с интервалом в 2 недели:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2),  $5 \times 10^6$  в.ч.;
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2),  $5 \times 10^6$  в.ч.;
- 3) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2),  $5 \times 10^6$  в.ч.;
- 4) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad26-CMV-S-CoV2,  $5 \times 10^6$  в.ч.;
- 5) Ad5-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2,  $5 \times 10^6$  в.ч.;
- 6) simAd25-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2,  $5 \times 10^6$  в.ч.;
- 7) PBS.

Титр антител к S антигену вируса SARS-CoV-2 определяли методом ИФА через 1 месяц после последней иммунизации. Результаты эксперимента представлены в таблице.

Таблица 4

Титр антител к S антигену вируса SARS-CoV-2 в крови мышей через месяц после их иммунизации разработанным фармацевтическим средством и контрольными препаратами

Название группы	Титр антител
Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	3104
Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	2702
simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	3104
Ad26-CMV-S-CoV2, Ad26-CMV-S-CoV2	588
Ad5-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	512
simAd25-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	446
PBS	0

Как видно из представленных данных иммунизация животных фармацевтическим средством приводит к эффекту потенцирования иммунных реакций. Данный эффект выражается в том, что титр антител к S белку вируса SARS-Co-2 в сыворотке крови животных, иммунизированных фармацевтическим средством, содержащим два типа вектора, значительно больше, чем сумма титров антител в группах, которым вводили один тип вектора.

Пример 10. Определение эффективности иммунизации разработанным фармацевтическим средством по оценке доли пролиферирующих лимфоцитов.

Напряженность клеточного иммунитета в отношении коронавируса SARS-Cov2 оценивали по количеству пролиферирующих CD4+ и CD8+ лимфоцитов периферической крови лабораторных мышей в культуре *in vitro* после повторной рестимуляции клеток рекомбинантным RBD фрагментом S белка данного коронавируса. Для определения количества пролиферирующих CD4+ и CD8+ лимфоцитов использовали метод окраски клеток красителем CFSE. Принцип этого метода заключается в том, что флуоресцентный нетоксичный краситель CFSE способен беспрепятственно проникать в клетки. После стимуляции клеток антигеном лимфоциты начинают пролиферировать, при этом краситель, находящийся в родительской клетке, распределяется поровну между дочерними клетками. Концентрация метки, а следова-

тельно, и интенсивность флуоресценции снижаются ровно в два раза. Поэтому делящиеся клетки легко отслеживать по уменьшению их флуоресценции.

В эксперименте использовались мыши линии C57BL/6. Все животные были разделены на 31 группу (по 3 животных), которым внутримышечно вводили компонент 1 фармацевтического средства в дозе  $10^8$  вирусных частиц/100 мкл, а затем с интервалом в 2 недели компонент 2 в дозе  $10^8$  вирусных частиц/100 мкл. Таким образом, были получены следующие группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2);
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

На 8 день эксперимента животных усыпляли. Из селезенки выделяли лимфоциты методом центрифугирования в градиенте фиколла-урографина. Затем выделенные клетки окрашивали CFSE по методике (B.J. Quah et al., Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidylester, *Nature Protocols*, 2007, № 2(9), 2049-2056) и культивировали в присутствии антигена (гликопротеин S вируса SARS-CoV-2). Далее клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты представлены на фиг. 2, 3. Таким образом, можно заключить, что все варианты разработанного фармацевтического средства индуцируют формирование антиген-специфического иммунного ответа (как CD4+, так и CD8+).

Пример 11. Исследование протективной активности разработанного фармацевтического средства против COVID-19 на лабораторных животных.

Протективную эффективность разработанного фармацевтического средства против COVID-19 оценивали на модели летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у сирийских хомячков с индуцированным иммунодефицитом.

Животные были разделены на 31 группу по 8 шт/группе и иммунизированы двукратно: компонентом 1 (в дозе  $10^8$  вирусных частиц/животное) и компонентом 2 разработанного фармацевтического средства (в дозе  $10^8$  вирусных частиц/животное) с интервалом в 21 день. Таким образом, были получены следующие группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 4) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 5) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 6) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 7) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 8) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);



- 9) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 10) Ad26-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 14) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 15) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 16) Ad26-CAG-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 17) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 18) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 19) Ad26-EF1-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 20) Ad26-null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2)
- 21) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 22) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 23) simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 24) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 25) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 26) simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 27) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2);
- 28) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2);
- 29) simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2);
- 30) simAd25-null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2);
- 31) фосфатно-солевой буфер.

Введение иммуносупрессантов начинали на 7 сутки после бустирующей иммунизации, заражали животных вирусом SARS-CoV-2 на 14 сутки после бустирующей иммунизации интраназально в дозе  $10^6$  TCID<sub>50</sub> на животное, в объеме 50 мкл.

В течение эксперимента масса тела контрольных не вакцинированных животных после заражения стремительно снижалась (на 10 день масса тела животных снизилась в среднем на 32% от исходной). В то же время масса тела животных, иммунизированных всеми вариантами фармацевтического средства, в первые дни после заражения незначительно снижалась, а затем возрастала (на 10 день масса тела животных увеличилась в среднем на 11% от исходной).

На фиг. 4 представлены данные выживаемости животных после заражения. По результатам исследования было показано, что иммунизация животных всеми вариантами фармацевтического средства позволяет защитить 100% животных с индуцированным иммунодефицитом от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. В контрольной группе не вакцинированных животных наблюдается 100% летальность.

Таким образом, на модели сирийских хомяков с индуцированным иммунодефицитом было показано, что иммунизация животных разработанным фармацевтическим средством позволяет сформировать протективный иммунный ответ, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Пример 12. Исследование токсичности разработанного фармацевтического средства.

Исследование токсичности проводили на половозрелых аутбредных мышах обоего пола. Для эксперимента использовали фармацевтическое средство по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), фармацевтическое средство по варианту 2 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: simAd25-CMV-S-CoV2) фармацевтическое средство по варианту 3 (компонент 1: simAd25-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2). Каждый из компонентов фармацевтического средства вводили внутримышечно и внутривенно в возрастающих дозах:  $10^8$  в.ч.,  $10^9$  в.ч.,  $10^{10}$  в.ч.,  $10^{11}$  в.ч.

На протяжении эксперимента гибели животных не зафиксировано, симптомов интоксикации не выявлено. Влияния вакцины на массу тела и массу органов животных не выявлено. Некропсия, проведенная через 14 дней после введения векторной вакцины, не показала отклонений в структуре внутренних органов мышей. Наличия местно-раздражающего действия, в рамках проведенного эксперимента, не установлено.

Таким образом, данные исследования свидетельствуют об отсутствии токсичности разработанного фармацевтического средства.

Пример 13. Исследование иммуногенности разработанного фармацевтического средства по варианту 1 на приматах.

Задача данного эксперимента заключалась в определении напряженности гуморального и клеточного иммунного ответа у приматов после их иммунизации разработанным фармацевтическим средством.

Развитие гуморального иммунного ответа оценивали по увеличению титра антител к белку S вируса SARS-CoV-2 и титра вируснейтрализующих антител в крови приматов. Развитие клеточного иммунного ответа оценивали по количеству пролиферирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Для данного исследования было использовано 17 обезьян макак резусов, самцов, весом 2,0-2,2 кг. Животных вакцинировали разработанным фармацевтическим средством по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2). В терапевтической дозе для человека  $10^{11}$  вирусных частиц/дозу вводили компонент 1, затем через 21 день в терапевтической дозе для человека  $10^{11}$  вирусных частиц/дозу вводили компонент 2.

Пробы крови отбирали у всех животных перед вакцинацией (0 день), а также через 7, 14 и 28 дней после вакцинации. Титры специфических антител к домену RBD белка S вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови приматов после их иммунизации разработанным фармацевтическим средством определяли методом ИФА по следующей методике:

на планшеты иммобилизовали антиген RBD вируса SARS-CoV-2 в концентрации 100 нг/лунка;

готовили двукратные разведения сыворотки крови приматов в буфере для забивки (разведения 1:50-1:51200), инкубировали в лунках планшета (стрипа) с иммобилизованным RBD-антигеном;

после промывки образовавшийся комплекс Ag-At выявляли конъюгатом, специфическим к Fc-фрагменту IgG антител обезьяны (Anti-MONKEY IgG (gamma chain) (GOAT) Antibody-617-101-012, ROCKLAND), меченным пероксидазой хрена;

после промывки к образовавшемуся комплексу добавляли хромогенный субстрат; затем ферментативную реакцию останавливали стоп-реагентом.

Развившуюся окраску (абсорбцию) регистрировали на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo) в двухволновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр - 620 нм.

Титр IgG антител к S белку вируса SARS-CoV-2 определяли как разведение сыворотки, в котором значение оптической плотности превосходит значение оптической плотности отрицательного контроля (сыворотка крови того же примата до введения препарата) в том же разведении в два раза. Результаты эксперимента представлены на фиг. 5.

Как видно из полученных данных, у всех животных, иммунизированных разработанным фармацевтическим средством, наблюдается повышение титра антител к вирусу SARS-CoV-2. При этом максимальный титр антител наблюдается через неделю после введения компонента 2 (на 28 день эксперимента).

Уровень вируснейтрализующих антител в крови макак резус определяли в реакции нейтрализации по подавлению негативных колоний, образованных вирусом SARS-CoV-2 в односуточном монослое клеток Vero C1008 под агаровым покрытием. Реакцию нейтрализации ставили в варианте: постоянная доза вируса - разведения сыворотки.

В работе использовали исследуемые иммунные сыворотки, полученные от обезьян перед вакцинацией (0 день), через 7, 14 и 28 дней после вакцинации, положительный контрольный образец (сыворотку крови переболевшего человека, заведомо содержащую специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2), отрицательный контрольный образец (фетальную телячью сыворотку (ФТС), заведомо не содержащую специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2) и культуру вируса SARS-CoV-2.

В реакции нейтрализации использовали разведение 1:5 сывороток крови. Рабочее разведение вирусосодержащей суспензии на основе вируса SARS-CoV-2 ("антиген") готовили на растворе Хенкса с 2% ФТС и антибиотиками (стрептомицина сульфат и бензилпенициллина натриевая соль) по 100 ЕД/мл десятикратным шагом. В приготовленном разведении концентрация вируса SARS-CoV-2 составила 200 БОЕ мл<sup>-1</sup>.

В эксперименте использовали односуточный монослой клеток Vero C1008 в пластиковых флаконах с площадью рабочей поверхности 25 см<sup>2</sup> фирма "Cellstar®", отобранных для постановки реакции нейтрализации. Смесь равных объемов сыворотки и культуры вируса SARS-CoV-2 инкубировали в течение 60 мин при температуре от 36,5 до 37,5°C, затем вносили по 0,5 мл на монослой клеток VeroC1008, предварительно удалив ростовую среду. После адсорбции комплекса антиген+антитело на клетках в течение 60 мин при температуре от 36,5 до 37,5°C инокулят декантировали, затем наносили первичное агаровое покрытие, разработанное для вируса SARS-CoV-2, и проводили дальнейшее инкубирование монослоя при температуре от 36,5 до 37,5°C в течение 2 суток.

Через 2 суток инфицированный монослой клеток с целью окрашивания 0,1% раствором нейтрального красного наносили вторичное агаровое покрытие и инкубировали в течение 24 ч при температуре от 36,5 до 37,5°C, затем проводили учет негативных колоний во флаконах. За титр антител исследуемой сыворотки принимали высшее разведение сыворотки крови, в котором выявляли подавление негативных колоний, образованных вирусом SARS-CoV-2, на 50% и более по сравнению с отрицательным контролем.

Результаты эксперимента показали, что уровень вируснейтрализующих антител более 1:5 на 14 день эксперимента наблюдался у 17,6% животных, тогда как на 28 день эксперимента - у 100% животных.

Таким образом, полученные данные показывают, что введение разработанного фармацевтического средства приводит к развитию гуморального иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 у приматов.

Для оценки клеточного иммунного ответа из крови приматов перед вакцинацией (0 день), через 7, 14 и 28 дней выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности рас-

твора фикола.

Принцип метода основан на различии в плавучей плотности форменных элементов крови. Раствор полисахарида фикола в воде имеет градиент с такой плотностью, которая позволяет при центрифугировании разделить клетки периферической крови на мононуклеарную фракцию (МФ), в которую входят лимфоциты, субпопуляция моноцитов, а также бластные гемопоэтические клетки, и фракцию, содержащую гранулоциты и эритроциты. МФ обладают меньшей, чем фикола, плотностью, что в результате центрифугирования определяет его расположение над слоем фикола. Плотность гранулоцитов и эритроцитов больше, чем плотность градиента, они проходят через градиент, опускаясь на дно пробирки (Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow// Scand. J. Clin. Lab. Investig. - 1968. - Vol. 21. - Suppl. 97. - p. 1-9). Тромбоциты - наименьшие клетки, остаются при правильно выбранной скорости центрифугирования в сыворотке крови, не доходя до раздела фаз "вода"/"фикола".

После выделения мононуклеарной фракции клеток из периферической крови обезьян проводили окраску клеток флуоресцентным красителем CFSE (Invivogen, США) и помещали в лунки планшета.

После высева мононуклеарных клеток в лунки планшета проводили повторную стимуляцию лимфоцитов в условиях *in vitro* добавлением в культуральную среду RBD фрагментом S белка коронавируса (конечная концентрация белка 1 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 ч после добавления антигена проводили измерение % пролиферирующих клеток.

Результаты эксперимента представлены на фиг. 6, 7.

Данные, полученные в ходе эксперимента, показали, что максимальная напряженность клеточного иммунитета, вызванного иммунизацией обезьян разработанным фармацевтическим средством согласно среднему арифметическому значению процента пролиферирующих CD4+ Т-лимфоцитов и CD8+ Т-лимфоцитов наблюдается на 28 день после иммунизации. Данный факт связан с проведением второй (бустирующей) иммунизацией на 21 день исследования (1,2% против 0,1% в неиммунизированной группе). В этом случае антиген-специфические CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты получают дополнительный стимул пролиферации, увеличивая долю своего присутствия в организме вакцинированного животного.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что иммунизация приматов разработанным фармацевтическим средством в исследуемой дозе и схеме иммунизации позволяет сформировать выраженный (статистически достоверно отличимый от показателей контрольной не иммунизированной группы животных) гуморальный иммунитет, характеризующийся повышением титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2 и повышением титра вируснейтрализующих антител, а также сформировать клеточный иммунитет, представленный как CD4+, так и CD8+ лимфоцитами.

Пример 14. Изучение иммуногенности разработанного фармацевтического средства путем оценки клеточного иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV-2 в крови добровольцев в различные сроки после вакцинации.

В рамках клинических исследований разработанного фармацевтического средства по варианту 1 было проведено исследование напряженности клеточного иммунитета.

В исследовании принимало участие 40 добровольцев, которые были иммунизированы:

1) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 жидкой формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц (20 человек);

2) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 лиофилизированной формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц (20 человек).

На 0 день (до введения препарата), 14 день и 28 день у добровольцев отбирали образцы крови, из которых выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фикола. Далее выделенные клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE (Invivogen, США) и высевали на лунки планшета. Затем проводили повторную стимуляцию лимфоцитов в условиях *in vitro* добавлением в культуральную среду S белка коронавируса (конечная концентрация белка 1 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 ч после добавления антигена проводили измерение % пролиферирующих клеток, а культуральную среду отбирали для измерения количества гамма-интерферона.

Для определения % пролиферирующих клеток проводили их окрашивание антителами против маркерных молекул Т-лимфоцитов CD3, CD4, CD8 (anti-CD3 Pe-Cy7 (BDBiosciences, клон SK7), anti-CD4 APC (BDBiosciences, клон SK3), anti-CD8 PerCP-Cy5.5 (BDBiosciences, клон SK1)). Пролиферирующие (с меньшим количеством красителя CFSE клеток) CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS AriaIII (BDBiosciences, США). Результирующий процент пролиферирующих клеток в каждом образце определяли путем вычитания результата, полученного при анализе интактных клеток их результата, полученного при анализе клеток рестимулированных антигеном S коронавируса. Полученные результаты представлены на фиг. 8, 9 (для жидкой формы вакцины), на фиг. 10, 11 (для лиофилизированной формы вакцины).

Количественное определение концентрации гамма-интерферона (ИФН $\gamma$ ) в культуральной среде мононуклеарных клеток крови человека через 72 ч после рестимуляции их S белком коронавируса проводили с помощью набора "гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ" (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия) по инструкции производителя. Полученные данные представлены на фиг. 12 (для жидкой формы вакцины), на фиг. 13 (для лиофилизированной формы вакцины).

Результаты проведенного исследования показали, что рост напряженности клеточного иммунитета, вызванного последовательной иммунизацией добровольцев обеими формами фармацевтического средства по варианту 1, согласно медиане значений пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, отмечается с увеличением дней после иммунизации. В обеих группах максимальные значения, пролиферирующих как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов наблюдаются на 28 день после иммунизации. Между 0 и 28 днями исследования наблюдается максимальная статистически достоверная разница в значениях, пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов -  $p < 0,001$ .

Из результатов, представленных на фиг. 12, 13, можно заключить, что рост напряженности клеточного иммунитета, вызванного последовательной иммунизацией добровольцев обеими формами фармацевтического средства по варианту 1, согласно медиане прироста концентрации ИФН $\gamma$  отмечается с увеличением дней после иммунизации. Статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН $\gamma$  до иммунизации (0 день) и через 14 дней после проведенной вакцинации составила  $p < 0,001$ . Максимальный прирост концентрации ИФН $\gamma$  наблюдается на 28 день после иммунизации. Между 0 и 28 днями исследования наблюдается максимальная статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН $\gamma$  -  $p < 0,001$ .

Таким образом, исходя из приведенных данных можно заключить, что иммунизация разработанным фармацевтическим средством способна вызвать формирование напряженного антиген-специфического клеточного звена противoinфекционного иммунитета, что подтверждается высокой степенью статистической достоверности в измеряемых параметрах до и после иммунизации.

Пример 15. Изучение иммуногенности разработанного фармацевтического средства путем оценки титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в крови добровольцев в различные сроки после вакцинации.

В исследовании принимало участие 40 добровольцев, которые были иммунизированы:

1) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 жидкой формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц (20 человек);

2) компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 лиофилизированной формы разработанного фармацевтического средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза  $1 \times 10^{11}$  вирусных частиц (20 человек).

На 14, 21, 28 дни у добровольцев отбирали образцы крови, из которых выделяли сыворотку.

Титр антител к домену RBDS белка вируса SARS-CoV-2 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора "SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи". Анализ проводили согласно инструкции производителя.

Результаты анализа титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови добровольцев после введения жидкой формы препарата представлены на фиг. 14.

Результаты анализа титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотки крови добровольцев после введения лиофилизированной формы препарата представлены на фиг. 15.

Как видно из представленных данных, иммунизация добровольцев разработанным фармацевтическим средством как в жидкой форме, так и в лиофилизированной форме позволяет сформировать выраженный (статистически достоверно отличимый от показателей контрольной не иммунизированной группы животных) гуморальный иммунитет, характеризующийся повышением титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2. При этом рост напряженности гуморального иммунного ответа отмечается с увеличением дней после иммунизации.

Таким образом, поставленная техническая задача, а именно создание средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, достигнута, что подтверждается приведенными примерами.

### **Промышленная применимость**

Все приведенные примеры подтверждают эффективность фармацевтических средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и промышленную применимость.

### Перечень последовательностей

<110> федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалея» Министерства здравоохранения Российской Федерации

<120> Фармацевтическое средство и способ его использования для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 (варианты).

<160> 7

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 4711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая CMV-промотор, оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования

<400> 1

```

atagtaaaca attacgggggt cattagttca tagccatat atggagtcc gcgttacata 60
acttacgga aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgactgcaat 120
aatgacgtat gttcccatag taaccgcaat agggacttic cattgacgtc aatgggtgga 180
gtatttacgg taaactgccc acttgccagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc 240
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagat acatgacctt 300
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattatg atcgcattta ccatggtgat 360
gcgggtttgg cagtacatca atggcgctgg atagcggitt gactcacggg gatttccaag 420
tcctccccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaaatcaac gggactttcc 480
aaaatgtctg aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtagcgctg tacggtggga 540
ggctctatata agcagagctg gtttagtga cctgacagat cgtagagat ctggtacctg 600
cgacggggcc gctcagcct aagcctggta ccatgtttg gttccttgg ttattgccac 660
tagtctctag tcagtgtgtg aacctgacca caagaaccca cctgcctcca gcctacacca 720
acagctttac cagaggcgtg tactaccccg acaaggtgtt cagatcaccg gtgctgacct 780
ctaccaggga cctgttctcg cctttctca gcaactgac ctggttccac gccatccacg 840
tgtccggcac caatggcacc aagagattcg acaaccccg gctgccttc aacgacgggg 900
tgtactttgc cagcaccgag aagtccaaca tcatcagagg ctggatctc ggcaccacac 960
tggacagcaa gaccagagc ctgctgatcg tgaacaacgc caccaactg gtcataaag 1020
tgtgagagt ccagttctgc aacgacccct tcctggcgt ctaatacac aagaacaaca 1080
agagctggat ggaaagcgag ttccgggtgt acagcagcgc caacaactgc acctcgagt 1140
acgtgtccca gccttctcg atggactgg aagcaagca gggcaacttc aagaacctgc 1200
gcgagtctgt gttcaagaac atcgacggct actcaagat ctacagcaag cacaccctca 1260
tcaacctcgt gcgggatctg cctcagggtc tctctgctc tgaacccctg gtggatctgc 1320
ccatcggcat caacatcacc cggtttcaga cactgctggc cctgcacaga agctacctga 1380
cacctggcga tagcagcagc ggaatggacag ctggtgccgc cgttactat gtggctacc 1440
tgcagcctag aaccttctg ctgaagtaca acgagaacgg caccatcacc gacgcccgtg 1500
attgtctct ggatctctg agcagagcaa agtgcacctt gaagtcttc accgtggaaa 1560
aggcactcta ccagaccagc aacttccggg tgcagcccac cgaatccatc gtgcgggttc 1620
ccaatatca caatctgtgc cccttcggcg aggtgttcaa tgccaccaga ttcgctctg 1680
tgtacgcctg gaaccggaag cggatcagca atgctgtggc cgactactcc gtgctgtaca 1740
actccgccag ctccagcacc tcaagtgtc acggcgtgtc ccctaccaag ctgaacgacc 1800
tgtcttacc aaactgttac gccgacagct tcgtgatcc gggagatgaa gtgcggcaga 1860
ttgccccctg acagacagc aagatgccc actacaacta caagctgccc gacgacttca 1920
ccggctgtgt gattgctgg aacagcaaca acctggactc caaagtggc ggcaactaca 1980
attactgta ccggctgtc cggaagtcca atctgaagcc ctgcagcgg gacatctcca 2040

```

ccgagatca tcagccggc agcaccctt gtaacggcgt ggaaggctc aactgctact 2100  
 tccactgca gtctacggc ttcagccca caaatggcgt gggctatcag ccctacagag 2160  
 tgggtgtgt gagcttcgaa ctgtctcatg cccctgccac agtgtgcggc cctaagaaa 2220  
 gcaccaatct cgtgaagaac aatgcgtga acttcaact caacggcctg accggcaccg 2280  
 gcgtgtgac agagagcaac aagaagtcc tgccattcca gcagttggc cgggatattg 2340  
 ccgataccac agacccgta cgagatccc agacactgga aatcctggac atcacccctt 2400  
 gcagcttcgg cggagtgctt gtgatcacc ctggcaccaa caccagcaat caggtggcag 2460  
 tgcgtgacca ggacgtgaac tgtaccgaag tgcccgtggc catcacgcc gatcagctga 2520  
 caactacatg gcgggtgtac tocaccggca gcaatgtgt teagaccaga gccggctgtc 2580  
 tgatcggagc cgagcacgtg aacaatagct acgagtgcca catcccacat ggcgctggca 2640  
 tctgtccag ctaccagaca cagacaaca gccccagacg ggccagatct gtggccagcc 2700  
 agagcatcat tgctacaca atgtctctgg gcgccgagaa cagcgtggcc tactccaaca 2760  
 actctatgc tatcccacc aacttaccac tcagcgtgac cacagagatc ctgctgtgt 2820  
 catgaccaa gaccagcgtg gactgcacca tgtacatct cgccgattcc accgagtgct 2880  
 ccaactgct gctcagatc ggcagcttct gcaaccagct gaatagagcc ctgacaggga 2940  
 acagctgga acagacaag aacaccgaag aggtgtcgc ccaagtgaag cagatctaca 3000  
 agaccctcc tatcaaggac ttcggcggct tcaattcag ccagatctg ccgatccta 3060  
 gcaagcccag caagcggagc tcatcgagg acctgtgtt caacaaagt acactggccg 3120  
 acccggctt catcaagcag tatggcgatt gtctggcga cattgcccg agggatctga 3180  
 ttgcgccca gaagttaac ggactgacag tgcctccacc actgctgacc gatgagatga 3240  
 tgcgccagta cacatctgcc ctgctggccg gcacaatcac aagcggctgg acattggag 3300  
 ctggcggcgc tctgcagatc cctttgcta tgcagatggc ctaccggctt aacggcatcg 3360  
 gagtaccca gaatgtctg tacgagaacc agaagctgat cgccaaccag tcaacacgc 3420  
 ccatgccca gatccaggac agcctgagca gcacagcaag gcgccggga aagctgcagg 3480  
 acgtggcaa cagaatgcc caggcactga acacctggg caagcagctg tcctcaact 3540  
 tggcgccat cagctctgtg ctgaacgaca tctgagcag actggacaag gtggaagccg 3600  
 aggtcagat cgacagactg atcaccggaa ggcctgacgc cctgcagacc tacgttacc 3660  
 agcagctgat cagagccgcc gagattagag cctctgcaa tctggccgcc accaagatg 3720  
 ctgagtggt cctgggccag agcaagagag tggactttg cggcaagggc taccactga 3780  
 ttagctccc tcagtctgcc cctcacggcg tgggtttct gcactgaca tacgtgccg 3840  
 ctcaagaaa gaattcacc accgctccag ccacttgca cgacggcaaa gccaccctt 3900  
 ctagaagag cgtgtctgt tccaacggca ccattggtt cgtgaccag cggaactct 3960  
 agagcccca gatcatcacc accgacaaca cctctgtc tggcaactgc gactcgtga 4020  
 tggcattgt gaacaatac gtgtacgacc ctctgcagcc cgagctggac agctcaaa 4080  
 aggaactgga taagtactt aagaaccaca caagcccga cgtggacctg ggcgacatca 4140  
 cgggaatcaa tgccagcgtc gtgaacatcc agaagagat cgaccggctg aacgagtg 4200  
 ccaagaatct gaacgagagc ctgatcgacc tgcaagaact ggggaagtac gagcagtaca 4260  
 tcaagtggc ctggtacatc tggctggct ttatgcccg actgattgcc atcgtgatgg 4320  
 tcacaatcat cctgtgttc atgaccagct gctgtagct cctgaagggc tttgtagct 4380  
 gtggcagct ctgcaagtc gacgaggacg attctgagcc cgtgctcaa ggagtcaaat 4440  
 tacattacac ataagatata cgatccaccg gatctagata actgatcata atcagccata 4500  
 ccacattgt agagtttta ctgctttaa aaaacctccc acacctccc ctgaacctga 4560  
 aacataaat gaatcaatt gttgttga actgtttat tgcagcttat aatggttaca 4620  
 aataaagcaa tagcatcaca aatttcaaa ataaagcatt ttttcaactg cattctagt 4680  
 gtgtttgtc caaactcacc aatgtatctt a 4711  
 <210> 2  
 <211> 5984  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая CAG-промотор,  
 оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования

&lt;400&gt; 2

gacatfgatt atfgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gticatagcc 60  
 catatatgga gticcgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgectgce tgaccgccc 120  
 acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgtcc catagtaacg ccaataggga 180  
 cttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacate 240  
 aagtgatca taigccaagt acgcccctta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300  
 ggcatatgc ccagtatcat accttatggg accttctac ttggcagtac atctacgtat 360  
 tagtcatcgc tattaccatg gtcgaggfga gccccacgtt ctgcttcact cccccatct 420  
 cccccctcc caccccaat ttigtaitta tttatlttt aaitlittg tgcagcgaig 480  
 gggggggggg gggggggcgc gcgccagcgc gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg 540  
 cgaggcggag aggtgcccgc gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag ttctcttta 600  
 tggcagcgc cggcggcgcg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgc gcgggagtcg 660  
 ctgcccctg ccttcgcccc gtgccccgt ccccccgcgc ctgcccgcgc cggcccgcgc 720  
 tctgactac cgcgttact ccacaggtga gcggggcggga cggccctct cctccggcct 780  
 gtaattagc ctigtittaa tgacggcttg ttctttct gtggctcgt gaaagcctg 840  
 aggggcctcc gggggccct ttgtcgggg gtagcggcgc ggggggtcgc tgcgtgtgtg 900  
 tctgtgtgg gagcggcgc tgcggctccg cgtgcccgg cggctgtgag cgtcggggc 960  
 gcggcgggg gctttgtgc cctccagtg tgcgcgaggg gagcggggcc gggggcgggtg 1020  
 ccccgcgtg cgggggggct gcgaggggaa caaagctgc gtgcgggggtg tgtcgtgtgg 1080  
 ggtgagcag ggggtgtggg cgcgtcggc gggctgcaac cccccctga cccccctcc 1140  
 cgagtgtgc agcacggccc ggcttcgggt gcggggctcc gtacggggcg tggcggggg 1200  
 ctgcccctc cggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cggcggggc gggggcgcct 1260  
 cggggcgggg agggctcggg gggggggcgc ggcggcccc ggagcggcg cggctgtcga 1320  
 ggcggcga gcccgagcca ttgctttta tggtaactgt gcgagaggg gcagggaact 1380  
 cctttgtcc aaatctgtc ggagcggaaa tctgggagc gccggccac cccctctagc 1440  
 gggcggggg cgaagcgtg cgcgcggcg aggaaggaaa tggcggggg gggccttctg 1500  
 gctgcggc gccgcgtcc ccttctcct ctccagcct ggggtgtct gcggggggac 1560  
 ggtcgtcctt gggggcagc ggccagggcg ggttcgctt ctgcccgtg accggcggct 1620  
 ctgaaagct tggtaactg ttgtgtcc ttgttatt gccactagc tctagtctg 1680  
 gtgtgaact gaccacaaga acccagctgc ctccagccta caccacagc ttaccagag 1740  
 tctgttacta ccccgacaag gtgttcagat ccagcgtgct gcactctacc caggacctg 1800  
 tctgcaacga cccctcctg ggcgttact atcacaagaa caacaagagc tggatggaaa 1860  
 gcaccaagag attcgacaac cccgtgtgc cctcaacga cggggtgtac ttgccaaga 1920  
 ccgagaagtc caacatcat agaggctgga tcttcggcac cacactggac agcaagacc 1980  
 agagcctgt gatcgtgaac aacggcaca acgtggctat caaagtgtg gattccagt 2040  
 tctgcaacga cccctcctg ggcgttact atcacaagaa caacaagagc tggatggaaa 2100  
 gcgagttcc ggtgtacagc agcggcaaca actgcacct cagttactg tccagcctt 2160  
 tctgtatga cctggaaagg aagcagggca actcaagaa cctgcccag ttctgttca 2220  
 agaacatca cggctactc aagatctaca gcaagcac cctatcaac ctggtcggg 2280  
 atctgcctca gggcttctt gctctggaac cctggtgga tctgccaac ggcataca 2340  
 tcaccgggt icagacactg ctggccctgc acagaagta cctgacacct ggcgatagca 2400  
 gcagcggat gacagctgt gcccccgtt actatgtgg ctacctgag cctagaacct 2460  
 tctgtgaa gtacaacag aacggcaca tcaccagcgc cgtggattg gctgtgatc 2520  
 cctgagcga gacaagtg accctgaagt cctcaccgt ggaaggggc atctaccaga 2580  
 ccagcaact cgggtgag cccaccgaat ccatcgtgc gttcccaat atccaatc 2640  
 tgtcccctt cggcagggt tcaatgcca ccagattgc ctctgtgac gcctggaac 2700  
 ggaagcggat cagcaatgc gtggcggact actcgtgtg gtacaactc gccagctca 2760  
 gcacctcaa gtgtacgc gtgtccccta ccaagtgaa gcacctgtc ttcacaaac 2820  
 gtacccga cagctcgtg atccggggag atgaagtgc gcagattgc cctggacaga 2880  
 caggcaagat cggcactac aactacaag tccccacga cttaccggc tgtgtgatt 2940  
 cctggaacag caacaactg gactccaag tggcggcaa ctacaattac ctgtaccgc 3000  
 tttccggaa gtccaactg aagccctcg agcgggacat cccaccgag atctatcag 3060

ccggcagcac cccttgaac ggcgtggaag gcttcaactg ctacttccca ctgcagtct 3120  
 acggcttca gccacaaat ggcgtgggct atcagcccta cagagtggg gtgctgagct 3180  
 tgaactgct gcatgccct gccacagtgt gcggccctaa gaaaagcacc aatctcgtga 3240  
 agaacaatg cgtgaactt aacttcaacg gcctgaccgg caccggcgtg ctgacagaga 3300  
 gcaacaagaa gttcctgcca ttccagcagt ttggccggga tattgccgat accacagacg 3360  
 ccgtacgaga tcccagaca ctggaatcc tggacatcac cccttgacg ttcggcggag 3420  
 tgtctgtgat caccctggc accaacacca gcaatcaggt ggcagtgtg taccaggacg 3480  
 tgaactgtac cgaagtgccc gtggccattc acgccgatca gctgacacct acatggcggg 3540  
 tgtactcac cggcagcaat gtgttcaga ccagagccgg ctgtctgac ggagccgagc 3600  
 acgtgaacaa tagctacgag tgcgacatcc ccatggcgc tggcatctgt gccagtacc 3660  
 agacacagac aaacagccc agacgggcca gatctgtggc cagccagagc atcattgct 3720  
 acacaatgt tctggcgcc gagaacagcg tggcctactc caacaactct atcgtatcc 3780  
 ccaccaactt caccatcagc gtgaccacag agatcctgcc tgttccat accaagacca 3840  
 gcgtggact caccatgtac atctgcggcg attccaccga gtgtccaac ctgctgtcgt 3900  
 agtaccgac cttctcacc cagctgaata gagccctgac aggatcgc gtggaacagg 3960  
 taaaggacac ccaagaggtg ttgcccaag tgaagcagat ctacaagacc cctctatca 4020  
 aggactcgg cggctcaat ttacagcaga ttctcccga tctagcaag cccagaagc 4080  
 ggagcttcat cgaggacctg ctgttcaaca aatgacact ggccgacgcc ggcttcatca 4140  
 agcagtatgg cgattgtctg ggcgacattg ccgccaggga tctgattgc gcccaagat 4200  
 ttaaggact gacagtgtct ccaccctgc tgaccgatga gatgatgcc cagtacacat 4260  
 ctgccctgt ggccgcaca atcaaacgc gctggacatt tggagctggc gccctctgc 4320  
 agatccctt tgctatcag atggcctacc ggttcaacgg catcggagt acccagaatg 4380  
 tctgtacga gaaccagaag ctgacgcca accagtcaa cagcccatc ggcaagatcc 4440  
 aggacagcct gagcagaca gcaagcggcc tgggaaagct gcaggacctg gtcaaccaga 4500  
 atgccaggc actgaacacc ctgtcaagc agctgtctc caactcggc gccatcagct 4560  
 ctgtgtgaa cgacatcctg agcagactgg acaaggtgga agccgaggtg cagatcagca 4620  
 cactgatcac cggaggctg cagtcctct agacctagt taccagcag ctgatcagag 4680  
 gcgccagat tagagcctct gcaatctgg ccgccaccaa gatgtctgag tgtgtctgg 4740  
 gccagagcaa gagatggac ttttgggca agggctacca cctgatgagc ttccctcagt 4800  
 ctgccctca cggcgtgggt ttctgcacg tgacatacgt gcccgctcaa gagaagaat 4860  
 tcaccaccg tccagccatc tgccacgac gcaaagccca ctttctaga gaagcgtgt 4920  
 tctgtccaa cggcacccat tggttcgtga ccagcggaa cttctacgag cccagatca 4980  
 tcaccaccga caacacctc gtgtctggca actcgcagct cgtgatggc atttgaaca 5040  
 ataccgtga cgaccctctg cagcccagc tggacagct caaagaggaa ctggataagt 5100  
 actttagaa ccacacaag cccgacgtgg acctgggcca catcagcga atcaatgcca 5160  
 gcgtcgtgaa catccagaaa gagatcgacc ggctgaacga ggtggccaag aatctgaacg 5220  
 agagcctgat cgacctcaa gaactgggga agtacagca gtacatcaag tggcctggt 5280  
 acatctgct ggcctttatc gccgactga ttgccatcgt gatggtcaca atcatctgt 5340  
 gttgatgac cagctctgt agctgcctga agggctgtg tagctgtggc agctctgca 5400  
 agttcgacga ggacgattct gagcccgtgc tcaaggagt caaattacat tacacataat 5460  
 tcaactccta ggtcaggtc gcctacaga agtggtggc tgggtggcc aatccctgg 5520  
 ctcaacaata cactgagat cttttccct ctgcaaaaa ttatggggac atcatgaagc 5580  
 ccctgagca tctgactct ggctaataaa gaaattat ttcaatgca atagtgtgt 5640  
 ggaattttt gtgtctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatca ttaaacatc 5700  
 agaatgagta ttggtttag agtttggcaa catatgcca tatgtggt gccatgaaca 5760  
 aaggtggct ataaagaggt catcagtata tgaacagcc ccctgctgtc catcttat 5820  
 tccatgaaa agccttact tgaggttaga tttttata tttgtttg tgtatttt 5880  
 ttttaacat cctaaaaat ttcttacct gtttactag ccagatttt cctcctcc 5940  
 tgactactc cagtcatagc tctcctctt ctctatgga gatc 5984  
 <210> 3  
 <211> 5314  
 <212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая EF1-промотор, оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования

<400> 3

ggtgaggctc cggcgccctg cagtgaggcag agcgacatc gccacagtc cccgagaagt 60  
 tggggggagg ggtcgccaat tgaaccggg cctagagaag gtggcgggg gtaactggg 120  
 aaagtgatg cgtgtactgg ctccgccttt ttcccgaggg tgggggagaa ccgtatataa 180  
 gtgcagtagt cggcgtgaac gttcttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240  
 gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc ttttacggg ttatggccct tgcgtgcctt 300  
 gaattactc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagt 360  
 ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccttc gcctcgtgct tgagttgagg 420  
 cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggg gcaccttcgc gcctgtctcg 480  
 ctgcttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgcttttt 540  
 tctgcaaga tagtcttga aatgcgggcc aagatctgca cactggattt tcggttttg 600  
 gggccgcggg cggcgacggg gccctgctgt cccagcgac atgttcggcg aggcggggcc 660  
 tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg 720  
 tgccctggct cgcgccccc gtatcggcc ccccctgggc ggcaaggctg gcccgctcgg 780  
 caccagtgc gtgagcggaa agatggcgc tcccggccc tgctcaggg agctcaaaa 840  
 ggaggacgc gcgctcgga gagcggcgg gtgagtcacc cacacaagg aaaaggcct 900  
 ttcctctc agccgtcgt tcatgtgact ccacggagta ccggcgccg tccaggcacc 960  
 tcatgattg ctgagcttt tggagtact cgtcttagg tggggggag gggttttat 1020  
 cgatggagt tccccactg gactgggtg agactgaagt taggccact tggcactga 1080  
 tgaattctc ctggaaatt gcccttttg agttggatc ttggttcatt tcaagcctc 1140  
 agacagtgt tcaaaagttt ttcttccat ttcaggtgtc gtgaggaatt agcttggtac 1200  
 taatacact cacaagctt gtaccatgtt tgtgtcctt gtgtattgc cactagtctc 1260  
 tagtcagtgt gtgaactga ccaagaac ccagctgct ccagctaca ccaacagctt 1320  
 taccagagc gtgtactacc ccgacaaggt gttcagatcc agcgtgctgc actctacca 1380  
 ggactgttc ctgctttct tcagcaactg gactgtgtc cacgcatcc acgtgtccgg 1440  
 cacaatggc accaagatg tcgacaacc cgtgctgccc ttcaagcagc ggggtgactt 1500  
 tgccagacc gagaagtcca acatcatcag aggtggatc ttccgacca cactggacag 1560  
 caagaccag agcctgctga tctggaaca cggccaacac gttgctatca aagtgtgctg 1620  
 gttccagttc tgcaacgacc ccttctggg cgtctactat cacaagaaca acaagagctg 1680  
 gatggaagc gaggtcggg tgtacagcag cgccaacaac tgcacctcg agtactgtc 1740  
 ccagcttct ctgatggacc tggaaaggca gcagggcaac tcaagaacc tgcgcgagtt 1800  
 cgtgttcaag aacatcgacg gctacttcaa gatctacagc aagcacacc ctatcaacct 1860  
 cgtcgggagt ctgctcagg gcttctctg tctggaacc ctggtggatc tgcccatcgg 1920  
 catcaacat acccggttcc agactctgt ggcctgcaac agaagctacc tgacacctgg 1980  
 cgatagcagc agcggatgga cagctgtgct gcgctgtac tatgtgggt acctgcagcc 2040  
 tagaaccttc ctgctgaaat acaacgagaa cggcacatc accgacgccc tggattgtgc 2100  
 tctggatct ctgagcgaga caaagtgcac cctgaaatcc ttcacctgg aaaaggcat 2160  
 ctaccagacc agcaactcc ggggtgcagc caccgaatcc atcgtgcggt tccccaat 2220  
 cacaatctg tgcctctgc gcgaggtgt caatgccacc agattgcct ctgtgtacgc 2280  
 ctggaaccgg aagcggatca gcaattcgt ggcgactac tccgtgctgt acaactccgc 2340  
 cagctcagc acctcaagt gctacggcgt gtccctacc aagctgaacg acctgtgctt 2400  
 cacaacgtg taccccgaca gcttctgat ccggggagat gaagtgcggc agattgccc 2460  
 tggagagaca gcaaatcgc ccgactaca ctacaagctg cccgacgact taccggctg 2520  
 tgtgattgcc tggaaacgca acaactgga ctccaagtc ggcggcaact acaattacct 2580  
 gtaccggctg tccggaagt ccaatctgaa gcccttcgag cgggacatct ccaccagat 2640  
 ctatcagccc gccagcacc cttgtaacgg cgtggaaggc ttaactgct acttccact 2700  
 gcagctctac ggcttccag ccacaatgg cgtgggctat cagccctaca gactgtggt 2760  
 ctgagcttc gaactgctc atgcccctgc cacagtgtgc ggcctaaga aaagcacc 2820

tctctggaag aacaatgcg tgaactcaa cttcaacggc ctgaccggca cggcgtgtct 2880  
 gacagagagc aacaagaagt tcctgccatt ccagcagitt ggccgggata ttgccgatac 2940  
 cacagagcgc gtacgagatc cccagacact ggaatcctg gacatcacc cttgcagctt 3000  
 cggcggagtg tctgtgatca cccctggcac caacaccagc aatcaggtgg cagtgtgta 3060  
 ccaggacgtg aactgtaccg aagtgccctg ggccattcac gccgatcagc tgacacctac 3120  
 atggcgggtg tactccaccg gcagcaatgt gttcagacc agagccggct gtctgatcgg 3180  
 agccgagcac gtgaacaata gctacgagtg cgcacatccc atcggcgcctg gcactgtgic 3240  
 cagctaccag acacagacaa acagcccagc acgggcccaga tctgtggcca gccagagcat 3300  
 cattgectac acaatgtctc tggcgcccga gaacagcgtg gcctactcca acaactctat 3360  
 cgctatccc accaattca ccatcagcgt gaccacagag atcctgcctg tgtccatgac 3420  
 caagaccagc gtggactgca ccatgtacat ctgcggcgtat tccaccgagt gctccaacct 3480  
 gctctgacg tacggcagct tctgaccca gctgaataga gccctgacag ggatgccctg 3540  
 ggaacaggac aagaacaccc aagaggtgtt cgccaagtg aagcagatct acaagacccc 3600  
 tcctatcaag gacttcggcg gcttcaatt cagccagatt ctgccgac ctagcaagcc 3660  
 cagcaagcgg agcttcatc aggcactgct gtcaacaaa gtgacctgg ccgacgccgg 3720  
 ctctatcaag cagtatggcg attgtctgg cgacattgcc gccagggatc tgatttgcg 3780  
 ccagaatttt aacggactga cagtgtctcc accactgctg accgatgaga tgatgccca 3840  
 gtacacatct gccctgtcgg ccggcacaat cacaagcggc tggacatttg gagctggcgc 3900  
 cgctctgacg atccccttg ctatgcagat ggctaccgg ttaacggca tggagtgac 3960  
 ccagatgtg ctgtacgaga accgaagct gatcgccaac cagttaaca gcccatcgg 4020  
 caagatccag gacacccctga gcagcacagc aagcgccctg ggaaagctgc aggacgtgt 4080  
 caaccagaat gccaggcac tgaacacct ggtaagcag ctgtctcca actcggcgc 4140  
 ctacagctct gtctgaacg acatctgag cagactggac aaggtggaag ccgaggtgca 4200  
 gatgacaga ctgatcaccg gaaggctgca gtccctcag acctacgta cccagcagct 4260  
 gatcagagcc gccgagatta gagcctctgc caatctggcc gccaccaaga tgtctgagtg 4320  
 tgtctggggc cagagcaaga gagtggactt ttgcggcaag ggctaccacc tgatgactt 4380  
 ccctcagct gccctcagc gcgtgtgtt tctgcacgtg acatactgc ccgctcaaga 4440  
 gaagaatttc accaccgtc cagccatctg ccacgacggc aaagccact tcttagaga 4500  
 aggcgtgttc gtgtccaacg gcacccattg gttctgacc cagcggaaat tctacgacc 4560  
 ccagatcacc accaccgaca acactctgt gtctgcaac tgcgacgtc tgatgccat 4620  
 tgtgaacaat accgtgtac accctctgca gcccgagctg gacagttca aagaggaact 4680  
 ggataagtag tttaagaacc acacaagccc gcactggac ctggcgaca tcagcgaat 4740  
 caatgccagc gtcgtgaaca tccagaaga gatcgaccgg ctgaacgagg tggccaagaa 4800  
 tctgaacagc agcctgatcg acctgcaaga actggggaag tacgagcagt acatcaagt 4860  
 gccctggtag atctggctgg gctttatgc cggactgatt gccatctga tggtaacaat 4920  
 catgctgtgt tgcatgacca gctgctgtag ctgcctgaag ggctgttga gctgtggcag 4980  
 ctgctgcaag ttcgacgagg acgattctga gccctgtctc aaaggagtca aattacatta 5040  
 cacataagt ctagagtcgg ggcggcccgc cgtctgctga tcagcctga ctgtgccctc 5100  
 tagttgccag ccatctgtt tttgccctc ccccgctct tcttgacc tggaaggtgc 5160  
 cactcccact gtccttctc aataaatga ggaattgca tgcattgtc tgagtaggtg 5220  
 tcattctatt ctgggggtg ggttgggca ggacagcaag ggggaggatt gggagacaa 5280  
 tagcagcat gctggggatc cgagtgtcga taag 5314  
 <210> 4  
 <211> 4678  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Разработанная экспрессионная кассета, содержащая CMV-промотор,  
 оптимизированную последовательность S белка SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования  
 <400> 4  
 atagtaatc attacgggtt cattagtta tagccatat atggagtcc gcgttacata 60  
 acttacgtaaatgagccgc ctggctgacc gccsaacgac ccccaccat tgactgcaat 120

aatgacgtat gttccatag taacgccaat agggacttc cattgacgtc aatgggtgga 180  
gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc 240  
ccctattgac gtaaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt 300  
atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattatgc atcgctatta ccatgggtgat 360  
goggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag 420  
tctccacccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaaatcaac gggactttcc 480  
aaaatgtct aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga 540  
ggtctatata agcagagctg gtttagttaa ccgtcagatc cgctagagat ctggtacctt 600  
gtttgttct cttgtttat tgcactagt ctctagttag tgtgtgaacc tgaccacaag 660  
aaccagctg cctccagcct acaccaacag cttaccaga ggcgtgtact accccgacaa 720  
ggtgttcaga tccagcgtgc tgcactctac ccaggacctg ttctgectt tcttcagcaa 780  
cgtgacctgg tccacgcca tccactgttc cggcaccaat ggcaccaaga gattcgacaa 840  
ccccgtgct cccitcaacg acgggggtga ctttccagc accgagaagt ccaacatcat 900  
cagaggctgg atcttcggca ccacctgga cagcaagacc cagagcctgc tgactgtgaa 960  
caacgccacc aacttgggta tcaaagtgtg cgagtccag ttctgcaacg accccttctt 1020  
ggcgctctac tatcaaga acaacaagag ctggatggaa agcaggttcc ggtgttacag 1080  
cagcccaac aactgacct tgcagtacgt gtcccagcct ttctgtatgg acctggaagg 1140  
caagcagggc aactcaaga acctgcgcga gtctgtgtc aagaacatcg accgctactt 1200  
caagatctac agcaagcaca cccatcaaa cctcgtgcgg gatctgcctc agggcttctc 1260  
tctctggaa cccctgggtg atctcccat cggcatcaac atcaccgggt ttagacact 1320  
gctggccctg cacagaagct acctgacacc tggcgatagc agcagcggat ggcagctgg 1380  
tgccggcctt tactatgtgg gctacctgca gcctagaacc ttctgtctga agtacaacga 1440  
gaacggcacc atcaccgacg ccgtggattg tgcttggat cctctgagcg agacaagt 1500  
caccctgaag tcttaccg tggaaaagg catctaccag accagcaact tccgggtgca 1560  
gcccaccgaa tccatcgtgc ggttcccaa tatccaat ctgtcccct tggcgagggt 1620  
gttcaatgcc accagattcg cctctgtgta cgcctggaac cggaaaggga tcagcaattg 1680  
cgtggccagc tactcctgct gtacaactc cgcagcttc agcacttca agtgcactgg 1740  
cgtgtcccct accaagctga acgacctgtg ctcaacaac gtgtacgccc acagcttctg 1800  
gatccgggga gatgaagtgc ggcagattgc ccttggagc acaggcaaga tggccgacta 1860  
caactacaag ctgcccagc acttaccgg ctgtgtgatt gcttggaaac gcaacaact 1920  
ggactccaaa tgcggcgca actacaatta cctgtaccgg ctgttccgga agtccaact 1980  
gaagccctc gagcgggaca tctccaccga gatctatcag gcggcagca cccctgttaa 2040  
cggcgtggaa ggccttaact gctactccc actgcagtc tacgcttct agcccacaaa 2100  
tggcgtgggc taccagcct acagagtgt ggtgctgagc ttcgaactgc tgatgcccc 2160  
tgccacagtg tggcccta agaaaagcac caatctctg aagaacaaat gcgtgaactt 2220  
caactcaac ggcctgaccg gcaccggcgt gctgacagag agcaacaaga agttcctgcc 2280  
attccagcag ttggccggg atattgcccga taccacagac gccgtacgag atcccagac 2340  
actggaatc ctggacatca cccctgcag ctctggcgga gtgtctgtga taccctggt 2400  
caccacacc agcaatcagg tggcagtgct taccaggac gtgaactgta ccgaagtgcc 2460  
cgtggccatt cacccgatc agctgacacc tacatggcgg gtgtactcca ccggcagcaa 2520  
tgtgttcag accagagccg gctgtctgat cggagccgag cacgtgaaca atagctacga 2580  
gtgcgacat cccatggcg ctggcatctg tgccagctac cagacacaga caaacagccc 2640  
cagacgggcc agatctgtgg ccagccagag catcattgcc tacacaatgt ctctggggc 2700  
cgagaacage gtggcctact ccaacaactc tatcgetatc cccaccaact tcaccatag 2760  
cgtgaccaca gagatcctgc ctgttccat gaccaagacc agcgtggact gcaccatgta 2820  
catctggcg gattccaccg agtctccaa cctgtctgtg cagtacggca gcttctgcac 2880  
ccagctgaat agagccctga cagggatcgc cgtggaacag gacaagaaca cccaagaggt 2940  
gttgcctcaa gtaagcaga tctacaagc cctcctatc aaggacttcg gcggcttcaa 3000  
tttcagccag attctgccc atctagcaa gccacgcaag cggagcttca tcgaggacct 3060  
gctgttcaac aaagtacac tggccgacgc cggcttcatc aagcagtatg gcgattgtct 3120  
ggggacatt gccgcccagg atctgattg ccccagaag ttaacggac tgacagtct 3180  
gccaccactg ctgaccgatg agatgatgc ccagtacaca tctgccctgc tggccggcac 3240

aatcacaagc ggctggacat ttggagctgg cgccgctcig cagatcccct ttgctatgca 3300  
gatggcctac cggttcaacg gcatcggagt gaccagaat gtgctgtacg agaaccagaa 3360  
gtgatcgcc aaccagtca acagcgccat cggcaagatc caggacagcc tgagcagcac 3420  
agcaagcgcc ctgggaaagc tgcaaggact ggtaaccag aatgccagg cactgaacac 3480  
cctggtaagc cagctgtcct ccaactcgg cgccatcagc tctgtgtgta acgacatcct 3540  
gagcagactg gacaagggtg aagccgaggt gcagatgag agactgatca ccggaaggt 3600  
gcagtcctg cagacctacg ttaccagca gctgatcaga gccgccgaga ttagagcctc 3660  
tgccaatctg gccgccacca agatgtctga gtgtgtgctg ggccagagca agagagtgga 3720  
ctttcgggc aagggtacc acctgatgag ctccctcag tctcccctc acggcgtggt 3780  
gtttctgac gtgacatac tgcccgtca agagaagaat ttaccaccg ctccagccat 3840  
ctgccagac ggcaagccc actttcctag agaaggcgtg ttcgtgtcca acggcacca 3900  
ttggtcgtg acccagcga acttctacga gccccagatc atcaccaccg acaacacct 3960  
cgtgtctggc aactgcgacg tctgtatcgg cattgtgaac aatacctgt acgacctct 4020  
gcagcccag ctggacagct tcaagagga actggataag tactttaaga accacacaag 4080  
ccccgactg gacctgggcg acatcagcg aatcaatgcc agcgtctga acatccagaa 4140  
agagatgac cggctgaacg aggtggccaa gaatctgaac gagagcctga tcagctgca 4200  
agaactggg aagtagcagc agtatcaaa gtggccctgg tacatctggc tgggcttat 4260  
cggcgactg attgccatg tgatgtcac aatcatcgtg tttgcatga ccagctgctg 4320  
tagctcctg aagggtggt gtatgtggtg cagctgctg aagtcgacg aggcagatc 4380  
tgagccgtg ctcaaggag tcaaatca ttacacataa gatacgcgg ccgctcagat 4440  
ctagataat gatcataat agccataca cattgtaga gttttactt gcttataaa 4500  
acctccaca cctcccctg aacctgaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgtaact 4560  
tgttattgc agctataat gttacaat aaagcaatag catcaaaat ttcacaata 4620  
aagcatttt ttaactgat tctagtgtg gttgtccaa actcatcaat gtatctta 4678  
<210> 5  
<211> 33765  
<212> DNA  
<213> Recombinant human adenovirus serotype 26  
<220>  
<223> Материнская последовательность рекомбинантного аденовируса человека 26  
серотипа, в котором делетированы Е1 и Е3 области, а ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5  
<400> 5  
catcatcaat aatatacccc aaaaagtaaa caaaagtaa tatgcaaatg agctttttaa 60  
tttaacggt ttggggcgg agccaacgct gattggacga gaaacggtga tgcaaatgac 120  
gtcacagcg acggctaacg gtcgcgcgg aggcgtggcc tagcccgaa gcaagtcgcg 180  
gggctgatga cgtataaaaa agcggacttt agaccggaa acggccgatt ttcccggcg 240  
cacgcccgga tatgaggtaa ttctggcgg atgcaagtga aattaggta tttggcgcg 300  
aaaactgaat gaggaagtga aaagcgaaaa ataccggtcc ctcccagggc ggaatatta 360  
ccgagggcgg agagacttg accgattacg tgggggttc gattgcggtg ttttttgcg 420  
gaattccgc gtccgtgta aagtcgggtg ttatgtcac agatcagctg gtttcctta 480  
agatacattg atgagtttg acaaacaca actagaatgc agtgaaaaa atgctttatt 540  
tgtgaaaitt gtgatgctat tgctttatt gtaaccatta taagctgcaa taacaagtt 600  
aacaacaaca attgactca tttatgtt caggttcagg gggaggtgtg ggaggtttt 660  
taaaagcaagt aaaaactcta caaatgtgt atggctgatt atgacagtt atctagatcc 720  
ggtggatcgg atatcttatg tgtaatgtaa ttgactcct ttgagcagcg gctcagaatc 780  
gtcctcgtcg aactgcagc agctgccaca gctacaacag ccctcagcg agctacagca 840  
gctggtcatg caaacagca tgattgtgac catcagatg gcaatcagtc cggcgataaa 900  
gccagccag atgtaccag gccaatgat gtactgctg tactccccca gttctgagc 960  
gtcagcagg ctctcgttca gattctggc cactcgttc agccggtcga tctcttctg 1020  
gatgttcag acgctggcat tgattccgt gatgctgcc aggtccactg cgggctgtg 1080  
gtgttctta aagtacttat ccagttcctc ttgaagctg tcagctcgg gctcagagg 1140  
gtcgtacacg gtattgtca caatgccgat cagcagctcg cagttgccag acacgaaggt 1200

gttgtcggg gtgatgatct ggggtcgtga gaagtccgc tgggtcacga accaatgggt 1260  
 gccgttggac acgaacacgc ctctctagg aaagtgggt ttccgtcgt ggcagatggc 1320  
 tggagcggg gtgaattct tctctgagc ggcacgtat gtcactgca gaacaccac 1380  
 gccgtgaggg gcagactgag ggaagctcat caggtgtag ccttgccgc aaaagtccac 1440  
 tctctgtc tggcccagca cacactcaga catcttggg gcggccagat tggcagaggc 1500  
 tcaatctcg cgggctctga tcagctgctg ggtaacgtag gtctcaggg actgcagcct 1560  
 tccggtgatc agtctgtcga tctgcacct ggctccacc ttgtccagtc tgctcaggat 1620  
 gtcgttcagc acagagctga tggcggcga gttggaggac agctgctga ccagggtgtt 1680  
 cagtgcctgg gcattctgg tgaccacgtc ctgcagctt cccaggggc ttgtgtgct 1740  
 gctcaggctg tcttggatct tggcgtggc gctgttgaac tgggtggcga tcagctctg 1800  
 gtctctgac agcacattc ggtcactcc gatccgttg aaccgtagg ccactctcat 1860  
 agcaaaagg atctgcagag cggcggcagc tccaaatgc cagccgttg tgattgtcc 1920  
 ggccagcagg gcagatgtg actggcgat catctcatc gtcagcagtg gtgcagcac 1980  
 tgcagctcg taaacttct gggcgaatc agatccctg gcggcaatg cggccagaca 2040  
 atccatac tgctgatga agcggcgct ggccagctc actttgtga acagcagtc 2100  
 ggcgtcag ctccgctgc tgggcttct aggatcggc agaactcggc tgaattgaa 2160  
 gccggcaag tcttgatag gaggggtct gtgatctgc ttcactggg cgaacacct 2220  
 ttgggttc ttgtcctgt ccacggcgat cctgtcagg gctctatca gctgggtgca 2280  
 gaagtccg tactgcagca gcaggttga gcactcgtg gaatcggc agatgtacat 2340  
 ggtcagctc acgtgctct tggctatgga cacaggcagg atctctgg tcacgtgat 2400  
 ggtgaagtg gtgggatag cgatagagt gttggatg gccacgtgt tctcggcgc 2460  
 cagagacatt gttaggcaa tgatgctct gctggccaca gatctggccc gctcggggc 2520  
 gttgtctgt gctgtgtag tggcacagat gccagcggc atggggatg cgcactcga 2580  
 gctattgtc acgtgctcg ctccatcag acagccgct ctggtctgaa acacattgct 2640  
 gccgtggag tacaccgcc atgtagggt cagctgatc gcgtgaatg ccacgggcac 2700  
 ttcggtacag ttcacgtct ggtacagcac tgcacctga ttgctggtg tgggtccagg 2760  
 ggtgatcaca gacactccg cgaagctga aggggtgat tccagatit ccagtctct 2820  
 gggatctct acgctgctg tggatcggc aatatccgg ccaactcct ggaatggcag 2880  
 gaactctg ttgtctctg tcagcagcc ggtgccggtc aggccgtga agtgaagt 2940  
 cacgattt ttctcacga gatgggtct ttcttaggg ccgcacact tggcagggc 3000  
 atgcagcag tcgaagctca gcaccaccac tcttagggc tgatagocca gccattgt 3060  
 gggctgaaa ccgtaggact gcagtgga gtagcagtg aagcctcca cggcttaca 3120  
 aggggtgct ccggcctgat agatcctgg gtagatgtcc cgtcgaagg gctcagatt 3180  
 ggactccgg aacagccgg acagtaatt gtagtgcc cgcacttgg agtccaggt 3240  
 gttgtctc caggcaatca cacagccgt gaagtctcg ggcagctgt agttgtagt 3300  
 ggcgatctt cctgtctgtc caggggcaat ctgccact tcatctccc gcatcacgaa 3360  
 gctgtcggc tacacgttg tgaagcacag gtcgttcagc ttgtagggg acacggcga 3420  
 gcacttgaag gtcgtgaag tggcggagt gtacagcac gagtagtcc ccacgaatt 3480  
 gctgatccg tccggttc aggcgtacac agaggcgaat ctggtggcat tgaacacct 3540  
 gccgaaggg cacagattg tgataatgg gaaccgcag atggatcgg tgggtgcac 3600  
 ccggaagtg ctggtctgt agatccctt tccacggt aaggactca ggggtcact 3660  
 tgtctcgtc agaggatcca gagcacaat cacggcgtc gtgatggtc cgttctcgt 3720  
 gtactcagc aggaaggtc taggctcag gtgcccaca tagtaagcg cggcaccagc 3780  
 tgtccatcc ctgctgctat cgcaggtgt caggtagct ctgtcaggg ccagcagtg 3840  
 ctgaaaccg gtgatgtga tggcagggc cagatccacc aggggtcca gagcagagaa 3900  
 gccctgaggc agatcccga caggttgat aggggtgtc ttgctgaga tctgaaagta 3960  
 gccgtgatg ttctgaaca cgaactcgc caggttctg aagttgccct gcttccctc 4020  
 caggtccatc aggaaggct gggacacgta ctcaaggtg cagttgtg cgctcgtga 4080  
 caccggcaac tgccttcca tccagctct gttgtctg tgatagtaga cggcaggaa 4140  
 ggggtcgtg cagaactgga actcgcacac ttgatgacc acgttgggt cgttctcag 4200  
 gatcagcagg ctctgggtct tctgtccag tgtggtccg aagatccag ctctgatgat 4260  
 ttggactc tgggtgctg caaagtacac cccgtctg aaggcagca cgggtgtc 4320

gaatctcttg gtcaccattg tgccggacac gtggatggcg tggaccagg tcactgtct 4380  
 gaagaaaggc aggaacaggt cctgggtaga gtgcagcacg ctggatctga acacctgtc 4440  
 ggggtagtag acgcctctgg taaagctgtt ggttaggct ggaggcagct gggttctgt 4500  
 ggtcagggtt acacactgac tagagactag tggcaataac acaaggaaaca caaacatggt 4560  
 accaagctta ggctcgagcg gccgcgtcga cggfaccaga tctctagcgg atctgacggt 4620  
 tcaataaac agctctgctt atatagacct cccaccgtac acgcctaccg cccatttgcg 4680  
 tcaatggggc ggagtgtta cgacatttg gaaagtcggc ttgattttg tgccaaaaca 4740  
 aactcccatf gacgtcaatg ggggtggagac ttggaatcc cgtgagtca aaccgctac 4800  
 cacgcccatt gatgtactgc caaaaccgca tcaccatggt aatagcgatg actaatacgt 4860  
 agatgtactg ccaagtagga aagtccata aggtcatgta ctgggcataa tgccaggcgg 4920  
 gccatttacc gtcattgac tcaatagggg gcgtacttgg catatgatac acttgatgta 4980  
 agcccaatg ggcagtttac cgtaataact ccaccattg acgtcaatgg aaagtccta 5040  
 ttggcgttac tatgggaaca tacgtcatta ttgactgca tgggcggggc tctgtggcg 5100  
 gtcagccagg cgggcccatt accgtaagtt atgtaaccg gaactccata tatgggctat 5160  
 gaactaatga ccccgaatt gattactatt aacagtgtt aaactatac ctataaaggc 5220  
 agcctgtcta cgagggtctt tttctttc tgacagacat atgaacggga ctggcggggc 5280  
 ctgcaaggg gggctttta gccctattt gacaaccgc ctgcccggat gggccggagt 5340  
 tgcagaatg gtgatgggat cgaccgtgga tgggcgcca gctgtccag caaaitcctc 5400  
 gaccatgacc tacgcgaccg tggggaactc gtcgctgac agcaccgccc gaccgcccgc 5460  
 agccagcagc gccatgacag cgacgagact gcctcagac tacatgcca gcagcggtag 5520  
 tagcccctct gtgccagtt ccatcatcgc cgaggagaaa ctgctggccc tctgtggcca 5580  
 gctggaagcc ctgagcccgc agctggcccgc cctgaccag caggtgtccc agctcccga 5640  
 acagcagcag cagcaaaata aatgattcaa taaacacaga ttctgattca aacagcaaa 5700  
 acctttatt attattttt tcgcgcgagg taggcccagg tccactctc ccatcatg 5760  
 agagtgcggt ggatttttc caggaccgg tagagggtgg attggatgt gaggtacatg 5820  
 gccatgagcc cgtcccgtgg gtaggagtag caccactgca tggcctcgtg ctctggggtc 5880  
 gtgtgtaga tgatccagtc atagcagggc cgtgggctg ggtgctgat gatgtcctt 5940  
 agcgggagac tgatggccac ggggagcccc ttggttagg tttggcaaa acggttagc 6000  
 tgggagggat gcatgcccgg gggatgatg tgcagttgg cctggaact gaggtggcg 6060  
 atgtggccac ccagatcccg ccgggggttc atgtgtgca ggaccaccag aacggttag 6120  
 cccgtgact tggggaactt gtcatgcaac ttggaaggga atgctgga gaaattggag 6180  
 acgcccattg gccgcaccag gtttccatg cactcatca tgatgatgac aatggcccgc 6240  
 tggcctcggc cttggcaaa gacgtttctg ggtcagaga catcgaatt atgctcctg 6300  
 gtgagatcat cataagacat ttaataatg ttggggcaga ggggtcccaga ttgggggacg 6360  
 atggttccct cgggccccgg ggcgaagttc ccctgcaga tctgcatctc ccaggctttc 6420  
 atctcggagg ggggatcat gtccactgc gggcgatga aaaaaaggt ttccggggcg 6480  
 ggggtgatga gctgcagga gagcaggtt ctcaacagct gggacttgc gcaccggtc 6540  
 gggccgtaga tgacccgat gacgggtgc aggtgttagt tcaaggacat gcagctgccg 6600  
 tctcccga gaggggggc cacctcgtg agctgtctc tgacttggag gttttccgg 6660  
 acgagctcgc gaaggaggc gtcgccccc agcagagaaa gctcttgcag ggaagcaaa 6720  
 ttttcaggc gcttgagccc gtcgcccag ggcatttgg cgagggtctg cgagaggagc 6780  
 tccaggcgtt ccagagctc ggtgactgct tctacgcat cctgatccag cagacttct 6840  
 cgtttgggg gttgggaca ctgcgactgt agggcacgag acgatggcg tccagcggc 6900  
 ccagcgtcat gtcctccag ggtctcagg tccgctgag ggtggtctc gtcacggta 6960  
 aggggtggc cgcgggctgg gcgctgcaa ggggtgcctt gagactcctc ctgctggtc 7020  
 tgaacgggc acggtcttc cctgcccgt cggcgagata gcagttgacc atgagctcgt 7080  
 agttgaggc ctgcccggc tggcccctg gcggagctt gcccttggaa gagcggccc 7140  
 aggcgggaca gaggaggat tgcaggcgt agagcttggc cgcgagaaag acgactcgg 7200  
 gggcgaaggc gtcgctccg cagtgggcgc agacggctc gcaactgact agccaggtga 7260  
 gctcggctg ctggggtca aaaaccagt ttccccgtt cttttgatg cgttttac 7320  
 ctccgctct catgagctg tctccgctc cggtgacaaa caggctgtct gttccccgt 7380  
 agacggact gatggcctg tctgcaggc gcgtcccgc gctcctcg tagagaaact 7440

cagaccactc tgagacgaag gcgcgcgtcc acgccaagac aaaggaggcc acgtgcgagg 7500  
 ggtagcggtc gttgtccacc aggggggtcca cctttccac ggtatgcagg cacatgtccc 7560  
 cctctcccgc atccaagaag gtgattggct ttaggtgta ggccacgtga cctggggttc 7620  
 ccgacggggg ggtataaaag ggggcgggtc tgtctcgtc ctaactctc tcccgctgc 7680  
 tgtccacgag cgcacgtgt tgggttaggt attcctctc aagagcgggc atgacctcgg 7740  
 cactcaggtt gtcagttct agaaacgagg aggattgat gtggcctgc cctgccgca 7800  
 tcttttag gagacttca tccatctgt cagaaaagac taitttta ttgtcaagct 7860  
 tggggcgaa ggagccatag agggcgtttg agagaagctt ggcatggat ccatgtgtct 7920  
 gattttgtc acgtcggcg cgctccttgg ccgcatgtt gagctggaca tattcgcgcg 7980  
 cgacacact ccattcgggg aagacggtgg tgcctcgtc ggccacgatc ctgacgcgcc 8040  
 agcccggtt atgcagggtg accagggtcca cgctgggtgg cacctcggcg cgcaggggct 8100  
 acatggcca gcagagtctg ccgccttgc gcgagcagaa cgggggcagc acatcaagca 8160  
 gatctcgtc aggggggtcc gcatcgatgg tgaagatgcc cggacagagt tctttgtaa 8220  
 aataatgat ttttaggat gcatcttca aggccatctg ccaactcgcg cgggccagcg 8280  
 ctgcctcga ggggttagg ggccggacccc aaggcatggg atgctgtagg gccgaggcgt 8340  
 acatggcca gatgtcatag acatagatgg gctccgagag gatccgatg taggtgggat 8400  
 agcagcggc cccgcggatg ctgtcgcga cgtagtcata caactcgtc gagggggcca 8460  
 agaagggcgg gccagattg gtgcctggg gctcctcggc gcggaagacg atctggcga 8520  
 agatggcgtg cgagtggag gagatgttg gccgttgaa gatgtaaag tggcgtgag 8580  
 gcaggcggc cgagtgcgg atgaagtgcg cgtaggagtc ttgcatgtg gcgacgagct 8640  
 cggcgggtgac gaggacgtcc atggcgcagt agtccagctt ttcgggatg atgtcatac 8700  
 tgcctctcc tttctctcc cacagctgc ggttagggc gtattctc tcatctctcc 8760  
 agtactccc gagcgggaat cctcgtatct ccgacggta agagcccagc atgagaat 8820  
 ggtcacggc ctttaggga cagcagcct tctccacgg gagggcgtaa ctttagcgg 8880  
 ccttgcggag cgaggtgtc gtcaggcga aggttccct gacctgact tcaagaact 8940  
 ggtactgaa gtccgagtcg tcgacggc cgtgctcca gactcgaat tgggtcgtc 9000  
 tcttcgagag ggggttagg agagcgaag tgactcatt gaagagaat ttgctgcc 9060  
 cggcgtgaa attcgggtg atgcgaaag ggcccggac ggagcctcg ttgtgatga 9120  
 cctggcggc gaggcagtc tctcaaaag cgtgatgtt gtcccagc atgtagatg 9180  
 ccatgaatc cggcggcct ttgatgtgc gcagcttct gagctcctc taggtgaggt 9240  
 cctcggggca ttgagccg tctgctcga gcgccactc ctggagatg ggggtgctt 9300  
 gcatgaagg agcccagagc tcgcccggca tgagggtct gagctcctc cgaagaggc 9360  
 gaaactcgt gccacggcc atctttctg ggtgacgca gtagaagtg aggggtccc 9420  
 gctccagc atcccagcgt aaacgcacg gcagatcgc agcagggcg accagctctg 9480  
 gttcccgg gaattcatg accagcatg aggggacgag ctcttccc aaggaccaca 9540  
 tccaggtga ggttctaca tcttaggtga caaagagcc ctcgtgcga gtagagagc 9600  
 cgattggaa gaactggatt tctgccacc agttggacga gtggctgtt atgtatgaa 9660  
 agtagaact ccgcccgca accgagcact cgtctgatg ctgtaaaag cgtccgact 9720  
 actcagcgc ctgcacggc tgtacctat ccacgagata cacagcgcgt ccctgagga 9780  
 ggaactcag gattggcgg cctggctgtt gttttcatg ttcgctgcg tgggactcac 9840  
 cctggggctc ctgaggacg gagaggctga cgagcccgc cgggagccag gtccagatct 9900  
 cggcggcggc gggcgggaga gcgaagacga gggcgcgcag ttggagctg tccatggtg 9960  
 cgcggagatc caggctcgg gcaggggtt tgagggtgac ctctagagc cgggtgagg 10020  
 cgtgctgag atgcagatg tacttgatt ctacgggtga gttggtgtc gtgtccagc 10080  
 attcatgag cccgtagctg cgcggggcca cgaccgtgc gcggtcgtc tttagaagc 10140  
 gttcgcgga cgcctccc gcggcagcgg cgtttcggc cccgcggca gggcggcag 10200  
 aggcacgtc gcgtggcct cgggacggc ccggtcctgc gccctgagag cgtggcgtg 10260  
 cgcgacgag cggcgggtga catcctgat ctcccctc tgcgtgaa cccagggccc 10320  
 cgtactttg aacctgaaag acagttcaac agaatcaat tctcgtcat tgacggcgc 10380  
 ctgacgagg atctttgca cgtcggcga gttctctg taggcgatc cggacatgaa 10440  
 ctgtgatc tctctctc ggagatcgc cggcccgcg cgtccacgg tggcggcag 10500  
 gctattggag atgcgacca tgactcga gaaggcgc aggcctctc cgttcagac 10560

gcggctgtag accacgtccc cgtcggcgtc gcgcgcgcgc atgaccacct gcgcgaggtt 10620  
 gagctccacg tgcgcgcgcaa agacggcgtg gttgcgcagg cgctggaaga ggtagttgag 10680  
 ggtggtggcg atgtgctcgg tgacgaagaa gtacatgac cagcggcgca ggggcatctc 10740  
 gctgatgicg ccgatggctt ccagccttc catggcctcg tagaagtcca cggcgaagt 10800  
 gaaaaactgg gcgttcgggg ccgagaccgt gagctcgtct tccaggagcc ggatgagttc 10860  
 ggcgatggtg gcgcgcacct cgcgctcga atccccgggg gcctcctct ctctctctc 10920  
 ttcatgacg acctctctt ctattctc ctctgggggc ggtggtggtg gcggggggcc 10980  
 acgacgacgg cgacgcaccg ggagacggtc gacgaagcgc tcgatcatct ccccgcggcg 11040  
 gcgacgcatg gtttcggtga cggcgcgacc ccgttcgca ggacgcagc tgaagacgcc 11100  
 gccggctatc tcccggtaat ggggcggggtc cccattgggc agcgaatagg cgctgacgat 11160  
 gcatcttacc aattgcggtg taggggacgt gagcgcgtcg agatgcacc gatcggagaa 11220  
 tctttcagg aaagcgtcta gccaatcga gtcgaaggt aagctcaaac acgtagcagc 11280  
 cctcgggacg ctgttagaat tgcgggtgct gatgatgaa tgaagtagg cgttttgag 11340  
 gcggcgatg gttggcgagga ggaccaggtc ctgggtcca gcttctgga tgcggagccg 11400  
 ctgggcatg cccagggcct ggccctgaca ccggctcagg tcttctagt agtcatgat 11460  
 gcgacctca atgtcatcac tggctgaggc ggagtctcc atcggggtga ccccacgcc 11520  
 cctgagcggc tgcacgagc ccaggtcggc gacgacgcgc tcggcgagga tggcctgttg 11580  
 caccgggtg aggggttctt ggaagtctc catctcagc aagcgggtgat agggcccggt 11640  
 gttgatgtg taggtgcatg tggccatgag cgaccagttg acggctgca ggcttggctg 11700  
 cagcaccctg gactaccta gccgcgagaa ggccgcgag tcgaagacgt agtctgtgca 11760  
 ggtgcgcagc aggtactggt atccgactag gaagtgcggc ggccgctggc ggtagagcgg 11820  
 ccagcctgg gttgcccggc gcccccgggc caggctcctc agcatgaggc ggtgtagacc 11880  
 gtagaggtag cgggacatcc aggtgatgac ggccgctggc gtaggggac gcgggaaact 11940  
 gccgggtgaga cgcgcgagc cattgacgct ctgagggcaa aaacgaaagc ggttagcggc 12000  
 gcttctctc cgtacgctgg ccgaacgcaa acgggttagg ccgctgtgtg accccggctc 12120  
 gactccctc gaatcaggt ggagccgca ctaactgtgt atggcactc ccgtctgac 12180  
 ccgagccctg tagccgaccg gatacggcgg agagccctt tigtggccg aggggggctg 12240  
 ctgacttga aagcagcca aaaccctgcc gggtagtggc tcgcgccctg agtctggaga 12300  
 agcatgccca ggggtgagc gcggcagaac ccggttcgag gacggccgcg gcgagcggga 12360  
 ctgtgacc ccggcgaat aaagaccac agccagcca ctctccagt tacgggagc 12420  
 agccccctt ttcttttg ccagatgat cccgtcctg gccaaatgc tcccacccc 12480  
 ccggcgacca ccgcgaccg gcccgtagca gcgcggcgcg ctgaccagcc accacagca 12540  
 gagatgact tgaagaggc cgaaggcctg gcaagactgg gggcgccgtc cccggagcga 12600  
 catccccgc tgcagctgca gaaggacgtg cccccgctg actgctctac gcagaacctg 12660  
 ttcaggacc gcagcgggga gagaccggag gagatgcgcg actgcccgtt tggggggcg 12720  
 agggagctgc gcgagggcct ggaccgcca cgcgtgctg gcgacgagga ttctgagccg 12780  
 aacgagcaga cgggatcag cccgcacgc gcgcacgtgg cggcagcga cctggtgacg 12840  
 gcctacgagc agacggtgaa gcaggagcgc aactccaaa agagttica caaccacgtg 12900  
 cgcacctga tcgcgcgca ggaggtggcc ctgggctga tgcacctgtg ggacctggcg 12960  
 gaggccatg tgcagaacc ggacagcaag cctctgacgg cgcagctgtt cctggtggtg 13020  
 cagcacagca gggacaacga ggcgttcagg gagcgcctg tgaacatgc cgagcccag 13080  
 ggtcgtggc tgcgtgagct gattaacatc tgcagagca tctagtga ggagcgcagc 13140  
 ctgagcctg ccgagaaggt ggccgctac aactactgg tctgagcct ggccaagttt 13200  
 tacgcgca agatttaca gacgccgtac gtgccatag acaaggaggt gaagatagac 13260  
 agctttaca tgcgatgac gctcaaggtg ctgacgctga gcgacgacct gggcgtgtac 13320  
 cgcaacgacc gcatccaca gcccggtgagc acgagccggc ggccgcagct aagcgaccgc 13380  
 gagctgatg tgagtctgc cggggcgtg gtagggggcg ccgccggcg cgaggatcc 13440  
 tactcgaca tgggtgcgga cctgalttg cagccgagcc ggccgcctt ggaggccgcc 13500  
 tacggttac aggacttga taggaagag gaagaggagc aggatgacc cgctcgggg 13560  
 tactgagcc tccgtgatg gttttatg gtcccagca gccccgacc ccgccaag 13620  
 ggcggcgtg caaagccagc cgtccgctt agcatggac gactgggagc ccgcgatga 13680



acgcatcatg gccctgacga cccgcaacc cagctcctt agacaacagc cgcaggccaa 13740  
 cagactctcg gccatctgg aggcgggtgt cccctctcgg accaaccaca cgcacgagaa 13800  
 ggtgctggcg atcgtgaacg cgtggcgga gaacaaggcc atcctgccg acgaggccgg 13860  
 gctggtgtac aagccctgc tggagcgcgt gggccctac aacagcacga acgtgcagtc 13920  
 caactgtagt cggctggtga cggacgtcgc cgaaggcgtg gcgacgcgc agcggttcaa 13980  
 gaacgagggc ctgggctcgc tgggtgcgct gaacgcctc ctggcaacgc agccggcgaa 14040  
 cgtgcccgcg gggcaggacg attacaccaa cttatcagc gcctgcggc tgatggtgac 14100  
 cgaggtgcc cagagcgagg tgtaccagtc tggcccggac tactttcc agacgagccg 14160  
 gcagggttg cagacgtga acctgagcca ggcttcaag aatctgcgc ggtgtgggg 14220  
 cgtgagggcg cccgtggcg accggtcaac ggtgagcagc ttgtgacgc ccaactcgcg 14280  
 cgtgctcgt ctgctgatc gcctctac gcacagcgc agcgtgaacc gcaactcgt 14340  
 ctggggccat ctgctgacgc tgtaccgga gccataggg caggcgcagg tggacgagca 14400  
 gacctccag gagatcacta gcgtgagccg cgcgctgggg cagaacgaca ccgacagtct 14460  
 gaggggccacc ctgaacttt tctgaccaa tagacagcag aagatcccgc cgcagtagc 14520  
 actgtcggc gaggaggaaa ggattctgag atatgtcag cagagcgtag ggtgttct 14580  
 gatgagggc ggtgccccc ccagcgcgc gctggacatg accgcgcga acatggaacc 14640  
 tagatgtac gccgccaacc ggccgtcat caataagctg atggactact tgcaccgcgc 14700  
 gggggccatg aacacggact acttaccaca gcctatcctg aaccgcact ggtcccgc 14760  
 cgcggggtc tacacggcg agtacacat cccgacccc aacgacgggt tctgtggga 14820  
 gcacgtgac agcgcgtgt tctcccgc cttcaaaag cgcagaggag cccgcccag 14880  
 cgaaggcgcg gtggggagga gcccttcc tagctaggg agttgcata gcttggcg 14940  
 ctggtgaac agcgcaggg tgagccggcc gccttctg gcgagggagc agtacctgaa 15000  
 cgaactcgt ctgacggcg cgcgggcaa gaaccatg gccataac ggatagagag 15060  
 tctgtggac aaactgaacc gctggaagc ctacgctcag gaccatagg acgcggccg 15120  
 gccggcgga cagcggcag accggcagc gggcctggtg tggacgacg aggactcggc 15180  
 cgacgatagc agcgtgttg acttggcggc gagcgtgggg gtcaaccctg tccgcatct 15240  
 gcagccaaa ctggggcgcg gtagtgttg aatgaataa aactaccaa gccatagcg 15300  
 tgcctctc tctgttag agatgagcg cgcggtggtg tctctctc ctctccct 15360  
 gtacgagagc gtagtggcg aggcgacct ggaggtccg ttgtgcctc cgcggtat 15420  
 ggctctacg gagggcagaa acagcattc tctcggag ctgctccgc agtacgacac 15480  
 cactcgtg tacttggtg acaacaagc ggcgacatc gttcctga actacaaaa 15540  
 cgaccacag aactcctga ccacggtgt gcagaacaac gatttacc ccggcggc 15600  
 cagcagcag acgataaatt ttgacgagc gtcggttg ggcggtgac tgaagacct 15660  
 tctgacact aacatccca atgtgaacga gtacatgac accagcaag ttaaggcgcg 15720  
 ggtgatggt tctaggaagc atccagagg gtagttaa acagattga gtcaggataa 15780  
 gcttgaatg gtagtgttg agttaccct gcccgaggga aactttcc agaccatgac 15840  
 catagacct atgaacaac ccatctgga aaactactg caagtgggc ggcagaatg 15900  
 cgtgctggag agcगतatc gtagcaagt ttacagcaga aattcaagc tggcctggga 15960  
 cccggtgacc aagctggtga tggcgggt ctacacctc gaggcctcc accggacgt 16020  
 ggtgctcgt ccggcctgc ggtggtact caccgagagc gcctgagca acctcctgg 16080  
 cattcgaag aagcaactt tcaagaggc ctcagaatc atgtatagg atctagaagg 16140  
 tggcaaatc cccgccctc ttgatgtcc caagtactg gaaagcaaga agaaagtga 16200  
 agcgaact aaaaatgcag ctgcggccac agccgataca accactaggc gtgatacatt 16260  
 tgcaactcca cgcgaagaga cagcagctga taagaagga gaagtctgc ccattgaaaa 16320  
 gtagtagagt gtagaagt acaactgat ccaggggacc cagcacgc tgtaccgag 16380  
 ttggtactc tctatacct acggggacc cgagaagggt gtgcagctg ggacgtgct 16440  
 caccacccc gacgttacct gcggcggga gcaagtctc tggctactgc cggacctcat 16500  
 gaaagcccc gtcacctcc gctccacca gcaagtcagc aactacccc tggcggcg 16560  
 cgagctcat cctccgcg ccaagagct ttacaacgac ctgccgtct actccagct 16620  
 catccgagc tacacctcc taccacagt ctcaaccg tccccgaca accagatcct 16680  
 ctgcccgcg cccgcgcca ccatcacc gcctagtaa aactgctc ctctcacaga 16740  
 tcacgggac ctaccgctgc gcagcagat cgcggagtc cagcagtgca ccgtactga 16800

cgcccgtcgc cgcacctgtc cctactgcta caaggccctg ggcatagtcg cgccgcgct 16860  
 gctttccagt cgcaccttct aaaaaatgt ctattctcat ctgcccage aataacaccg 16920  
 gctggggctc tactagacc agcaccatgt acggaggagc caagaagcgc tcccagcagc 16980  
 accccgccg cgtcgcggc cacttccgcg ctccctgggg cggttacaag cgcgggocga 17040  
 ctccaccgc cgtcgcacc accgtcagc acgtcatcga ctgggtgctc gccagcgcgc 17100  
 gaaactaac tcccggccc tccaccgtg acgcggtcat cgacagcgtg gtggcogacg 17160  
 cgcgcgacta tgcagacgc aagagccggc ggcgacggat cgccaggcgc caccggagca 17220  
 cgcccgccat gcgcccgc cgggctctgc tgcgccgcg cagacgcacg ggcccgggg 17280  
 catgatgctg agccgcgcgc cgcgctgcca ctgcaccac ccccagaggc aggactcgca 17340  
 gagagcggc cgccgcgcgc gctgcggcca tcttagcat gaccagacc aggcgcggaa 17400  
 acgtgtactg ggtcgcgac tccgtcacgg gcgtgcgct gcccgtcgc accctctc 17460  
 ctgctcctg atctaagtgt tgtctctcc ccgcaagcg acgatgcaa agcgcaaat 17520  
 caaggaggag atctccagg tctgcgccc ggagattac ggaccacc ccaggcgaca 17580  
 gaaacccgc aaaaatcagc gggtaaaaa aaaggatgag gtggacgagc gggcagtaga 17640  
 gttgtgcgc gactcgcctc cgcggcggc cgtaaattgg aaggggcga ggtgcagcg 17700  
 cgtgttcgg cccggcagcg cgtgtgtgtt cagccccgc gagcgtctct cgtcaggag 17760  
 caagcgtagc tatgacgagc tgtacggcga cgacacatc ctggaccagg cggcggagcg 17820  
 ggccggggag ttcgctacg ggaagcggc gcgcgaagag gagctgatc cgtgccct 17880  
 ggcgtaaac aaccacacgc cgagcctgaa gccctgacc ctgcagcagg tctgcccc 17940  
 ggcggtgctg ctccgagcc gcggggtcaa gcgcgagggc gagagcatgt acccgacct 18000  
 gcagatcatg gtcccagc gccggcgcgt ggaggacgtg ctggaccacc tgaatatgga 18060  
 tgtggagcc gaggtcaagg tgcgccccat caagcaggtg gcgcggggc tggcgtgca 18120  
 aaccgtgac atcagatcc ccaccagat gtagtctgac aaaaaacct cgaccagat 18180  
 caggtgcaa accgaccct ggtccccgc ctccaccgt accgtctca ctctaccgc 18240  
 cgccagcct accgaccc caggaggcg aagatggggc gccccagcc ggtgatgct 18300  
 caactcgtg ttcctcct ccatcatccc gacgcccggc taccggcga cccggtacta 18360  
 cgccagcgc cggcggccag ccagcaaac ccgcccgc accgcccgc gccgctct 18420  
 ggccccgc cgcgtgcgc cgtgaccac gcgcccgggc cgtcgtctg tctccccac 18480  
 cgtgcctac caccagca tctttaatt cgtgtgctg gatactgtg cagagagatg 18540  
 gctctactt gccccctgc catccccgc cgaattacc gaggaagatc ccgcccagc 18600  
 agaggcatg caggcagcg cctgaaccgc gcgcccggc gggccatgc caggcgcctg 18660  
 agtgccgct tctgcccc gctcatccc ataatccc cggccattgg cagatccc 18720  
 ggcatagct cgttgcgt gcaggcgtc cagcggctt gatgtcgaa taaacctct 18780  
 ttgactctg acacacctg tctgtatat tttagaatg gaagacatca atttgcctc 18840  
 cctggctcc cgccagcga cgcggcgtt catggcacc tggaaagaga tggcaccag 18900  
 ccagctgaac gggggcgcct tcaattggag cagtgtctg agcgggcta aaaattcgg 18960  
 ctgcagctc cggacctat ggaacaaggc ctggaatgt agcacgggc agttgtaag 19020  
 gaaaaagctc aaagacaaa actccagca gaagggtgtg gacgggctg cctcggcct 19080  
 taacgggtg gtggacatc cgaaccaggc cgtgcagcgc gagataaca gccgctgga 19140  
 ccgcccggc cccacgggtg tggagatgga agatgcaact ctccggcc ccaaggcga 19200  
 aaagcggcc cgcccagc cggaggagac gatcctgcag gtggacgagc cgcctccta 19260  
 cgaggaggcc gtaaggccg gcatgcccac cagcgcgac atcgccgcgc tggccacggg 19320  
 tgtaatgaaa cccgccacc ttgacctgccc tccaccacc gcgcccctc caccgaaggc 19380  
 aactcgggt gtgcaggccc cccgggtggc gaccgctg cggcgctcc ccgcccggc 19440  
 ccaggcccag aactggcaga gcacgctgca cagtatcgt ggccctgggag tgaagtct 19500  
 gaagcggc cgtatctatt gagagagagg aaaggagaca ctaaaggag agcttaact 19560  
 gtatgtgct taccgcca gaacgcgga agatggccc cccctgatg atccgcagt 19620  
 ggcgctacat gcacatgcc gggcaggacg cctcggagta cctagccc ggctgtgtc 19680  
 agtttccc cgccaccgac acgtactca gcctggcga caagttagg aaccacgg 19740  
 tggcccgc ccacgatgt accacggacc ggtcccagc tctgacgct cgcttctg 19800  
 ccgtggatc cgaggacacc acgtactgt acaaggcgc ctactctg gccgtggcg 19860  
 acaaccgggt gtagacatg gccagcactt actttgacat ccgcccgc ctggaccgc 19920

gtccagctt caaacctac tcgggcacgg cctacaacag cctggctccc aaggggtccc 19980  
 ccaatccagc tcagtgggaa acaaaagaaa agcaaggaa tactggagga gtgcagcaag 20040  
 aaaaagatgt cacaaaaa tttggtgtgg ctgccaccgg cggaattaat ataacaacc 20100  
 agggtctgtt actaggaact gacgaaaccg ctgagaatgg caaaaaagc atttatgcag 20160  
 acaagacttt ccagccagaa cctcaagttg gagaagaaaa ctggcaggaa aatgaagcct 20220  
 tctatggagg aagggctctt aaaaaggaca ctaaatgaa accatgctat ggatcttttg 20280  
 ctagacctac taatgagaaa ggaggctcagg caaagtcaa accagttat gaaggagaac 20340  
 aacctaaaga tctggatata gattttgctt actttgacgt cctggcggga agtcctccag 20400  
 caggtggtag tggggaagaa tacaagcag atataatit gtacactgaa aatgtaac 20460  
 ttgaaacacc agacactcat gtggtttaca agccaggaaac tttagataac agttcagaaa 20520  
 tcaatctggt tcagcagtc atgccaaca gaccacaact caittgcttt agggacaact 20580  
 tttagtct catgtattac aacagcaccg gaaataggg tgtgctggct ggtaggctt 20640  
 ctcaattgaa cgctgtggtc gactgcaag acagaaacac cgagttaict taccagctat 20700  
 tgctagatic tctgggtgac agaaccagat acttagcat gtggaactct gcggtggaca 20760  
 gttacagatc agatgtcagg atcattgaaa atcacggtgt ggaagatgaa cttccaact 20820  
 attgctccc attgaatggc actggaacca attcactta tcaaggtgta aagattaca 20880  
 atggtaatga tgggtctgaa gaaagttagt gggagaaaga cgatgcaatt tctagacaaa 20940  
 accaaatctg caaggcfaat gtctacgcca tggagatcaa cctgcaggcc aacctgtgga 21000  
 agagttttct gtactgaaac gtggccctgt acctgcccga ctctacaag tacacgcccg 21060  
 ccaactgcaa gctgcccggc aacaccaaca cctacagta catgaacggc gcgtggttag 21120  
 cccctccct ggtggacgcc tacatcaaca tcggcgcccg ctggtcgttg gaccctatgg 21180  
 acaactgcaa cccctcaac caccaccgca atgcccggct gcgctaccgc tccatgtg 21240  
 tgggcaacgg ccgctactgt ccttccaca tcaagtgc ccaaaagtc ttgcatca 21300  
 agaactgct cctgctcccg ggctcctaca cctacagtg gaactccg aaggacgta 21360  
 acatgatct gcagagtcc ctgcgaacg acctgcgct gcagggccc tccgtccct 21420  
 tcgacagct caactatac gccactttct tcccattggc gcacaacac cttcaacct 21480  
 tggagccat gctgcgcaac gacaccaacg accagtctt caacgactac ctctggccc 21540  
 ccaactgct ctaccatc ccggccaagg ccaccaactg gccatctcc atccatcgc 21600  
 gcaactgggc gccttccc ggctggagt tcaccggct caagaccaag gaaactcct 21660  
 ccctcggctc gggttcgac ccctacttg tctactggg ctccatccc tacctcagc 21720  
 ggacttcta ctcaaacac acctcaaga aggtctcat catgtcgac tctcgtgta 21780  
 gctggcccgg caacgaccg ctgctcagc cgaacgagt cgagatcaag gcgagcgtc 21840  
 acggggaggc ctacaactg gcccaatgca acatgacaa ggactggtc ctgctcaga 21900  
 tgctctcca ctacaacatc ggctaccagg gcttccact gcccaggggc tacaaggacc 21960  
 gcatgtact ctcttccgc aactccagc ccatgagcag gcaggtggtc gatgagatca 22020  
 actacaagga ctacaaggc gtaccctgc ccttccagca caataactc ggctcaccg 22080  
 gctactcgc acccaccatg ccggaggggc agccctacc gcccaactc cctaccgcc 22140  
 tcatcgtgca gacagccgtc cctccgtca cccagaaaaa gttctctgc gacagggtca 22200  
 tftggcgcat cccattcgc agcaactca tctcatggg gcctccacc gactgggtc 22260  
 agaactgct ctaccgcaac tcggcccag cgtctgacat gacctgagc gtggaccca 22320  
 ttgatgacc caccctcctc tatctctct tgaagtttt cgactggct agagtacac 22380  
 agccgacccg cggcgtcatc gaggcgtct acctcgcac gccctctcc gccggcaac 22440  
 ccaccacta agcatgagc gctccagca acgagagctc gcggccatc tgcgcgacct 22500  
 gggctgggg cctacttt tgggcaacca cgacaagcgc ttcccgggtc ttctcccgg 22560  
 cgacaagctg gctcgcgca tctcaaac ggcccggccg gagaccggag gcgtgactg 22620  
 gctcgcctc ggctggaacc cgcctcgcg cactgctac atgtcgacc ctttgggt 22680  
 ctggaccgc cggtcaagc agattacag ctctgagtc gaggccatc tgcggccag 22740  
 cgcctggcc tctcggccg accgctgtc cagcctcag cagtcactc agaccgtgca 22800  
 gggcccagc tccgcccct cgggactct ctgtgcatg ttctgcatg cctctgtgca 22860  
 ctggcccagc cgaccatg acggaaccc caccatgaa ttgctgacgg ggggtccca 22920  
 cggcatgcta caatgccac aggtgctgcc caccctcag cgcaaccagg aggaactcta 22980  
 ccgttctc gcgcccact cccctactt tctctccac gcgcccga tcgaacacg 23040

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

2. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

3. Фармацевтическое средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

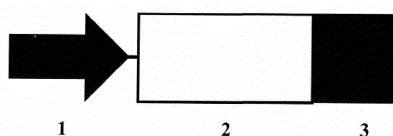
4. Фармацевтическое средство по пп.1-3, отличающееся тем, что оно находится в жидкой или лиофилизированной форме.

5. Фармацевтическое средство по п.4, отличающееся тем, что буферный раствор для жидкой формы содержит, мас. %: трис от 0,1831 до 0,3432, хлорид натрия от 0,3313 до 0,6212, сахароза от 3,7821 до 7,0915, магния хлорида гексагидрат от 0,0154 до 0,0289, ЭДТА от 0,0029 до 0,0054, полисорбат-80 от 0,0378 до 0,0709, этанол 95% от 0,0004 до 0,0007, вода - остальное.

6. Фармацевтическое средство по п.4, отличающееся тем, что буферный раствор для лиофилизированной формы содержит, мас. %: трис от 0,0180 до 0,0338, хлорид натрия от 0,1044 до 0,1957, сахароза от 5,4688 до 10,2539, магния хлорида гексагидрат от 0,0015 до 0,0028, ЭДТА от 0,0003 до 0,0005, полисорбат-80 от 0,0037 до 0,0070, вода - остальное.

7. Фармацевтическое средство по пп.1-3, отличающееся тем, что компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках.

8. Применение фармацевтического средства по пп.1, 2 или 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, включающее использование компонента 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели.



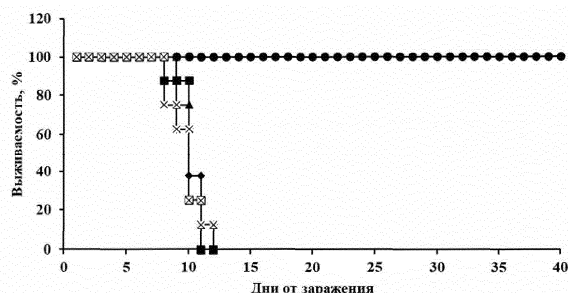
Фиг. 1



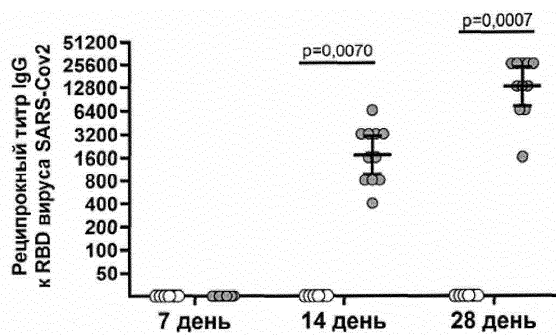
Фиг. 2



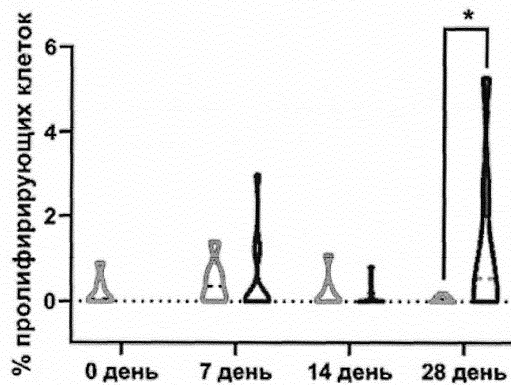
Фиг. 3



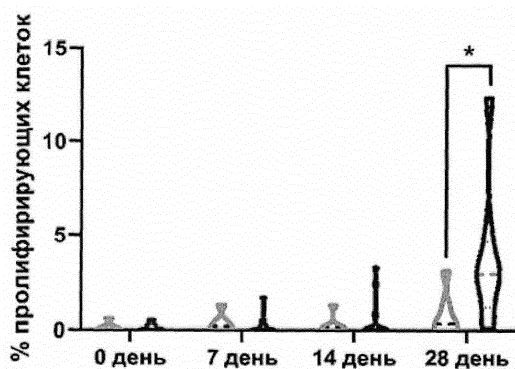
Фиг. 4



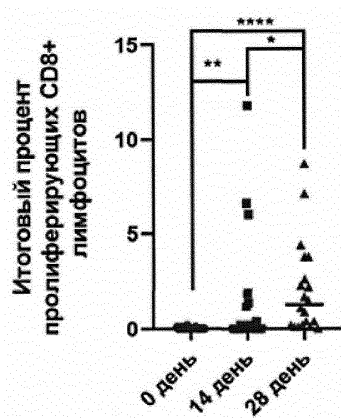
Фиг. 5



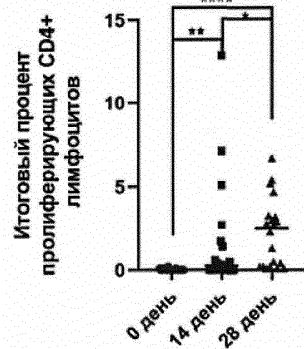
Фиг. 6



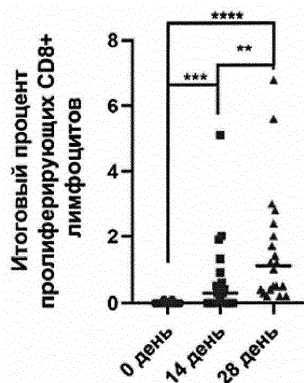
Фиг. 7



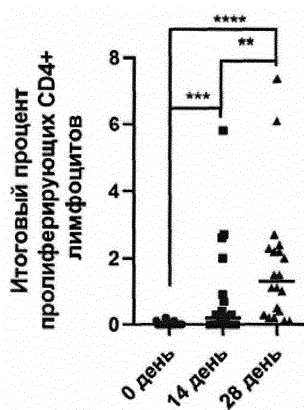
Фиг. 8



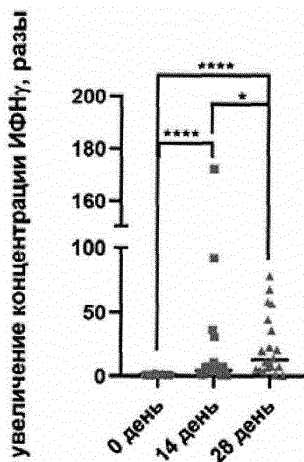
Фиг. 9



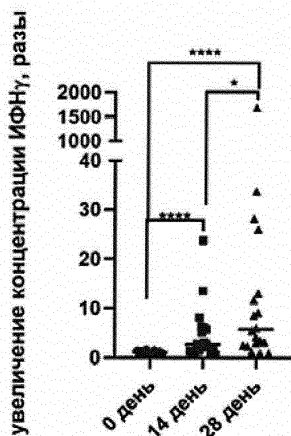
Фиг. 10



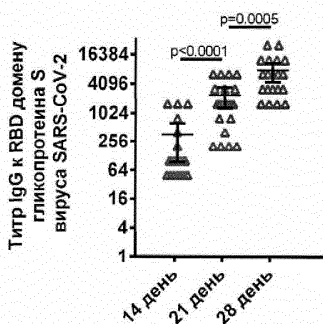
Фиг. 11



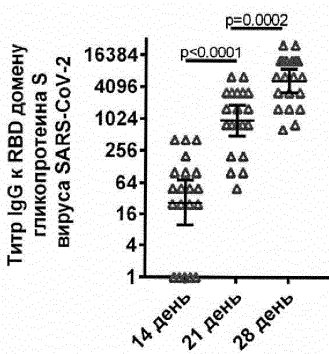
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15