(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190786 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.27

(22) Дата подачи заявки
2021.02.12

(51) Int. Cl. ***A61K 35/76*** (2015.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

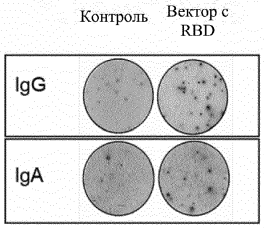
(31) **62/977,078; 62/992,553; 63/005,923; 63/016,902; 63/050,844; 63/069,792; 63/088,736; 63/140,128; 63/142,077; 63/148,374**
(32) **2020.02.14; 2020.03.20; 2020.04.06; 2020.04.28; 2020.07.12; 2020.08.05; 2020.10.07; 2021.01.21; 2021.01.27; 2021.02.11**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/017920**
(87) **WO 2021/163536 2021.08.19**
(88) **2021.10.21**

(71) Заявитель:
АЛТИММУН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Джорджес Бертранд Виктор Гилберт (GB), Робертс М. Скот (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В., Парамонова К.В., Джермакян Р.В., Христофоров А.А., Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Изобретение относится к иммуногенным соединениям, фармацевтическим составам с ними и к их применению для индукции у млекопитающего защитного иммунного ответа против инфицирования новым коронавирусом 2019 года (SARS-CoV-2) и его вариантами.



202190786 A1

202190786 A1

ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Описание

Родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/977078, поданной 14 февраля 2020 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/992553, поданной 20 марта 2020 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/005923, поданной 6 апреля 2020 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/016902, поданной 28 апреля 2020 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/050844, поданной 12 июля 2020 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/069792, поданной 05 августа 2020 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/088736, поданной 07 октября 2020 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/140128, поданной 21 января 2021 года; предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/142077, поданной 27 января 2021 года; и по предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/148374, поданной 11 февраля 2021 года, каждая из которых таким образом включена в данную заявку во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был предоставлен в электронной форме в формате ASCII с помощью EFS-Web и который таким образом включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 11 февраля 2021 года, имеет название ALT2029PCT_ST25.TXT и размер 471040 байтов.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0003] Настоящая заявка, в целом, относится к фармацевтическому составу с доставляемым в векторе на основе аденовируса антигеном коронавируса для введения субъекту-млекопитающему, который индуцирует иммунный ответ у субъекта и, необязательно, обеспечивает защиту от нового коронавируса 2019 года (SARS-CoV-2).

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0004] Коронавирусы представляют собой разнообразую группу крупных, имеющих оболочку и содержащих плюс-цепь РНК (ss RNA) вирусов, которые вызывают респираторные и кишечные заболевания у людей и других животных. Например, коронавирусы человека 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), NL63 и HKU1 являются эндемическими в человеческой популяции и вызывают вплоть до 30% от общего числа случаев простуды. Коронавирусы животных (например, вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGEV), вирус гепатита мышей (MHV) и вирус инфекционного бронхита птиц (IBV)) вызывают респираторное, желудочно-кишечное, неврологическое заболевание или заболевание печени у своих соответствующих хозяев.

[0005] Коронавирус имеет геном из положительно-полярной несегментированной однонитевой РНК, которая кодирует по меньшей мере 18 вирусных белков (таких как неструктурные белки (NSP) 1-13, структурные белки E, M, N, S и РНК-зависимая РНК-полимераза). Коронавирус имеет три основных поверхностных гликопротеина (обозначаемых S, E и M), а некоторые коронавирусы имеют другой поверхностный гликопротеин, называемый гемагглютинин-эстеразой (HE), кроме того, N (нуклеокапсидный) белок представляет собой основный фосфопротеин, который обычно ассоциирован с геномом и, как сообщалось, является антигенным (Holmes and Lai, Fields Virology, Chapter 34, 1996). S (спайк (spike)) белок, основной антиген коронавируса, имеет два домена: Sl, который, как полагают, вовлечен в связывание с рецептором, и S2, который, как полагают, опосредует слияние мембран между вирусом и клеткой-мишенью (Holmes and Lai, 1996, выше).

[0006] S (спайк) белок может образовывать нековалентно связанные гомотримеры (олигомеры), которые могут опосредовать связывание с рецептором и инфекционность вируса. Гомотримеры S-белков, вероятно, необходимы для обеспечения правильной нативной конформации рецептор-связывающих доменов и для того, чтобы вызвать реакцию с образованием нейтрализующих антител. Кроме того, внутриклеточный процессинг S-белка связан со значительной посттрансляционной модификацией олигосахаридами. Посттрансляционная модификация олигосахаридами (гликозилирование), ожидаемая на основании анализа N-гликановых мотивов, указывает на то, что S-белок имеет не менее 23 сайтов для такой модификации. Кроме того, C-концевые цистеиновые остатки также могут принимать участие в свертывании белка и сохранении нативной (функциональной) конформации S-белка. S-белок некоторых коронавирусов может подвергаться протеолитической обработке вблизи центра S-белка под действием трипсиноподобной

протеазы в аппарате Гольджи или внеклеточно локализованных ферментов с образованием связанного полипептида, содержащего N-концевой полипептид Sl и С-концевой полипептид S2. В настоящее время коронавирусы подразделяют на α-род, β-род (например, MERS, SARS, SARS-CoV-2) и γ-род. *См.* **фиг. 14**.

[0007] Инфицирование коронавирусом осуществляется посредством слияния липидного бислоя вирусной оболочки с мембранами клетки-хозяина. Слияние мембран опосредуется вирусным спайк (S) гликопротеином на вирусной оболочке. S-гликопротеин синтезируется в виде предшественника размером около 180 кДа, который олигомеризуется в эндоплазматическом ретикулуме и встраивается в отпочковывающиеся вирионы в компартменте, расположенном перед аппаратом Гольджи. S1 содержит рецептор-связывающий сайт и, следовательно, вносит вклад в определение круга хозяев вируса. S2 представляет собой трансмембранную субъединицу, которая вносит вклад в опосредование слияния между вирусной и клеточной мембранами. S2 содержит два домена с 4,3-гидрофобными повторами (HR), которые согласно прогнозу образуют суперспиральные структуры. Эти участки обозначены HR-1 и HR-2, и они разделены промежуточным отрезком из аминокислотных остатков, называемым межспиральным доменом. Эти суперспиральные участки могут играть важную роль в определении олигомерной структуры спайк-белка в его нативном состоянии и его фузогенной способности.

[0008] Новый коронавирус SARS-CoV-2 (первоначально описанный как 2019-nCoV и официально названный SARS-CoV-2 группой по изучению коронавирусов (Coronavirus Study Group) (рабочая группа Международного комитета по таксономии вирусов) на основании филогенетики, таксономии и установившейся практики (BioRxiv; doi.org/10.1101/2020.02.07.937862)) представляет собой новый штамм, который ранее не выявлялся у людей, и о котором впервые сообщили в Ухане, провинция Хубэй, Китай. SARS-CoV-2 является причиной произошедшей вспышки коронавируса в Ухане в 2019–20 году, что стало чрезвычайным происшествием в мировом здравоохранении. Секвенирование генома показало, что это содержащий плюс-цепь однонитевой РНК коронавирус (номер доступа в GenBank MN908947.3; RefSeq NC_045512; “Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1” («изолят вируса пневмонии с уханьского рынка морепродуктов Wuhan-Hu-1»)). Коронавирусы преимущественно распространяются при близком контакте, в частности, через выдыхаемые капли в результате кашля и чихания на расстояние около 6 футов (1,8 м). Общие признаки инфекции включают в себя респираторные симптомы, лихорадку, кашель, одышку и затруднения дыхания. В более тяжелых случаях инфекция может вызывать пневмонию,

тяжелый острый респираторный синдром, почечную недостаточность и даже смерть. Существует неотложная потребность в векторах и иммуногенных композициях, содержащих их, которые можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2. Настоящее раскрытие направлено на решение этих проблем.

Сущность настоящего изобретения

[0009] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к реактивам, композициям и способам для индукции и/или улучшения (например, усиления) иммунного ответа против коронавируса, в частности, нового коронавируса 2019 года SARS-CoV-2. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к векторам на основе репликационно-дефектного аденовируса, которые кодируют по меньшей мере один антиген(антигены) SARS-CoV-2 (например, на основе аденовируса человека 5 типа (hAd5) с делецией E1A/E3 (hAd5-SARS-CoV-2)), и/или еще один или более экзогенных антигенов отличного типа возбудителя инфекции (например, отличного типа вируса, такого как вирус гриппа (например, Ad-HA)), или у которых отсутствует трансген («hAdE»; например, не кодирующий по меньшей мере один антиген или иммуноген экзогенного возбудителя инфекции – «пустой»), которые могут собирательно называться данном документе «векторами для иммунизации против SARS-CoV-2». Как обсуждается в данном документе, такие векторы (и/или иммуногенные композиции, содержащие их) можно применять для индукции иммунного ответа слизистых оболочек, клеточно-опосредованного и/или гуморального иммунного ответа против SARS-CoV-2 (например, против защитных эпитопов SARS-CoV-2, таких как рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном раскрытии описано введение таких векторов (например, hAd5-SARS-CoV-2 и/или hAd5) животным и/или людям для индукции и/или усиления иммунного ответа (например, выработки антител и/или $CD8^+$ Т-клеток (и/или других Т-клеток)), характеризующихся специфичностью в отношении Т-клеточного(Т-клеточных) эпитопа(эпитопов) SARS-CoV-2 (например, доминантных эпитопов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммунный ответ, индуцируемый вектором, вводимым интраназально, индуцирует и/или усиливает Т-клеточный иммунный ответ с участием резидентных фенотипов клеток памяти в дыхательных путях. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такой иммунный ответ является защитным против SARS-CoV-2 и/или эффективным в ослаблении симптомов и/или инфекции SARS-CoV-2, и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления он может

являться защитным против вторичного заражения SARS-CoV-2. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем раскрытии описано применение иммуногенной(иммуногенных) композиции(композиций), содержащей(содержащих) hAd5-SARS-CoV-2, для обеспечения решений известных в уровне техники проблем, связанных с передачей и инфицированием SARS-CoV-2.

[0010] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе представлены иммуногенные композиции, составы с ними и способы применения для лечения и/или предупреждения связанных с COVID-19 заболеваний, вызванных вирусной инфекцией SARS-Cov-2, причем иммуногенная композиция содержит вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 446 или вариант, характеризующийся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 446. В соответствии с вариантами осуществления иммуногенная композиция содержит вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 15 или вариант, характеризующийся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью SEQ ID NO: 15. SEQ ID NO: 15 содержит последовательность RBD (SEQ ID NO: 446) с длинными фланкирующими последовательностями домена S1 спайк-белка (SEQ ID NO: 3) и лидерной последовательностью. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеотидная последовательность кодирует SEQ ID NO: 13 (домен S1). В соответствии с вариантами осуществления нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более точечных мутаций в SEQ ID NO: 3.

[0011] В контексте данного документа «вариант» относится к одной или более мутациям в последовательности RBD. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеотидная последовательность кодирует одну или более из SEQ ID NO: 412-417, SEQ ID NO: 438-445, SEQ ID NO: 475-476 и SEQ ID NO: 460 (последовательности RBD, содержащие одну или более мутаций по сравнению с последовательностью RBD с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 446, SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15). В соответствии с вариантами осуществления нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций в положениях 333-388, 390-395, 397-399, 401-411, 413-415, 417-419, 424, 426-435, 437, 439-442, 444-446, 449, 450, 452, 453, 455-463, 465, 467-473, 475-479, 481-486, 490, 491, 493-495, 499-510 или 513-526, причем нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411 или SEQ ID NO: 3 (полноразмерный спайк-белок). В

соответствии с вариантами осуществления нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций в положениях аминокислот 367, 403, 439, 417, 446, 447, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 487, 490, 493, 494, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505, причем нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411 или SEQ ID NO: 3 (полноразмерный спайк-белок).

[0012] В соответствии с вариантами осуществления одна или более мутаций являются выбранными из замены аминокислоты 417 (K) на N; замены аминокислоты 446 (G) на V, S или A; замены аминокислоты 449 (Y) на N; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замены аминокислоты 455 (L) на F; замены аминокислоты 456 (F) на L; замены аминокислоты 473 (Y) на V; замены аминокислоты 475 (A) на V; замены аминокислоты 476 (G) на S или A; замены аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I; замены аминокислоты 484 (E) на Q, K, D, A или R; замены аминокислоты 486 (F) на L или S; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замены аминокислоты 493 (Q) на L или R; замены аминокислоты 495 (Y) на N или F; замены аминокислоты 500 (T) на I; замены аминокислоты 501 (N) на Y, T или S; замены аминокислоты 502 (G) на R, D или C; замены аминокислоты 503 (V) на L, I или F или замены аминокислоты 505 (Y) на H, E, W или C, причем нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411. В соответствии с вариантами осуществления нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций, выбранных из K417T, K417N, E484K, L452R и/или N501Y, причем нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411 или SEQ ID NO: 3 (полноразмерный спайк-белок). В соответствии с вариантами осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 446, дополнительно содержит лидерную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 418-437.

[0013] В соответствии с вариантами осуществления в данном документе представлена иммуногенная композиция, причем кодирующая последовательность трансгена является оптимизированной по кодонам для субъекта-млекопитающего. В соответствии с вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой бычий аденовирус, собачий аденовирус, аденовирус приматов, отличных от человека, аденовирус кур, свиной аденовирус, или аденовирус свиней, или аденовирус человека. В соответствии с вариантами осуществления аденовирус приматов, отличных от человека, представляет собой аденовирус шимпанзе или горилл. В соответствии с вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой

аденовирус человека. В соответствии с вариантами осуществления аденовирус человека представляет собой Ad5 или Ad26.

[0014] В соответствии с вариантами осуществления в данном документе представлен фармацевтический состав, содержащий эффективное количество иммуногенной композиции (например, содержащей вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 446 или вариант, характеризующийся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 446), причем композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, необязательно, при этом разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор. В соответствии с вариантами осуществления состав выполнен с возможностью неинвазивного или интраназального введения, необязательно, при этом фармацевтически приемлемый носитель имеет форму распыляемого раствора или аэрозоля.

[0015] В соответствии с вариантами осуществления в данном документе представлен способ индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, причем способ предусматривает введение человеку эффективного количества данной иммуногенной композиции ((например, содержащей вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 446 или вариант, характеризующийся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 446). В соответствии с вариантами осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp). В соответствии с вариантами осуществления иммуногенную композицию вводят интраназально.

[0016] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции согласно настоящему раскрытию можно применять в лечении или предупреждении SARS-CoV-2, и композиции согласно настоящему раскрытию можно применять в производстве лекарственного препарата для обеспечения лечения или предупреждения SARS-Cov-2. Соответственно, несмотря на то что настоящее изобретение охватывает способы лечения и предупреждения SARS-CoV-2, настоящее изобретение также охватывает применение композиций согласно настоящему изобретению, и такие применения могут соответствовать любым способам согласно настоящему изобретению и могут включать любые или все композиции согласно настоящему изобретению.

Краткое описание чертежей

[0010] Прилагаемые чертежи, которые включены в данное описание и составляют его часть, иллюстрируют один или более вариантов осуществления настоящего раскрытия и вместе с разделами «Подробное раскрытие настоящего изобретения» и «Примеры» служат для объяснения принципов и реализации настоящего раскрытия.

[0011] Фиг. 1A-J. Иллюстративный полный геном SARS-CoV-2 (изолят вируса пневмонии с уханьского рынка морепродуктов Wuhan-Hu-1, полный геном; GenBank: MN908947.3; **SEQ ID NO: 1**).

[0012] Фиг. 2A-E. Полипротеин ORF1ab SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43415.1; **SEQ ID NO: 2**).

[0013] Фиг. 3A. Поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2 (например, спайк-белок), включающий в себя нативную лидерную последовательность (GenBank: QHD43416.1; **SEQ ID NO: 3**).

[0014] Фиг. 3B. RBD участок поверхностного гликопротеина спайк-белка SARS-CoV-2 (**SED ID NO: 446**).

[0015] Фиг. 4. Белок ORF3A SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43417.1; **SEQ ID NO: 4**).

[0016] Фиг. 5. Белок оболочки SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43418.1; **SEQ ID NO: 5**).

[0017] Фиг. 6. Мембранный гликопротеин SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43419.1; **SEQ ID NO: 6**).

[0018] Фиг. 7. Белок ORF6 SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43420.1; **SEQ ID NO: 7**).

[0019] Фиг. 8. Белок ORF7a SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43421.1; **SEQ ID NO: 8**).

[0020] Фиг. 9. Белок ORF8 SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43422.1; **SEQ ID NO: 9**).

[0021] Фиг. 10. Фосфопротеин нуклеокапсида SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43423.2; **SEQ ID NO: 10**).

[0022] Фиг. 11. Белок ORF10 SARS-CoV-2 (GenBank: QHI42199.1; **SEQ ID NO: 11**).

[0023] На **фиг. 12** представлено схематическое изображение полного генома Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2 (GenBank MN908497; эталонная последовательность в NCBI: NC_045512.2; **SEQ ID NO: 1**).

[0024] На **фиг. 13** представлено схематическое изображение полипептида спайк-белка и его доменов (например, **SEQ ID NO: 3**)

[0025] На **фиг. 14** представлена таксономическая характеристика коронавируса на основании доменов S1 и S2 спайк-белка коронавируса.

[0026] На **фиг. 15** представлена таблица консервативных аминокислотных замен в положениях 455, 486, 493, 494 и 501 в рецептор-связывающем домене (RBD) S1 части спайк-белка.

[0027] Фиг. 16. Поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2 (например, спайк-белок) (GenBank: QHD43416.1) с выделенной подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA. (**SEQ ID NO: 12**).

[0028] Фиг. 17A. Домен S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с выделенной подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA (**SEQ ID NO: 13**). Когда **SEQ ID NO: 13** вставлена в вектор на основе аденовируса, в данном документе он называется «вектор с S1».

[0029] Фиг. 17B. Варианты мутаций SARS-CoV-2 в домене S1 («последовательность» представляет собой **SEQ ID NO: 411**).

[0030] Фиг. 18. Рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с выделенными подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и короткой фланкирующей последовательностью. (**SEQ ID NO: 14**).

[0031] Фиг. 19. Рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с выделенными подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и длинной фланкирующей последовательностью (**SEQ ID NO: 15**). Когда **SEQ ID NO: 15** вставлена в вектор на основе аденовируса, в данном документе он называется «вектором с RBD».

[0032] Фиг. 20. Рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с консервативными заменами в положениях 455, 486, 493, 494 и 501 (**SEQ ID NO: 16**).

[0033] Фиг. 21. Спайк-белок SARS-CoV-2, часть рецептор-связывающего домена (RBD) домена S1 с консервативными заменами в положениях 455, 486, 493, 494 и 501 (**SEQ ID NO: 17**).

[0034] Фиг. 22. Поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2 (например, спайк-белок) с выделенными подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и заменами в сайтах S1/S2, S2' и HR1 (**SEQ ID NO: 18**).

[0035] Фиг. 23. Поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2 (например, спайк-белок) с выделенными подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и заменами в сайтах S1/S2, S2' и HR1 (**SEQ ID NO: 19**).

[0036] Фиг. 24. Поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2 (например, спайк-белок) с выделенными подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и заменами в сайтах S1/S2, S2', HR1, пептида слияния и мотива для удержания в ER (**SEQ ID NO: 20**).

[0037] На **фиг. 25** представлено дозозависимое выделение вектора, которое отсутствует через 2 недели после введения (данной композиции моновалентной вакцины от гриппа (например,

NasoVAX)), причем не было обнаружено присутствие репликационно-компетентного вируса (которое определяли с помощью анализа методом полимеразной цепной реакции («ПЦР»)), и антитело к вектору представлено в виде GMR в День 29 в сравнении с исходным уровнем, при этом была продемонстрирована только 2,3-кратная индукция спустя 1 месяц с самой высокой дозой. Данная композиция моновалентной вакцины от гриппа демонстрирует транзиентное выделение (Ad-вектора) с ограниченным иммунным ответом в отношении вектора (Ad-вектора).

[0038] На **фиг. 26** представлено воздействие введения NasoVAX (высокая доза; 11×10^{11} vp) с ранее существующим иммунитетом к вектору (Ad5) (исходный серологический статус Ad5), которое измеряют для гуморального ответа («HAI» или анализ микронейтрализации «MN» в День 29), ответа слизистых оболочек («IgA» в День 29) и клеточного ответа («ELISpot» в День 8), причем не наблюдались различия в иммунном ответе между серонегативными по Ad5 или серопозитивными по Ad5 субъектами. Медианный титр у Ad5+ субъектов был 22-кратно выше нижнего предела количественного определения (LLOQ).

[0039] Фиг. 27. Профили высокоаффинных связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II в полном протеоме SARS-CoV-2.

[0040] Фиг. 28. Профили связывающих мотивов с высокой и умеренной аффинностью для HLA класса I и HLA класса II в полном протеоме SARS-CoV-2.

[0041] Фиг. 29. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 328**.

[0042] Фиг. 30. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 329**.

[0043] Фиг. 31. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 330**.

[0044] Фиг. 32. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 331**.

[0045] Фиг. 33. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 332**.

[0046] Фиг. 34. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 333**.

[0047] Фиг. 35. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 334**.

[0048] Фиг. 36. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 335**.

[0049] Фиг. 37. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 336**.

[0050] Фиг. 38. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 337**.

[0051] Фиг. 39. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 338**.

[0052] Фиг. 40. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 339**.

[0053] Фиг. 41. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 340**.

[0054] Фиг. 42. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 341**.

[0055] Фиг. 43. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 342**.

[0056] Фиг. 44. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 343**.

[0057] Фиг. 45. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 344**.

[0058] Фиг. 46. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 345**.

[0059] Фиг. 47. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 346**.

[0060] Фиг. 48. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 347**.

[0061] Фиг. 49. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 348**.

[0062] Фиг. 50. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 349**.

[0063] Фиг. 51. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 350**.

[0064] Фиг. 52. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 351**.

[0065] Фиг. 53. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 352**.

[0066] Фиг. 54. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 353**.

[0067] Фиг. 55. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 354**.

[0068] Фиг. 56. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 355**.

[0069] Фиг. 57. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 356**.

[0070] Фиг. 58. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 357**.

[0071] Фиг. 59. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 358**.

[0072] Фиг. 60. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 359**.

[0073] Фиг. 61. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 360**.

[0074] Фиг. 62. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 361**.

[0075] Фиг. 63. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 362**.

[0076] Фиг. 64. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 363**.

[0077] Фиг. 65. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 364**.

[0078] Фиг. 66. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 365**.

[0079] Фиг. 67. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 366**.

[0080] Фиг. 68. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 367**.

[0081] Фиг. 69. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 368**.

[0082] Фиг. 70. Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для **SEQ ID NO: 369**.

[0083] Фиг. 71. Измерения уровня антител IgG к SAR-CoV-2 (мкг/мл) в сыворотке крови (**A**), антител IgG к SARS-Cov-2 (нг/мл) в BAL (**B**) и антител IgA к SARS-CoV-2 (нг/мл) в BAL (**C**) из бронхоальвеолярных лаважей, полученных в различные моменты времени от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (который показан в **SEQ ID NO: 15**). Результаты выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%. В День 0 записывают значения в контрольной группе для всех групп. В День 7 и День 14 для группы, получающей 2 интраназальные дозы, записывают значения относительно группы, получавшей однократное введение в той же дозе.

[0084] Фиг. 72. Нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 в сыворотке крови измеряли с помощью реакции нейтрализации фокусов (PRNT) у десяти C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**). Каждый график (**фиг. 72A-72J)** соответствует результатам, полученным от одной иммунизированной мыши. Линии черного цвета соответствуют сыворотке отрицательного контроля, а линии красного цвета соответствуют исследуемым образцам сыворотки.

[0085] Фиг. 73. Нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 в сыворотке крови измеряли с помощью реакции нейтрализации фокусов (PRNT) у пяти C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную среднюю дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**). Каждый график (**фиг. 73A-73E**) соответствует результату, полученному от одной иммунизированной мыши. Линии черного цвета соответствуют сыворотке отрицательного контроля, а линии красного цвета соответствуют исследуемым образцам сыворотки.

[0086] Фиг. 74A-74L. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в легких от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен

(**SEQ ID NO: 15**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0087] Фиг. 75A-75E. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в бронхоальвеолярных лаважах от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную среднюю дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0088] Фиг. 76A-76J. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в медиастинальных лимфатических узлах от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0089] Фиг. 77A-77L. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в селезенках от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0090] Фиг. 78. Измерения уровня антител IgG к SAR-CoV-2 (мкг/мл) в сыворотке крови (**A**), антител IgG к S-белку SARS2 (нг/мл) в BAL (**B**) и антител IgA к S-белку SARS-2 (нг/мл) в BAL (**C**) из бронхоальвеолярных лаважей (BAL), полученных в различные моменты времени от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%. В День 0 записывают значения в контрольной группе для всех групп. В День 7 и День 14 для группы, получающей 2 интраназальные дозы, записывают значения относительно группы, получавшей однократное введение в той же дозе.

[0091] Фиг. 79. Нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 в сыворотке крови измеряли с помощью реакции нейтрализации фокусов (PRNT) у пяти C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Каждый график соответствует результату, полученному от одной иммунизированной мыши (**фиг. 79A-79E**). Линии черного цвета соответствуют сыворотке отрицательного контроля, линии синего цвета соответствуют

положительному контролю и линии красного цвета соответствуют исследуемым образцам сыворотки.

[0092] Фиг. 80. Нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 в сыворотке крови измеряли с помощью реакции нейтрализации фокусов (PRNT) у пяти C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную средней дозы вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Каждый график соответствует результату, полученному от одной иммунизированной мыши (**фиг. 80A-80E**). Линии черного цвета соответствуют сыворотке отрицательного контроля, линии синего цвета соответствуют положительному контролю и линии красного цвета соответствуют исследуемым образцам сыворотки.

[0093] Фиг. 81A-81L. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в легких от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0094] Фиг. 82A-82E. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в бронхоальвеолярных лаважах от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную среднюю дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0095] Фиг. 83A-83J. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в медиастинальных лимфатических узлах от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0096] Фиг. 84A-84L. Анализ методом проточной цитометрии иммунных клеток в селезенках от отдельных C57BL/6 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[0097] Фиг. 85. Измерения антител IgG к SAR-CoV-2 (мкг/мл) в сыворотке крови (**A**), антител IgG к SARS-CoV-2 (нг/мл) в BAL (**B**) и антител IgA к SARS-COV-2 в BAL (нг/мл) (**C**) в бронхоальвеолярных лаважах (BAL), полученных в различные моменты времени от отдельных

CD-1 мышей, которые получили одну или две интраназальных дозы вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%. В День 0 записывают значения в контрольной группе для всех групп. В День 7 и День 14 для группы, получающей 2 интраназальные дозы, записывают значения относительно группы, получавшей однократное введение в той же дозе.

[0098] Фиг. 86. Измерения уровня антител IgG к SAR-CoV-2 (мкг/мл) в сыворотке крови (**A**), антител IgG к SARS-CoV-2 (нг/мл) в BAL (**B**) и антител IgA к SARS-CoV-2 (нг/мл) в BAL (**C**) из бронхоальвеолярных лаважей, полученных в различные моменты времени от отдельных CD-1 мышей, которые получили однократную интраназальную дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего домен S1 (**SEQ ID NO: 13**). Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%. В День 0 записывают значения в контрольной группе для всех групп.

[0099] Фиг. 87A-87E. Соединенный полипротеин SARS-CoV-2; полученный из **SEQ ID NO: 1** (GenBank: MN908947.3).

[00100] Фиг. 88. Измерение Т-клеток в легких в День 10 (**A**) и День 14 (**B**) и Т-клеток в селезенке в День 10 (**C**) и в День 14 (**D**) от отдельных CD-1 мышей, которые получали однократную интраназальную дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**) («вектор с RBD»), или от контрольных групп, которые получали только буфер A195. Результаты для групп выражены в виде среднего геометрического значения для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[00101] Фиг. 89. Измерения CD4+ IFN-g+ CD11a+ Т-клеток в легких (**A**), CD4+ TNF-a+ CD11a+ Т-клеток в легких (**B**), CD4+ IFN-g+ CD11a+ Т-клеток в легких (**C**) и CD4+ TNF-a+ CD11a+ Т-клеток в легких (**D**) в День 14 от отдельных CD-1 мышей, которые получали однократную интраназальную дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**) («вектор с RBD») или которые получали только контрольный буфер A195. Перед проточно-цитометрическим анализом клетки повторно стимулировали пулом пептидов RBD в количестве 2 мкг/пептид/мл. Линии соответствуют среднему геометрическому значению для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[00102] Фиг. 90. Измерения CD4+ IFN-g+ CD11a+ Т-клеток в селезенке (**A**), CD4+ TNF-a+ CD11a+ Т-клеток селезенки (**B**), CD4+ IFN-g+ CD11a+ Т-клеток селезенки (**C**) и CD4+ TNF-a+ CD11a+ Т-клеток селезенки (**D**) в День 14 от отдельных CD-1 мышей, которые получали

однократную интраназальную дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**) («вектор с RBD») или которые получали только контрольный буфер A195. Линии соответствуют среднему геометрическому значению для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[00103] Фиг. 91. Измерения резидентных CD4+ (**A**) и CD8+ (**B**) Т-клеток памяти в легких, экспрессирующих маркеры резидентных Т-клеток памяти (TRM) CD103 и CD69, в День 14 от отдельных CD-1 мышей, которые получили однократную интраназальную дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**) («вектор с RBD») или которые получали только контрольный буфер A195. Линии соответствуют среднему геометрическому значению для ответа с доверительным интервалом +/-95%.

[00104] Фиг. 92. Нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 в сыворотке крови измеряли с помощью реакции нейтрализации фокусов (FRNT) у десяти CD-1 мышей, которые получили однократную интраназальную высокую дозу вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен (**SEQ ID NO: 15**). Каждый график соответствует результату, полученному от одной иммунизированной мыши (**фиг. 92A-92J**). Линии черного цвета соответствуют сыворотке отрицательного контроля и линии красного цвета соответствуют исследуемым образцам сыворотки.

[00105] Фиг. 93. Экспрессия и выявление трансгена спайк-белка в клетках, инфицированных вектором с S1 или с RBD. Per.C6 клетки инфицировали в MOI:5 вектором с S1 (**SEQ ID NO: 13**) или с RBD (**SEQ ID NO: 15**) («вектор с S1» или «вектор с RBD»), соответственно. Через 24 часа после инфицирования клетки собирали, фиксировали и пермеабилизировали, а затем окрашивали с использованием специфичных к спайк-белку мышиных нейтрализующих моноклональных антител MM-43 (верхняя секция) или MM-57 (нижняя секция) - закрашенные гистограммы. Неинфицированные клетки применяли в качестве отрицательного контроля (незакрашенная гистограмма).

[00106] Фиг. 94. Ответы с выработкой нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 в сыворотке крови после однократного интраназального введения вектора с S1 и вектора с RBD. **A:** Ответ с выработкой нейтрализующих антител у C57BL/6 или CD-1 мышей, вакцинированных 28 сутками ранее средней или высокой дозой вектора с S1 или с RBD, как указано. Результаты выражены в виде обратной величины для разведения образцов сыворотки крови, требующегося для достижения 50% нейтрализации ($FRNT_{50}$) инфекции SARS-CoV-2 дикого типа в пермиссивных клетках Vero E6. Линией показано медианное значение для

группы. **B:** Корреляция между ответом с выработкой нейтрализующих антител и ответом с выработкой специфичного к спайк-белку IgG в сыворотке крови у вакцинированных животных. Корреляционный анализ осуществляли с использованием двухстороннего критерия Спирмена. Интраназальная вакцинация высокой дозой вектора с RBD индуцировала ответы с выработкой нейтрализующих антител выше исходного уровня у 10/10 C57BL/6 и 8/10 CD-1 мышей.

[00107] Фиг. 95. Выработка внутриклеточных цитокинов резидентными Т-клетками памяти в легких через 14 суток после однократного интраназального введения вектора с RBD. CD-1 мышам выполняли однократное интраназальное введение среды (Ctrl) или высокой дозы вектора с RBD, как описано в примере 17. Клетки легких (n=10 мышей/вакцина, 3 мыши/контроль) выделяли в День 14, подвергали повторной стимуляции пулом пептидов RBD в течение 5 часов и анализировали методом проточной цитометрии для идентификации $CD69^{+}CD103^{+}$ резидентных Т-клеток памяти (Trm). Результаты выражены в % CD4+ или CD8+ Т-клеток для отдельных мышей. Линиями представлены средние значения для ответа +/-SD в группах. Статистический анализ осуществляли с использованием критерия Манна-Уитни: *- P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001; **** - P<0,0001.

[00108] Фиг. 96. Выработка секретируемых цитокинов Т-клетками селезенки через 10 часов после однократного интраназального введения вектора с RBD. CD-1 мышам давали однократное интраназальное введение среды (Ctrl) или высокой дозы вектора с RBD, как описано в примере 18. Клетки селезенки (n=10 мышей/вакцина, 3 мыши/контроль) выделяли в День 10 и подвергали повторной стимуляции пулом пептидов RBD в течение 48 часов. Секретируемые цитокины выявляли в супернатанте с применением мультиплексного анализа цитокинов. Результаты выражены в пг/мл. Линии представляют среднее значение для ответа +/- SD. Статистический анализ осуществляли с использованием критерия Манна-Уитни: * - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001; **** - P<0,0001.

[00109] Фиг. 97. Продолжительные ответы с выработкой специфичного к спайк-белку IgG в сыворотке крови после однократного интраназального введения вектора с RBD. C57BL/6J мыши (n=20) получали однократное интраназальное введение вектора с RBD. Образцы сыворотки крови собирали в День 0 перед вакцинацией и в Дни 15, 30, 63 и 120 после вакцинации и анализировали по отдельности для количественного определения специфичного к спайк-белку IgG. Результаты выражены в мкг/мл. *См.* пример 18.

[00110] Фиг. 98. Количественное определение RBD-специфичных антителосекретирующих клеток («ASC»), продуцировавших антитела IgG и IgA в костном мозге и легких после

однократного интраназального введения вектора с RBD. CD-1 мыши (n=5) получали однократное интраназальное введение вектора с RBD. Клетки легких (LG) и клетки костного мозга (BM) собирали через 69 суток после иммунизации («69 dpi») и анализировали по отдельности для количественного определения ASC с помощью ELISpot. (**A**) Представлен пример лунок планшета для ELIspot с B-клетками. (**B**) Представлено измерение RBD-специфичных ASC, продуцирующих IgG и IgA, и оно представлено либо в виде частоты, либо в виде числа на общее количество 10^6 клеток в костном мозге. (**C**) Представлено измерение RBD-специфичных ASC, продуцирующих IgG и IgA, оно представлено либо в виде частоты, либо в виде числа на общее количество 10^6 клеток в легком. *См.* пример 19.

[00111] Фиг. 99. Количественное определение долгоживущих RBD-специфичных B-клеток памяти в День 168 после однократного интраназального введения вектора с RBD. C57BL/6J (n-4) мыши получали однократное интраназальное введение вектора с RBD. Медиастинальные лимфатические узлы собирали через 168 суток (24 недели) после иммунизации и анализировали по отдельности для количественного определения RBD-специфичных B-клеток памяти с помощью проточной цитометрии. Не подвергавшихся воздействию C57BL/6J (n=5) применяли в качестве отрицательного контроля. (**A**) Представлена стратегия гейтирования для анализа методом проточной цитометрии. (**B**) Представлено абсолютное количество RBD-специфичных B-клеток памяти, измеренное у вакцинированных животных по сравнению с животными, не подвергавшимися воздействию. *См.* пример 20.

[00112] Фиг. 100. Количественное определение долгоживущих RBD-специфичных ASC, продуцировавших антитела IgG и IgA в костном мозге после однократного интраназального введения вектора с RBD. C57BL/6J (n-4) мыши получали однократное интраназальное введение вектора с RBD. Клетки костного мозга (BM) собирали через 168 суток (24 недели) после иммунизации и анализировали по отдельности для количественного определения ASC с помощью ELISpot. Не подвергавшихся воздействию C57BL/6J (n=5) применяли в качестве отрицательного контроля. (**A**) Представлен пример лунок планшета для ELIspot с B-клетками. (**B**) Представлено измерение RBD-специфичных ASC, продуцирующих IgG и IgA, и оно представлено в виде числа на общее количество 10^6 клеток в костном мозге. *См.* пример 20.

[00113] **<u>Подробное раскрытие настоящего изобретения</u>**

[00114] Настоящее раскрытие относится к иммуногенной композиции (например, вакцине), содержащей вектор на основе аденовируса, который кодирует по меньшей мере один антиген(антигены) нового коронавируса 2019 года SARS-CoV-2 («трансген SARS-Cov-2»), к композициям, содержащим ее, и к ее применению для индукции защитного иммунного ответа

против SARS-CoV-2. Аденовирус представляет собой встречающийся в естественных условиях респираторный вирус, который часто применяли в качестве вектора для введения генетического материала в клетки, причем вектор на основе аденовируса может трансдуцировать гены антигенов SARS-CoV-2 в клетки слизистой оболочки носа (при интраназальном введении), приводя к транзиентной экспрессии кодируемых антигенных белков SARS-CoV-2 или их пептидов в таких клетках. Последующее продуцирование антигена SARS-CoV-2 в нормальных человеческих эпителиальных клетках обеспечивает возможность иммунного ответа против антигена SARS-CoV-2, когда он встречается в циркулирующем в природе коронавирусе (например, SARS-CoV-2). SARS-CoV-2, первоначально описанный как 2019-nCoV, представляет собой новый и высокопатогенный вирус, появившийся только в декабре 2019 года. У людей SARS-CoV-2 является ответственным за болезнь, называемую коронавирусной болезнью 2019 (COVID-19), как было официально определено Всемирной организацией здравоохранения (WHO). Композиции, раскрытые в данном документе, являются одними из первых, нацеленных на SARS-CoV-2, и обеспечивают защиту от COVID-19 и связанного заболевания. Соответственно, иммуногенные композиции, раскрытые в данном документе, обеспечивают возможность предупреждения и средства для лечения этого нового и патогенного вируса SARS-CoV-2, лечение для которого ранее не существовало, и у которого сохраняется потенциал пандемического заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенная композиция предупреждает и/или снижает тяжесть COVID-19, что определено согласно Руководству FDA для отрасли «Разработка и лицензирование вакцин для предупреждения COVID-19» (“Development and Licensure of Vaccines to Prevent COVID-19”) в июне 2020 года и Руководству FDA для отрасли «Регистрация вакцин для предупреждения COVID-19 для использования в экстренных условиях» (“Emergency Use Authorization for Vaccines to Prevent COVID-19”) в октябре 2020 года, каждый из этих документов включен в данный документ посредством ссылки. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает частоту возникновения инфекции или вирусологически подтвержденных бессимптомных или симптоматических случаев COVID-19. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает частоту возникновения тяжелого и/или нетяжелого (легкого или умеренного) COVID-19 или частоту поступлений в больницу, связанных с COVID-19. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает частоту возникновения легкого или умеренного COVID-19. В соответствии с некоторыми

предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает частоту возникновения тяжелого COVID-19. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает частоту связанных с COVID-19 посещений отделения неотложной помощи, госпитализации с COVID-19 и/или связанной с COVID-19 смерти. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает тяжесть связанных с COVID-19 заболеваний. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает передачу SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция снижает передачу SARS-CoV-2.

[00115] В соответствии с вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к векторам на основе репликационно-дефектного аденовируса, кодирующим по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2 (например, к векторам на основе аденовируса человека 5 типа (hAd5) с делецией E1A/E3 (hAd5-SARS-CoV-2)) и/или еще один или более экзогенных антигенов отличного типа возбудителя инфекции (например, отличного типа вируса, такого как вирус гриппа (например, Ad-HA)), или в которых отсутствует трансген («hAdE»; например, не кодирующий по меньшей мере один антиген или иммуноген экзогенного возбудителя инфекции – «пустой»), а также к экспрессионным кассетам, например, для содержания и/или вставки кодирующей(кодирующих) последовательности(последовательностей) в вектор(векторы), содержащий(содержащие) кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, которая кодирует по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2 (и/или еще один или более экзогенных антигенов отличного типа возбудителя инфекции). Такие векторы собирательно называются в данном документе «векторами для иммунизации против SARS-CoV-2». Как обсуждается в данном документе, такие векторы для иммунизации против SARS-CoV-2 (и/или иммуногенные композиции, содержащие их) предпочтительно применяют для индукции иммунных ответов слизистых оболочек, клеточно-опосредованных и/или гуморальных иммунных ответов против SARS-CoV-2 (например, против защитных эпитопов SARS-CoV-2, таких как рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие векторы для иммунизации против SARS-CoV-2 (и/или иммуногенные композиции, содержащие их) стимулируют врожденный иммунный ответ, поддерживающий приобретенный иммунитет от вектора, если их применяют в профилактических целях, или напрямую препятствующий инфицированию SARS-CoV-2, если их вводят в течение доконтактного периода (за несколько суток до инфекции) или в течение

послеконтактного периода. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем раскрытии описано введение таких векторов (например, hAd5-SARS-CoV-2 и/или hAd5) животным и/или людям для индукции и/или усиления иммунного ответа (например, выработки антител и/или $CD8^+$ Т-клеток (и/или других Т-клеток)), характеризующегося специфичностью в отношении Т-клеточного(Т-клеточных) эпитопа(эпитопов) SARS-CoV-2 (например, доминантных эпитопов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такой иммунный ответ является защитным против SARS-CoV-2, и/или эффективным в ослаблении симптомов и/или инфекции SARS-CoV-2, и/или снижении передачи SARS-CoV-2, и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления он может являться защитным против вторичного заражения SARS-CoV-2. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем раскрытии описано применение иммуногенной(иммуногенных) композиции(композиций), содержащей(содержащих) hAd5-SARS-CoV-2, для обеспечения решений известных в уровне техники проблем, связанных с передачей и инфицированием SARS-CoV-2.

[00116] В соответствии с вариантами осуществления SARS-CoV-2 антиген может представлять собой антиген спайк (S) белка или другой антиген SARS-CoV-2, который раскрыт в данном документе или который может быть каким-либо иным образом доступен квалифицированным специалистам в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами осуществления антиген SARS-CoV-2 может представлять собой полноразмерный спайк (S) белок, его иммуногенный фрагмент или консенсусный антиген спайк (S) белка, полученный из последовательностей антигенов спайк-белков из нескольких штаммов SARS-CoV-2 (или близкородственных изолятов SARS), идентифицированных во время вспышки 2019/2020 годов и первоначально секвенированных и представленных в GenBank MN908497; эталонная последовательность в NCBI: NC_045512.2 “Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1” (включена в данной документ посредством ссылки); см. также Tegally et al., “Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa”, Nat Med (2021), доступный через Интернет по адресу doi.org/10.1038/s41591-021-01255-3 (включен в данный документ посредством ссылки вместе со всеми данными и кодом (в том числе с расширенными данными), цитируемыми в Tegally, и все источники, цитируемые в Tegally et al., также включены в данный документ посредством ссылки); Conti et al., “The British variant of the new coronavirus-19 (Sars-Cov-2) should not create a vaccine problem”, J Biol Regul Homeost Agents”, Dec 30;35(1) (2020), доступный через Интернет по адресу: doi: 10.23812/21-3-E (включенный в данный документ посредством ссылки); Fiorentini et al., “First detection of SARS-

Cov-2 spike protien N501 mutation in Italy in August, 2020", Lancet Infect Dis (2021), доступный онлайн по адресу: doi.org/10.1016/ S1473-3099(21)00007-4 (включенный в данный документ посредством ссылки вместе с источниками, цитируемыми в Fiorentini, которые также включены в данный документ посредством ссылки). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессионная кассета, содержащая кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген коронавируса, содержит по меньшей мере домены S1 и/или S2 спайк-белка или их иммуногенные фрагменты (например, последовательность RBD домена S1 спайк-белка). *См.* **фиг. 13**, **14** и **15**. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно применять стабилизированный перед слиянием спайк-белок (например, посредством введения пролиновых остатков в S2 (домены HR1), повышенная экспрессия которого была продемонстрирована при MERS и SARS (см. публикацию патентного документа США № 2020/0061185 A1 (Graham, et al.; см., например, фиг. 4 в нем), заменяя аминокислотную последовательность дикого типа NSPRRARSVAS (**SEQ ID NO: 450**) на NSPQQAQSVAS (**SEQ ID NO: 451**) в сайте расщепления S1/S2 (мутация QQAQ), KRSFIEDLLFNKVTLADA (**SEQ ID NO: 452**) на KRSFIADA (**SEQ ID NO: 453**) в сайте расщепления S2' (усечение пептида слияния, делеция 819-828) и/или SRLDKVEAEV (**SEQ ID NO: 454**) на SRLDPPEAEV (**SEQ ID NO: 455**) (мутация 2P, K986P/V987P)). В данном документе также предусмотрено применение других типов S-белков/антигенов, что будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники. *См.* раздел «Конструирование стабилизированного антигена спайк-белка» ниже.

[00117] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессионная кассета, содержащая кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген коронавируса, содержит рецептор-связывающий домен (RBD) и/или N-концевой домен (NTD) S1. *См.*, например, **фиг. 13, 16-21**. В соответствии с определенными вариантами осуществления экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 3 (**фиг. 3A**), или по меньшей мере одну последовательность домена (например, B-клеточный эпитоп или T-клеточный эпитоп) с SEQ ID NO: 3, или по меньшей мере кодирующую последовательность RBD домена, кодирующую SEQ ID NO: 446 (**фиг. 3B**). В соответствии с вариантами осуществления вектор на основе аденовируса, кодирующий антиген SARS-CoV-2, может являться моновалентным или поливалентным (т.е. иметь один или более чем один эпитоп антигена). В соответствии с вариантами осуществления экспрессионная кассета содержит лидерную последовательность (например, tPA) для лучшей экспрессии и секреции кодируемой последовательности, причем кодирующая

последовательность, необязательно, является оптимизированной по кодонам для субъекта-млекопитающего (например, человека). В соответствии с вариантами осуществления экспрессионная кассета содержит последовательность RBD (например, **SEQ ID NO: 446**), необязательно, дополнительно содержащую длинные или короткие фланкирующие последовательности, нативные для вируса SARS-CoV-2 (например, **SEQ ID NO: 14** и **15**), которые могут усиливать экспрессию RBD в его нативной глобулярной конформации. В соответствии с вариантами осуществления иммуногенная композиция содержит один или более рекомбинантных аденовирусов, каждый из которых кодирует один или более антигенов SARS-CoV-2.

[00118] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к композициям и способам индукции иммунного ответа против коронавируса у субъекта-млекопитающего, в том числе у субъектов-людей. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе представлена иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген коронавируса или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент. Иммуногенная композиция в контексте данного документа относится к любому одному или более доставляемым в Ad-векторах соединениям, или средствам, или экспрессируемым иммуногенам и/или антигенам, способным запускать, потенцировать, активировать, вызывать, стимулировать, расширять, бустировать, увеличивать или усиливать приобретенный (специфический) иммунный ответ, который может представлять собой клеточный (Т-клеточный), гуморальный (В-клеточный) иммунный ответ и/или иммунный ответ слизистых оболочек или их комбинацию. Клеточный ответ может представлять собой ответ Т-клеток периферической крови или ответ резидентных Т-клеток в слизистой оболочке носа или дыхательных путях. Кроме того, клеточные ответы предпочтительно могут запускаться CD8+ Т-клетками и/или CD4+ Т-клетками с противовирусным фенотипом (например, выработка интерферона гамма). Предпочтительно, адаптивный иммунный ответ является защитным, который может включать в себя нейтрализацию вируса (снижение или устранение инфекционности вируса) и/или снижение симптомов или бессимптомного вирусовыделения (т.е. передачи).

[00119] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к иммунологическим композициям, содержащим пустой (т.е. без экзогенного антигена патогена, не относящегося к Ad, закодированного в геноме Ad5) вектор на основе

аденовируса (AdE), в качестве терапевтического средства против коронавируса посредством активации врожденного иммунного ответа, в том числе врожденного иммунного ответа слизистых оболочек. *См.* пример 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления однократное интраназальное введение может обеспечивать защиту, когда AdE вводят в течение периода от около двух до около 20 суток до контакта с SARS-Cov-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение иммуногенной композиции может индуцировать повышенные уровни MCP-1 и IFN-γ как после вакцинации, так и после вторичного заражения, что приводит к рекрутингу моноцитов, нейтрофилов и/или лимфоцитов, которые затем могут стимулировать выработку IFN-γ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение таких иммуногенных композиций может индуцировать значительные снижения уровней (например, по сравнению с контролями с плацебо) уровней IL-1α, IL-6 и/или IL-12p70 - цитокинов, которые, как продемонстрировано, опосредуют интерстициальное воспаление легких при COVID-19. *См.* пример 7.

[00120] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к реактивам (например, иммуногенным композициям) и способам для интраназального (i.n.) введения вирусных частиц AdE векторов (т.е. репликационно-дефектного аденовируса 5 типа (Ad5) с ΔE1E3) без экзогенного антигена патогена, не относящегося к Ad, закодированного в геноме Ad5) для обеспечения профилактической терапии против SARS-CoV-2 у млекопитающих, предпочтительно, у человека. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления такие иммуногенные композиции, содержащие AdE, можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляет собой иммуногенную композицию), и они демонстрируют приемлемый профиль безопасности. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления получаемый в результате иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным (т.е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления такие иммуногенные композиции, содержащие AdE, можно применять для лечения человека, инфицированного SARS-CoV-2 (например, у госпитализированных пациентов). *См.* пример 3.

[00121] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к репликационно-дефектному hAd5 с делецией E1/E3, который содержит экспрессионную кассету, содержащую лидерную последовательность (например, тканевого активатора плазминогена (tPA)) и оптимизированную по кодонам нуклеотидную

последовательность, которая кодирует по меньшей мере один белок(белки) SARS-CoV-2 (например, любую одну или более из **SEQ ID NO: 2-11** и/или один или более их фрагментов и/или производных), функционально связанную с промотором (например, цитомегаловирусным промотором (CMV)), к иммуногенным композициям и способам их применения для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2. *См.* пример 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодирующая последовательность SARS-CoV-2 вставлена в участок E1 в hAd5 («hAd5-SARS-CoV-2»). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления hAd5-SARS-CoV-2 может быть основан на платформе вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса 5 типа с делецией E1 и E3 (Tang et al 2009) для экспрессии оптимизированного по кодонам для экспрессии у человека гена для домена S1 (остатки 16-685 (см., например, примеры 14, 16)) или RBD домена (остатки 331-527 в домене S1 (см., например, примеры 15, 17)) спайк-белка SARS-CoV-2 (номер доступа QHD43416.1 (**SEQ ID NO: 3**)). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления такие доставляемые в векторе на основе Ad5 трансгены S1 и RBD включают в себя лидерную последовательность тканевого активатора плазминогена человека, и они могут экспрессироваться под управлением немедленно-раннего промотора/энхансера цитомегаловируса (см., например, предпочтительные варианты осуществления **SEQ ID NO: 13** и **SEQ ID NO: 15**, соответственно). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления человек может быть интраназально (i.n.) иммунизирован достаточным количеством вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) hAd5-SARS-CoV-2 (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu), в результате чего индуцируется выработка нейтрализующих антител. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вакцина на основе hAd5-SARS-CoV-2 может индуцировать защитный ответ, приводящий к снижению тяжести заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию на основе hAdv5-SARS-CoV-2 можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (т.е. она представляет собой иммуногенную композицию), и она проявляет приемлемый профиль безопасности. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т.е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие иммуногенные композиции могут улучшать время до клинического улучшения и/или выздоровления у пациентов (например, госпитализированных пациентов), инфицированных SARS-CoV-2. *См.* пример 5. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления однократное (или в рамках схемы «прайм-буст» с применением одинаковой или отличающейся иммуногенной композицией) интраназальное введение вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующего RBD домен спайк-белка (см., например, предпочтительный вариант осуществления **SEQ ID NO: 15**), стимулирует выработку антител IgG в сыворотке крови, что указывает на индукцию системных ответов, а также на выработку антител IgG и IgA у млекопитающего, предпочтительно, у человека. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления животные, которые получают однократное введение высокой дозы вакцины, демонстрируют присутствие нейтрализующих антител (предпочтительно, стойких (см., например, пример 18)) к SARS-CoV-2, которое измеряют с помощью реакции нейтрализации фокусов (FRNT), и/или индукцию рекрутинга и/или пролиферации иммунных клеток, обеспечивающих врожденный и приобретенный иммунитет, в различных компартментах иммунной системы (см. пример 13B). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления введение таких иммуногенных композиций может индуцировать системный Т-клеточный иммунитет и Т-клеточный иммунитет слизистых оболочек (например, в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления ответ со сдвигом в сторону Th-1-клеток) против SARS-CoV-2 у млекопитающего, предпочтительно, у человека, что можно определить с применением проточной цитометрии (см., например, пример 17). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления иммуногенная композиция, содержащая hAd5-SARS-CoV-2, при введении в виде однократной интраназальной дозы млекопитающему может индуцировать иммунный ответ с выработкой антител к спайк-белку, который продолжается в течение по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере около 5 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 7 месяцев, по меньшей мере около 8 месяцев, по меньшей мере около 9 месяцев, по меньшей мере около 10 месяцев, по меньшей мере около 11 месяцев или по меньшей мере около 12 месяцев (один год). *См.* пример 18. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение иммуногенных композиций (например, hAd5-SARS-CoV-2, как например, вектор с RBD) может индуцировать резидентные антителосекретирующие клетки памяти в костном мозге и легких млекопитающего, предпочтительно, у человека (например, в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления резидентные антителосекретирующие клетки памяти в костном мозге и легких, которые секретируют антитела IgG и IgA к спайк-белку). *См.* пример 19. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления интраназальное введение вектора на основе репликационно-некомпетентного Ad5, экспрессирующего последовательность RBD спайк-

белка SARS-CoV-2 (см., например, предпочтительный вариант осуществления **SEQ ID NO: 15**), может вызывать гуморальные и клеточные иммунные ответы как системно, так и в участках слизистых оболочек, в особенности, в легком, которое является основной областью для инфекции и клинически проявляющегося заболевания (см., например, пример 20).

[00122] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам интраназального (i.n.) введения комбинации векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2 (например, «комбинированной композиции против SARS-CoV-2») для обеспечения профилактической терапии против SARS-CoV-2. *См.* пример 10. Компоненты комбинированной композиции против SARS-CoV-2 (например, AdE, AdD и/или hAd5-SARS-CoV-2; «AdD» относится к вектору на основе репликационно-дефектного аденовируса для применения в лечении и/или предупреждении инфицирования коронавирусом, он может представлять собой вектор, который не экспрессирует один или более антигенов коронавируса, но экспрессирует один или более антигенов отличного типа возбудителя инфекции (например, вируса гриппа); «AdE» относится к вектору на основе rdAd для применения в предупреждении и/или лечении коронавирусной инфекции, он может представлять собой вектор, который не экспрессирует экзогенный антиген (экзогенный по отношению к аденовирусу, из которого получен вектор на основе аденовируса); и «rdAD» или «rdAd» относятся к репликационно-дефектному аденовирусу) могут содержаться в одной композиции или могут содержаться в разных композициях, которые можно вводить одновременно или в разные моменты времени (например, в рамках протокола «прайм-буст») и в одну и ту же или в разные области организма субъекта (например, млекопитающего, предпочтительно, человека). Предпочтительные протоколы «прайм-буст» включают в себя введение первой композиции млекопитающему, предпочтительно, человеку, после введения второй композиции спустя соответствующий период времени (в соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления спустя период от семи до 21 суток, предпочтительно, спустя 7 суток) (т.е. раздельное введение первой и второй композиций), причем первая и вторая композиции содержат одинаковые или отличающиеся векторы на основе rdAd против SARS-CoV-2. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления комбинированные композиции против SARS-CoV-2 способны индуцировать иммунный ответ с выработкой нейтрализующих антител, иммунный ответ с выработкой IgA, и/или клеточный иммунный ответ, и/или другой(другие) ответ(ответы), раскрытые в данном документе (например, для избежания госпитализации или сокращения времени госпитализации для пациента с Covid-19),

против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, предпочтительно, у человека, которому вводят указанную(указанные) иммуногенную(иммуногенные) композицию(композиции). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления комбинированную композицию против SARS-CoV-2 можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляет собой иммуногенную композицию), и она проявляет приемлемый профиль безопасности. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т.е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления данные демонстрируют, что комбинированную композицию против SARS-CoV-2 можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00123] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинированная композиция против SARS-CoV-2 может содержать: a) вектор на основе rdAd, у которого отсутствует кодирующая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, отличный от аденовирусного; b) вектор на основе rdAd, содержащий экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2 (т.е. hAd5-SARS-CoV-2), необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2; c) вектор на основе rdAd, содержащий экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2; d) комбинацию векторов из a) и b); e) комбинацию векторов из b) и c); f) комбинацию любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c) и/или g) комбинацию двух разных типов векторов на основе rdAd из b) (т.е. hAd5-SARS-CoV-2), причем каждый тип содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого по меньшей мере одним другим типом вектора hAd5-SARS-CoV-2 в комбинации («поливалентная вакцина против COVID-19»). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления компоненты комбинированной композиции против SARS-CoV-2 могут содержать один или оба из AdE и/или AdD и/или один или более типов hAd5-SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинированная композиция против SARS-CoV-2 может содержать первую композицию, содержащую AdE и/или AdD, которую вводят человеку с последующим введением второй композиции, содержащей по меньшей мере один тип hAd5-SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинированная

композиция против SARS-CoV-2 может содержать по меньшей мере два типа hAd5-SARS-CoV-2, причем каждый тип hAd5-SARS-CoV-2 содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другим(другими) типом(типами) векторов hAd5-SARS-CoV-2 в комбинации. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинированная композиция против SARS-CoV-2 может содержать первый тип hAd5-SARS-CoV-2, экспрессирующий первый антиген SARS-CoV-2, и второй тип hAd5-SARS-CoV-2, кодирующий второй антиген SARS-CoV-2, причем второй антиген SARS-CoV-2 отличается от первого антигена SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления комбинированная композиция против SARS-CoV-2 может содержать первую композицию, содержащую AdE, AdD и/или первый тип hAd5-SARS-CoV-2, которую вводят человеку, причем за этим следует введение второй композиции, содержащей по меньшей мере один второй тип hAd5-SARS-CoV-2, отличный от первого типа hAd5-SARS-CoV-2 (или первый в случае, когда первая композиция представляет собой AdE или AdD), спустя соответствующий период времени (в соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления спустя период от семи до 21 суток, предпочтительно, спустя 7 суток) (т.е. раздельное введение первой и второй композиций).

[00124] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к иммуногенным композициям, содержащим AdD векторы, и к способам интраназального (i.n.) введения AdD векторов (т.е. вирусных частиц репликационно-дефектного аденовируса 5 типа (Ad5) с ΔE1E3, кодирующего антиген патогена, полученный из возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2, например, вируса гриппа, как например, NasoVAX, который представляет собой Ad-вектор (Ad5), экспрессирующий антиген гемагглютинина вируса гриппа (HA), описанный, например, в заявке на патент США с серийным номером 16/840723, поданной 6 апреля 2020 года, согласно которой испрашивается приоритет заявки на патент США с серийным номером 62/830444, поданной 06 апреля 2019 года и опубликованной в виде документа US 2020/0316188, при этом каждый из этих документов вместе со всеми источниками, цитируемыми в каждой из этих заявок и публикаций, включен в данный документ посредством ссылки и раскрывает получение NasoVAX; см. также патенты США №№ 6706693; 6716823; 6348450 и патентные публикации США №№ 2003/0045492; 2004/0009936; 2005/0271689; 2007/0178115 и 2012/0276138, которые могут относиться к вектору(векторам) на основе аденовируса, подготовленным для для введения млекопитающему, которые могут содержать и экспрессировать антиген вируса гриппа, при этом каждый из этих документов со всеми источниками, цитируемыми в них,

включен в данный документ посредством ссылки) для обеспечения профилактической терапии против SARS-CoV-2 (при этом стоит отметить, что несмотря на то, что NasoVAX представляет собой конкретный продукт, в случаях, когда в настоящем раскрытии используют термин «NasoVAX», квалифицированный специалист может толковать его как конкретный продукт, но его также можно толковать в широком смысле как Ad-вектор (Ad5), преимущественно, вектор на основе Ad5 с E1 и/или E3, экспрессирующий антиген гемагглютинина вируса гриппа (HA)). В соответствии с такими вариантами осуществления AdD вектор может индуцировать врожденный иммунный ответ, предпочтительно, врожденный иммунный ответ как против SARS-CoV-2, так и против патогена, ассоциированного с экспрессируемым экзогенным антигеном с AdD вектора. Например, NasoVAX (или в более широком смысле иммуногенная композиция, содержащая AdD вектор, экспрессирующий антиген(антигены)) вируса гриппа, можно применять для индукции иммунного ответа как против вируса гриппа, так и против коронавируса, в том числе SARS-CoV-2. Таким образом, AdD представляет собой двойную вакцину, индуцирующую врожденный иммунный ответ против двух возбудителей респираторных инфекций и защитный адаптивный иммунный ответ против экспрессируемого антигена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие иммуногенные композиции можно вводить пациентам, уже инфицированным SARS-CoV-2, и они могут улучшать время до клинического улучшения и/или выздоровления. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композицию, содержащую AdD, можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляет собой иммуногенную композицию) с приемлемым профилем безопасности. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т.е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления данные демонстрируют, что композицию с AdD можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления NasoVAX можно применять в качестве терапевтического средства для ранних фаз инфекции или в качестве сопутствующей терапии для COVID-19, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления в комбинации с противовирусными средствами прямого действия (например, хлорохин, азитромицин). *См.* пример 7. В какой-то момент лекарственное вещество может быть преобразовано в продукт, в котором вводят только вектор (например, без трансгена, как в AdE). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления NasoVAX может являться эффективным в снижении показателей частоты поступления в ICU

(отделение интенсивной терапии) и искусственной вентиляции легких у пациентов с ранним началом COVID-19, и/или может снижать тяжесть COVID-19 у пациентов с ранним началом COVID-19, которые требуют госпитализации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после введения NasoVAX субъектам может происходить снижение экспрессии воспалительных цитокинов, таких как IL-1α, IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, MCP-1, фактор некроза опухолей-альфа (TNF-α), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и/или RANTES (CCL5) (см., например, пример 2), и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления его можно применять для диагностики COVID-19 и/или прогнозирования выздоровления от него, а также можно применять для коррекции протоколов лечения (например, методов лечения, отличных от применения NasoVAX) соответствующим образом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повышение уровней MCP1 и/или RANTES вскоре после введения NasoVAX можно применять для прогнозирования (например, в качестве маркера) выздоровления от COVID-19 и ослабления симптомов. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т.е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления данные демонстрируют, что NasoVAX можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления такую иммуногенную композицию можно вводить повторно (например, в виде сезонной вакцины, которую вводят около один раз каждые 11-14 месяцев) без индукции существенного иммунного ответа против самого вектора на основе аденовируса. *См.* пример 9.

[00125] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к композициям вакцины, доставляемой в векторе на основе аденовируса (например, AdD, NasoVAX), которые являются стабильными в течение около 3 месяцев при температуре окружающей среды, как например, при комнатной температуре (например, 15-30°C, предпочтительно 20-25°C). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие композиции вакцины, доставляемой в векторе на основе аденовируса, можно хранить или транспортировать без потребности в замораживании или специфических условиях хранения. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие композиции вакцины, доставляемой в векторе на основе аденовируса, могут быть способны к индукции иммунного ответа против инфицирования вирусом SARS-CoV-2 (пандемическим штаммом коронавируса)

и/или для ослабления симптомов заболевания COVID-19, и их можно транспортировать непосредственно к потребителю для введения пациентам (предпочтительно, для интраназального введения). *См.* пример 8.

[00126] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, как показано в примере 2 в данном документе, введение AdE мышам снижало экспрессию определенных цитокинов, которые, как известно, вовлечены в развитие и симптомы инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами, такими как вирус гриппа. Например, было продемонстрировано, что у неинфицированных мышей (вирусом гриппа) через 25 суток после введения AdE проявлялось повышение экспрессии моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1 (CCL2)), интерферона гамма (IFN-γ) и RANTES (CCL5). Через 28 суток после введения AdE такие неинфицированные мыши демонстрировали повышенную экспрессию MCP-1 и IFN-γ, а также снижение экспрессии IL-12. Мышей подвергали вторичному заражению вирусом гриппа на 3 сутки после введения AdE, было обнаружено, что мыши демонстрируют пониженную экспрессию IL-1α, IL-6, IL-12, MCP-1, фактора некроза опухолей альфа (TNF-α), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и RANTES. В День шесть (6) после введения AdE инфицированные мыши демонстрировали пониженную экспрессию IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, MCP-1 и GM-CSF и повышенную экспрессию воспалительного белка макрофагов 1 альфа (MIP-1α (CCL3)) и RANTES (CCL5). Эти результаты соответствуют развитию «цитокинового шторма» во время инфекции SARS-CoV-2. Следовательно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления для предупреждения и/или лечения инфекции SARS-CoV-2, например, посредством ингибирования развития или подавления цитокинового шторма, иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 вводят человеку с одним или более противоцитокиновыми реактивами) (например, одним или более реактивами против IL-1α, одним или более реактивами против IL5, одним или более реактивами против IL-6, одним или более реактивами против IL-12, одним или более реактивами против IL-17, одним или более реактивами против MCP-1, одним или более реактивами против TNF-α, одним или более реактивами против GM-CSF и/или одним или более реактивами против RANTES. *См.* пример 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов не будут включать в себя один или более реактивов против MIPα и/или один или более реактивов против RANTES. Иллюстративные противоцитокиновые реактивы, которые можно применять, как описано в данном документе, могут включать в себя, например, любой из представленных в

таблице 1 в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие противоцитокиновые реактивы можно вводить с иммуногенной композицией против SARS-CoV-2 в один и тот же момент времени (т.е. одновременно) или, по существу, в один и тот же момент времени посредством подходящего пути, соответствующего каждому средству (например, интраназальное введение иммуногенной композиции против SARS-CoV-2 и подкожная инъекция для противоцитокинового(противоцитокиновых) реактива(реактивов)), в эффективных количествах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов можно вводить совместно с композицией против SARS-CoV-2, и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов впоследствии вводят в виде отдельных активных средств. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления комбинация композиции(композиций) против SARS-CoV-2 и одного или более противоцитокиновых реактивов может быть полезной для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляет собой иммуногенную композицию) с приемлемым профилем безопасности и с облегчением симптомов, связанных с неблагоприятными воздействиями цитокинов, которые испытывают некоторые пациенты (например, вышеупомянутый цитокиновый шторм). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, он представляет собой защитный и/или лечебный иммунный ответ (т.е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления комбинацию композиции(композиций) против SARS-CoV-2 и одного или более противоцитокиновых реактивов можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00127] Как описано в данном документе, иммуноген S-белка (спайк-белка), его фрагменты и варианты, описанные в данном документе, содержат один или более эпитопов, которые вызывают или индуцируют иммунный ответ, предпочтительно, защитный иммунный ответ, который может представлять собой гуморальный ответ, ответ с выработкой IgA в слизистых оболочках и/или клеточно-опосредованный иммунный ответ. Защитный иммунный ответ может проявляться по меньшей мере в одном из следующего: предупреждение инфицирования хозяина коронавирусом; модификация или ограничение инфекции; помощь, улучшение, усиление или стимуляция выздоровления хозяина от инфекции и создание иммунологической памяти, которая будет предупреждать или ограничивать последующее инфицирование коронавирусом. Гуморальный ответ может включать в себя выработку антител, которые

нейтрализуют инфекционность, лизируют вирус и/или инфицированную клетку, облегчают удаление вируса клетками-хозяевами (например, облегчают фагоцитоз) и/или связывают вирусный антигенный материал и облегчают его удаление. Ответ с выработкой антител также может включать в себя ответ слизистых оболочек, причем ответ слизистых оболочек вызывает или предполагает индукцию специфического ответа слизистых оболочек с выработкой IgA. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлен способ индукции комплексного защитного иммунного ответа слизистых оболочек, гуморального и/или клеточно-опосредованного защитного иммунного ответа против инфекции SARS-CoV-2 у субъекта-человека.

[00128] В данном документе представлены фармацевтически приемлемые композиции (которые также могут называться составами), подходящие и/или выполненные с возможностью интраназального введения субъекту-млекопитающему, и которые способны к индукции иммунного ответа против антигена (например, иммуногена) и, необязательно, для индукции защитного иммунного ответа (т.е. в качестве вакцины). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтический состав представляет собой иммуногенную композицию, которая при введении индуцирует иммунный ответ против антигена у субъекта-млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтический состав представляет собой композицию вакцины или терапевтическую композицию, способную к индукции защитного иммунного ответа у субъекта-млекопитающего, который является защитным против чужеродных возбудителей инфекции, и в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления он индуцирует или стимулирует защитный ответ против инфекции SARS-CoV-2.

[00129] *Определения*

[00130] Используемые в контексте данного документа термины в форме единственного числа, как это принято в патентных документах, включают в себя один или более чем один независимо от любых других случаев использования или применений выражений «по меньшей мере один» или «один или более».

[00131] Используемый в контексте данного документа термин «или» относится к неисключительному или, при котором «A или B» включает в себя «A, а не B», «B, а не A» и «A и B», если не указано иное.

[00132] Используемый в контексте данного документа термин «около» относится к количеству, которое является приблизительно, примерно, почти или приближенно равным или

является равным указанному количеству, например, указанное количество плюс/минус около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1%.

[00133] Композиции, составы и способы согласно настоящему изобретению могут содержать, состоять, по существу, из или состоять из компонентов и ингредиентов согласно настоящему изобретению, а также других ингредиентов, описанных в данном документе. В контексте данного документа выражения «состоящий, по существу, из» и «состоит, по существу, из» означают, что композиции, составы и способы могут включать дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты, но только если дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты не меняют существенно основные и новые характеристики заявленных композиций, составов и способов. Такие термины, как «содержит», «содержится», «содержащий» и т.п., являются синонимичными таким терминам, как «в том числе» «содержащий» или «характеризующийся» и являются включительными или открытыми терминами, которые не исключают дополнительные, не перечисленные элементы, компоненты или ингредиенты или стадии. В связи с этим, целью настоящего изобретения не является включение в настоящее изобретение любого ранее известного продукта, процесса получения продукта или способа применения продукта, таким образом заявитель(заявители) сохраняет(сохраняют) за собой право на настоящее изобретение и тем самым сообщает(сообщают) об отказе от прав на любой ранее известный продукт, процесс или способ. Стоит дополнительно отметить, что не предполагается, что настоящее изобретение включает в объем настоящего изобретения какой-либо продукт, процесс, или получение продукта, или способ применения продукта, которые не соответствуют письменному описанию, критериям законности, и/или ясности или определенности согласно законодательству США/USPTO (например, §112(a), (b) статьи 35 USC) или требованиям достаточности EPC/EPO (например, статья 83 EPC), вследствие чего заявитель(заявители) сохраняет(сохраняют) за собой права на настоящее изобретение и тем самым сообщает(сообщают) об отказе от прав на любой объект изобретения, который не соответствует письменному описанию, критериям законности, и/или ясности/определенности, и/или достаточности и/или который представляет собой ранее описанный или известный продукт, процесс получения продукта или способ применения продукта. При практическом осуществлении настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы оно соответствовало статье 53(c) EPC и правилу 28(b) и (c) EPC. Сохранены все права на отказ от любых вариантов осуществления, которые являются объектом любого(любых) выданного(выданных) патента(патентов) заявителя в цепочке от данной заявки, или в любой

другой цепочке, или в любой другой ранее поданной заявке любой третьей стороны. Сохранены все права на отказ от изложенного в любых ранее поданных, но не опубликованных патентных заявках или патентах (причем «ранее поданный, но не опубликованный ранее», относится к дате подачи, соответствующей настоящему раскрытию). Ничто в данном документе не следует толковать как обязательство. Ни какое-либо цитирование, ни идентификация какого-либо документа в данной заявке не является признанием того, что такой документ является доступным в качестве предшествующего уровня техники.

[00134] Также следует отметить, что в контексте данного описания и прилагаемой формулы изобретения термин «выполненный» описывает систему, аппарат или другую структуру, которая сконструирована или сконфигурирована для выполнения конкретной задачи или принятия конкретной конфигурации. Термин «выполненный» можно применять взаимозаменяемо с другими подобными фразами, такими как расположенный и сконфигурированный, сконструированный и расположенный, адаптированный и сконфигурированный, адаптированный, сконструированный, произведенный и расположенный и т.п.

[00135] В контексте данного документа «адъювант» относится к веществу, которое усиливает иммунный ответ организма на антиген. В соответствии с вариантами осуществления данный моновалентный фармацевтический состав против вируса гриппа представляет собой безадъювантную композицию вакцины.

[00136] Под «введением» подразумевается введение субъекту иммуногенной композиции или композиции вакцины согласно настоящему раскрытию; этот термин также может относиться к действию, заключающемуся в обеспечении субъекта композицией согласно настоящему раскрытию (например, посредством назначения или введения).

[00137] Используемый в контексте данного документа термин «температура окружающей среды» представляет собой температуру воздуха для хранения данного моновалентного фармацевтического состава против вируса гриппа. В соответствии с вариантами осуществления температура окружающей среды представляет собой комнатную температуру, как например, выбранную из любой температуры в пределах диапазона от около 15 до 30°C, предпочтительно, от около 20 до 25°C.

[00138] Термин «терапевтически эффективное количество», используемый в контексте данного документа, относится к такому количеству вводимого соединения, которое будет индуцировать комплексный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ. Данный термин также относится к количеству данных

композиций, которые будут в некоторой степени ослаблять или предупреждать один или более из симптомов состояния, подлежащего лечению. Применительно к состояниям/заболеваниям, лечение которых можно осуществлять непосредственно с использованием композиции согласно настоящему раскрытию, терапевтически эффективное количество относится к такому количеству, которое оказывает воздействие, заключающееся в предупреждении возникновения состояния/заболевания у млекопитающего, которое может быть предрасположено к заболеванию, но еще не испытывает состояние/заболевание или проявляет симптомы состояния/заболевания (профилактическое лечение), в облегчении симптомов состояния/заболевания, уменьшении степени выраженности состояния/заболевания, стабилизации (например, отсутствия ухудшения) состояния/заболевания, предупреждении распространения состояния/заболевания, задержке или замедлении развития состояния/заболевания, ослаблении или временном ослаблении состояния/заболевания и их комбинации. Термин «эффективное количество» относится к такому количеству вводимого соединения, которое будет обеспечивать реакцию (например, защитный иммунный ответ и/или реакцию, которая обеспечивается вакциной), которая является отличной от реакции, которая будет происходить в отсутствие соединения.

[00139] Используемые в контексте данного документа термины «процентная (%) гомология» или «процентная (%) идентичность» и их грамматические варианты в контексте двух последовательностей (например, белковых последовательностей) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям (т.е. их фрагментам), которые характеризуются по меньшей мере около 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и/или 100% идентичностью (гомологией) нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, что измеряют с применением одного из широко известных алгоритмов для выравнивания последовательностей или посредством визуальной проверки. Неограничивающим примером математического алгоритма, применяемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм из Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2264-2268, модифицированный, как указано в Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 5873-5877. Еще одним примером математического алгоритма, применяемого для сравнения последовательностей, является алгоритм из Myers & Miller, CABIOS 1988; 4: 11-17. Такой алгоритм встроен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для

сравнения аминокислотных последовательностей можно применять таблицу веса остатков PAM120, штраф за продолжение гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4. Еще одним пригодным алгоритмом для идентификации участков локального сходства последовательностей и локального выравнивания последовательностей является алгоритм FASTA, который описан в Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2444-2448. Предпочтительным для применения является программное обеспечение WU-BLAST (BLAST Вашингтонского университета) версии 2.0. Исполняемые программы WU-BLAST версии 2.0 для нескольких платформ UNIX можно скачать с ftp://blast.wustl.edu/blast/executables. Эта программа имеет в основе WU-BLAST версии 1.4, которая, в свою очередь, основана на общедоступной NCBI-BLAST версии 1.4 (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul et al., Journal of Molecular Biology 1990; 215: 403-410; Gish & States, 1993; Nature Genetics 3: 266-272; Karlin & Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877; причем все из указанных источников включены в данный документ посредством ссылки). Кроме того, исходя из этого определения, когда в настоящем раскрытии идет речь о процентной (%) гомологии, читатель также может понимать, что речь идет о процентной (%) идентичности. Кроме того, следует понимать, что белки согласно настоящему изобретению могут отличаться от точных последовательностей, проиллюстрированных и описанных в настоящем раскрытии. Таким образом, настоящее изобретение предусматривает делеции, добавления и замены в представленных последовательностей при условии, что последовательности функционируют в соответствии со способами согласно настоящему изобретению. В связи с этим, особенно предпочтительные замены обычно будут являться консервативными по своей природе, т.е. такими заменами, которые происходят в пределах семейства аминокислот. Например, аминокислоты обычно делят на четыре семейства: (1) кислые--аспартат и глутамат; (2) основные--лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные--аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные--глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Достаточно предсказуемо, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин или наоборот; аспартата на глутамат или наоборот; треонина на серин или наоборот или подобная консервативная замена аминокислоты на структурно близкую аминокислоту не будет оказывать значительное воздействие на биологическую активность. Таким образом, белки, имеющие практически такую же аминокислотную последовательность, что и проиллюстрированные и описанные последовательности, но имеющие незначительные

аминокислотные замены, которые не оказывают существенного воздействия на иммуногенность белка, находятся в пределах объема настоящего изобретения. В рамках настоящего изобретения последовательности нуклеиновой кислоты, относящиеся к таким белкам, будут аналогичным образом варьировать относительно последовательности, точно раскрытой в данном документе. Таким образом, настоящее изобретение охватывает нуклеотидные последовательности, кодирующие функционально и/или антигенно эквивалентные варианты и производные антигенов или белков, раскрытых в данном документе, и их функционально эквивалентные фрагменты. Эти функционально эквивалентные варианты, производные и фрагменты проявляют способность к сохранению антигенной активности. Например, изменения в последовательности ДНК, которые не изменяют кодируемую аминокислотную последовательность, а также те, которые приводят в результате к консервативным заменам аминокислотных остатков, делециям или добавлениям одной или более аминокислот и замене аминокислотных остатков на аминокислотные аналоги, являются такими, которые не будут оказывать значительное воздействие на свойства кодируемого полипептида. Консервативными аминокислотными заменами являются глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; серин/треонин/метионин; лизин/аргинин и фенилаланин/тирозин/триптофан.

[00140] Предполагается, что используемый в контексте данного документа термин «аденовирус человека» охватывает все аденовирусы человека из семейства Adenoviridae, которое включает в себя членов рода Mastadenovirus. На данный момент было идентифицировано более пятидесяти одного человеческого серотипа аденовирусов (см., например, Fields et al., Virology 2, Ch. 67 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers)). Аденовирусы могут относиться к серогруппе A, B, C, D, E или F. Аденовирус человека может представлять собой серотип 1 (Ad 1), серотип 2 (Ad2), серотип 3 (Ad3), серотип 4 (Ad4), серотип 5 (Ad5), серотип 6 (Ad6), серотип 7 (Ad7), серотип 8 (Ad8), серотип 9 (Ad9), серотип 10 (Ad10), серотип 11 (Ad11), серотип 12 (Ad12), серотип 13 (Ad13), серотип 14 (Ad14), серотип 15 (Ad15), серотип 16 (Ad16), серотип 17 (Ad17), серотип 18 (Ad18), серотип 19 (Ad19), серотип 19a (Ad19a), серотип 19p (Ad19p), серотип 20 (Ad20), серотип 21 (Ad21), серотип 22 (Ad22), серотип 23 (Ad23), серотип 24 (Ad24), серотип 25 (Ad25), серотип 26 (Ad26), серотип 27 (Ad27), серотип 28 (Ad28), серотип 29 (Ad29), серотип 30 (Ad30), серотип 31 (Ad31), серотип 32 (Ad32), серотип 33 (Ad33), серотип 34 (Ad34), серотип 35 (Ad35), серотип 36 (Ad36), серотип 37 (Ad37), серотип 38 (Ad38), серотип 39 (Ad39), серотип 40 (Ad40), серотип 41 (Ad41), серотип 42 (Ad42), серотип

43 (Ad43), серотип 44 (Ad44), серотип 45 (Ad45), серотип 46 (Ad46), серотип 47 (Ad47), серотип 48 (Ad48), серотип 49 (Ad49), серотип 50 (Ad50), серотип 51 (Ad51) или их комбинации, но не ограничивается этими примерами. В соответствии с определенными вариантами осуществления аденовирус представляет собой серотип 5 (Ad5).

[00141] В контексте данного документа «иммуногенная композиция» относится к композиции, как правило, содержащей по меньшей мере один тип вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса, который раскрыт в данном документе, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, которая при введении хозяину индуцирует и/или усиливает иммунный ответ против антигена и/или возбудителя инфекции, против которого направлен такой иммунный ответ (например, против антигена, кодируемого вектором на основе репликационно-дефектного аденовируса, и/или ответ, который может индуцироваться/усиливаться «пустым» вектором на основе hAd5). «Вакцина» относится к такой иммуногенной композиции, которая при введении индуцирует защитный иммунный ответ против возбудителя инфекции (например, защищает хозяина от вторичного заражения возбудителем инфекции). В соответствии с определенными вариантами осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) может содержать один или более вирусных векторов, содержащих и/или экспрессирующих антиген, вместе с другими компонентами иммуногенной композиции (например, вакцины), подходящими для введения хозяину-млекопитающему, в том числе, например, один или более адъювантов, соединений, обеспечивающих медленное высвобождение, растворителей, буферов и т.д. В соответствии с определенными вариантами осуществления иммуногенная композиция и/или вакцина могут содержать белковый, и/или углеводный, и/или липидный, и/или другой антиген, в том числе, без ограничения, один или более убитых антигенов (например, убитый или полностью инактивированный вирус) или живой аттенуированный антиген (например, аттенуированный вирус). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенная(иммуногенные) композиция(композиции) и/или вакцина(вакцины) улучшают иммунные ответы на любой антиген независимо от источника антигена или его функции.

[00142] В контексте данного документа «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителю или разбавителю, который не вызывает существенного раздражения у субъекта-человека и не нарушает биологическую активность и свойства вводимых иммуногенных композиций или композиций вакцины.

[00143] Используемый в контексте данного документа термин «сероконверсия» определен как 4-кратное или большее повышение титров нейтрализующих антител в сыворотке крови

(например, антитела к S1/S2 или антитела к RBD S1) после вакцинации (например, введения данной иммуногенной композиции или композиции вакцины).

[00144] В контексте данного документа термин «серопозитивный» означает того, у кого может присутствовать измеримый (например, который может быть выявлен в *in vitro* анализе) уровень нейтрализующего антитела в сыворотке крови после вакцинации (например, введения данной иммуногенной композиции).

[00145] Используемый в контексте данного документа термин «защита» указывает на то, что был вызван защитный иммунный ответ, и защитный иммунный ответ может проявляться по меньшей мере в одном из следующего: предупреждение инфицирования хозяина коронавирусом; модификация или ограничение инфекции; помощь, улучшение, усиление или стимуляция выздоровления хозяина от инфекции и создание иммунологической памяти, которая будет предупреждать или ограничивать последующее инфицирование коронавирусом. Гуморальный ответ может включать в себя выработку антител, которые нейтрализуют инфекционность, лизируют вирус и/или инфицированную клетку, облегчают удаление вируса клетками-хозяевами (например, облегчают фагоцитоз) и/или связывают вирусный антигенный материал и облегчают его удаление. Ответ с выработкой антител также может включать в себя ответ слизистых оболочек, причем ответ слизистых оболочек вызывает или предполагает индукцию специфического ответа слизистых оболочек с выработкой IgA. Используемый в контексте данного документа термин «серологически защищенный» означает субъекта после вакцинации, который защищен от инфицирования вследствие образования нейтрализующих антител в сыворотке крови. В популяции он называется процентом (%) серологически защищенных индивидов (например, 50%). В соответствии с вариантами осуществления данные иммуногенные композиции и способы применения обеспечивают серологическую защиту субъекта-млекопитающего, такого как субъект-человек, от инфицирования SARS-CoV-2. Продолжительность защиты может составлять от по меньшей мере около одного месяца до по меньшей мере около 14 месяцев. Серологическая защита может длиться по меньшей мере около 1 месяц, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 10 месяцев, 12 месяцев или по меньшей мере около 13 месяцев.

[00146] Термины «лечить», «осуществление лечения» и «лечение» представляют собой подход к получению благоприятных или желательных клинических результатов. В частности, благоприятные или желательные клинические результаты включают в себя, без ограничения, облегчение симптомов, уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизацию (например, отсутствие ухудшения) заболевания, задержку или замедление развития заболевания,

значительное предотвращение распространения заболевания, ослабление или временное ослабление болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), либо выявляемые, либо не выявляемые. Кроме того, «лечить», «осуществление лечения» и «лечение» также могут означать продление жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии получения лечения, и/или лечение может являться терапевтическим в плане частичного или полного излечения от заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. Используемые в контексте данного документа термины «осуществлять профилактическое лечение» или «профилактическое лечение» относятся к полному, существенному или частичному предупреждению заболевания/состояния или одного или более его симптомов у хозяина. Аналогично, «задержка появления состояния» также может быть включена в «профилактическое лечение» и относится к действию, заключающемуся в повышении времени до фактического появления состояния у пациента, который является предрасположенным к состоянию.

[00147] В данном раскрытии «вакцина» преимущественно относится к композиции, содержащей вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит и экспрессирует антиген коронавируса или другого возбудителя инфекции и/или у которого отсутствует кодирующая последовательность для экзогенного антигена (например, пустой Ad-вектор), вместе с другими компонентами состава вакцины, в том числе, например, с адъювантами, соединениями, обеспечивающими медленное высвобождение, растворителями и т.д., для индукции защитного иммунного ответа. Такие композиции в объеме настоящего раскрытия, содержащие вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит и экспрессирует антиген коронавируса или другого возбудителя инфекции и/или у которого отсутствует кодирующая последовательность для экзогенного антигена (например, пустой Ad-вектор), вместе с другими компонентами состава вакцины, в том числе, например, с адъювантами, соединениями, обеспечивающими медленное высвобождение, растворителями и т.д., также могут быть предназначены для индукции иммунного ответа и находятся в рамках обсуждаемых в данном документе «иммуногенных композиций». В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения вакцины или иммуногенные композиции могут улучшать иммунные ответы на любой антиген независимо от источника антигена или его функции.

[00148] Упоминаемый в данном документе «вектор» несет генетический код для антигена или его часть, тем не менее, сам он не является антигеном. В соответствии с иллюстративным аспектом вектор может включать в себя вирусный вектор, такой как вектор на основе

аденовируса. Упоминаемый в данном документе «антиген» означает вещество, которое индуцирует и/или усиливает специфический иммунный ответ против антигена и/или возбудителя инфекции, экспрессирующего такой антиген, у субъекта, в том числе у людей и/или животных. Антиген может включать целый организм, убитый, аттенуированный или живой; субъединицу или часть организма; рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами; часть или фрагмент ДНК, способные к индукции иммунного ответа после презентирования животному-хозяину; полипептид, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. В соответствии с различными аспектами антиген представляет собой вирус, бактерию, субъединицу организма, аутоантиген или раковый антиген.

[00149] В данном документе диапазоны могут быть выражены в виде диапазона от около одного конкретного значения и/или до около другого конкретного значения. Если выражен такой диапазон, другой аспект включает в себя диапазон от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогично, если значения выражены в виде приближенных значений посредством использования условия «около» или «приблизительно», будет понятно, что конкретное значение образует еще один аспект. Будет также понятно, что конечные точки каждого из диапазонов являются значимыми как в связи с другой конечной точкой, так и независимо от другой конечной точки. Предполагается, что диапазоны (например, 90-100%) включают в себя сам диапазон, а также каждое независимое значение в пределах диапазона, как если бы каждое значение было перечислено отдельно.

[00150] *Иммуногенные композиции и вакцины*

[00151] В данном документе представлен вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса («rdAd») и иммуногенные композиции, содержащие его, (в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, составы вакцины), подходящие и/или выполненные с возможностью введения субъекту-млекопитающему для предупреждения и/или лечения коронавирусной инфекции («фармацевтические составы против коронавируса»), предпочтительно, при этом коронавирус представляет собой SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в композициях и со способами, описанными в данной заявке, можно применять любой вектор на основе аденовируса (Ad-вектор), который известен квалифицированному специалисту в данной области техники и подготовлен для введения млекопитающему и который может содержать и экспрессировать антиген коронавируса, предпочтительно, антиген SARS-CoV-2, но также может не экспрессировать экзогенный (т.е. отличный от Ad) антиген, или может представлять собой пустой Ad-вектор (например, без трансгена экзогенного антигена). Такие Ad-векторы включают в себя любые из известных

квалифицированным специалистам в данной области техники, в том числе, без ограничения, векторы, описанные в патентах США №№ 6706693; 6716823; 6348450 и/или в патентных публикациях США №№ 2003/0045492; 2004/0009936; 2005/0271689; 2007/0178115 и/или 2012/0276138; все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В соответствии с определенными вариантами осуществления нереплицирующийся вектор на основе аденовируса (rdAd) представляет собой аденовирус человека. В соответствии с альтернативными вариантами осуществления аденовирус представляет собой бычий аденовирус, собачий аденовирус, аденовирус приматов, отличных от человека (например, шимпанзе), аденовирус кур или свиной аденовирус или аденовирус свиней. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления нереплицирующийся вирусный вектор представляет собой аденовирус человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нереплицирующиеся векторы на основе аденовирусов являются особенно подходящими для переноса генов в эукариотические клетки и разработки иммуногенной композиции (например, вакцины) и в моделях на животных.

[00152] В соответствии с определенными вариантами осуществления рекомбинантный вектор на основе аденовируса может являться нереплицирующимся или репликационно-дефицитным (RD), требующим дополнения активности E1 для репликации. В соответствии с вариантами осуществления рекомбинантный вектор на основе аденовируса может включать в себя векторы на основе дефектного по E1, дефектного по E3 и/или дефектного по E4 аденовируса или вектор на основе «выпотрошенного» («gutless») аденовируса, в котором удалены вирусные гены. Мутация в E1 повышает резерв безопасности для вектора, поскольку дефектные по E1 мутанты аденовируса являются репликационно-некомпетентными в клетках, отличных от пермиссивных. Мутация в E3 усиливает иммуногенность антигена посредством нарушения механизма, благодаря которому аденовирус снижает экспрессию молекул MHC I класса. Мутация в E4 снижает иммуногенность вектора на основе аденовируса посредством подавления экспрессии «поздних» генов, тем самым может быть обеспечена возможность повторной ревакцинации с использованием того же вектора. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления рекомбинантный вектор на основе аденовируса представляет собой вектор, дефектный по E1 и E3. Репликация вектора на основе «выпотрошенного» аденовируса требует вируса-помощника и специальной клеточной линии 293 клеток человека, экспрессирующих как E1a, так и Cre, - условий, которые не существуют в естественной среде; вектор лишен вирусных генов, таким образом, вектор в качестве носителя в иммуногенной композиции (например, вакцине) является неиммуногенным и

может быть инокулирован несколько раз для ревакцинации. Вектор на основе «выпотрошенного» аденовируса также имеет объем размером 36 т.н. для размещаемых трансгенов, тем самым обеспечивая возможность совместной доставки большого количества генов антигенов в клетки. Конкретные мотивы последовательностей, такие как мотив RGD, могут быть вставлены в H-I петлю вектора на основе аденовируса для усиления его инфекционности. Рекомбинантный аденовирус может быть сконструирован посредством клонирования конкретных трансгенов или фрагментов трансгенов в любой из векторов на основе аденовируса, таких как описанные ниже. Рекомбинантный вектор на основе аденовируса применяют для трансдукции эпидермальных клеток позвоночного животного неинвазивным способом для применения в качестве иммунизирующего средства. Вектор на основе аденовируса также можно применять для инвазивных способов введения, таких как внутривенная, внутримышечная или подкожная инъекция.

[00153] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такой вектор на основе rdAd для применения в предупреждении и/или лечении коронавирусной инфекции может представлять собой вектор, который не экспрессирует экзогенный антиген (экзогенный по отношению к аденовирусу, из которого получен вектор на основе аденовируса), причем такие векторы называются в данном документе «AdE» векторами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса для применения в лечении и/или предупреждении коронавирусной инфекции может представлять собой вектор, который не экспрессирует один или более антигенов коронавируса, но экспрессирует один или более антигенов отличного типа возбудителя инфекции (например, вируса гриппа) (называемый в данном документе «AdD»). В соответствии с определенными вариантами осуществления представлена иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе rdAd, который содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, причем векторы называются в данном документе векторами hAd5-SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенные композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать отличающийся тип таких векторов (например, AdE или AdD) отдельно или в комбинации с векторами hAd5-SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эти типы векторов могут собирательно называться «векторами на основе rdAd против SARS-CoV-2» или могут представлять собой подгруппу по меньшей мере из двух таких векторов. Иммуногенная композиция против SARS-CoV-2 (например, вакцина)

представляет собой фармацевтический состав, содержащий один или более таких векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2.

[00154] AdE вектор представляет собой вектор на основе rdAd, который не кодирует экзогенный антиген (т.е. антиген, экзогенный по отношению к аденовирусу, из которого получен вектор на основе аденовируса, например, антиген отличного типа возбудителя инфекции, такого как вирус гриппа). Такие векторы на основе hAd5 также могут называться «пустыми», при этом в них отсутствует экзогенный трансген, и/или они являются «не содержащими трансген». В соответствии с некоторыми вариантами осуществления AdE вектор может представлять собой вектор на основе Ad5 с ΔE1E3 (например, у которого отсутствует участок E1 в вирусном геноме (нуклеотиды 343-3511) и нуклеотиды 28132-30813 в участке E3). Настоящее раскрытие относится к некоторым вариантам осуществления, предусматривающим иммуногенные композиции, содержащие AdE векторы (в том числе вирусные частицы AdE), и применение таких иммуногенных композиций для предупреждения и/или лечения коронавирусной инфекции, предпочтительно, при этом коронавирус представляет собой SARS-CoV-2, и способы такого применения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие AdE векторы можно вводить совместно с одним или более другими векторами на основе rdAd против SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое совместное введение может относится к введению одной иммуногенной композиции, содержащей AdE векторы и один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2, и/или, по существу, к одновременному и/или последовательному введению нескольких иммуногенных композиций, содержащих AdE векторы, и другой иммуногенной композиции, содержащей один или более других векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2. Такие AdE векторы также можно вводить в рамках протокола «прайм-буст», при котором иммуногенную композицию, содержащую AdE, вводят до или после (например, за 7-28 суток до и/или после) введения иммуногенной композиции, содержащей один или более других типов векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам индукции (и/или усиления) иммунного ответа против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом, посредством введения (например, интраназального) эффективного количества такой(таких) композиции(композиций) (например, по меньшей мере около 10^7 инфекционных единиц (ifu) или вирусных частиц (vp) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) AdE и, в случае, если они присутствуют, по меньшей мере одного из других векторов на основе

rdAd против SARS-CoV-2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммунный ответ против SARS-CoV-2, индуцируемый или усиливаемый введением таких иммуногенных композиций, предпочтительно, начинается в течение около двадцати четырех часов после введения и, предпочтительно, длится в течение по меньшей мере около 21 суток. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления такие способы предусматривают интраназальное введение таких иммуногенных композиций в эффективном количестве (например, по меньшей мере около 10^7 ifu AdE и, в случае, если они присутствуют, по меньшей мере одного из других векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления второй вектор на основе rdAd против SARS-CoV-2 кодирует по меньшей мере один гетерологичный антиген SARS-CoV-2 и/или по меньшей мере одного другого возбудителя инфекции (например, AdD), таким образом обеспечивая двойную схему применения лекарственного средства-вакцины. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение нескольких доз AdE векторов (и/или других векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2) можно осуществлять с интервалом, составляющим около любой период из 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49 или 56 суток. Предпочтительно, такие иммуногенные композиции можно вводить интраназально. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хозяин представляет собой животное, как например, взрослого человека или ребенка, необязательно, при этом хозяин имеет нарушенную иммунологическую реактивность. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления иммунный ответ против коронавируса длится в течение по меньшей мере около 40-50 суток, и он может инициироваться повторным введением AdE с одним или более векторами против SARS-CoV-2 или без них. В данном документе также предусмотрены другие варианты осуществления таких AdE векторов, иммуногенных композиций и/или способов, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00155] AdD вектор представляет собой вектор на основе rdAd, который кодирует экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от коронавируса и/или SARS-CoV-2 (например, антиген отличного типа возбудителя инфекции, такого как вирус гриппа (например, свиного гриппа, сезонного гриппа, птичьего гриппа, гриппа H1N1 или гриппа H5N1). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления AdD вектор может представлять собой вектор на основе Ad5 с ΔE1E3, кодирующий по меньшей мере один гетерологичный (например, отличный от Ad) антиген, предпочтительно, оптимизированный для экспрессии у хозяина (например, млекопитающего). Типичные примеры антигенов, которые можно применять для

обеспечения иммунного ответа против SARS-CoV-2 с применением способов, описанных в данном документе, могут включать в себя гемагглютинин вируса гриппа, ядерный белок вируса гриппа, белок M2 вируса гриппа, C-фрагмент столбнячного токсина, защитный антиген сибирской язвы, летальный фактор сибирской язвы, гликопротеин вируса бешенства, поверхностный антиген HBV, gp 120 ВИЧ, gp 160 ВИЧ, человеческий карциноэмбриональный антиген, CSP малярии, SSP малярии, MSP малярии, pfg малярии и HSP mycobacterium tuberculosis и т.д. В соответствии с одним вариантом осуществления AdD вектор может представлять собой вектор AdNC.H1.1, кодирующий домен HA1 IFV H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NC20) (см., например, Tang et al. Expert Rev Vaccines 8: 469-481 (2009)). В соответствии с одним вариантом осуществления AdD вектор может содержать вставку гена, кодирующего антиген поверхностного белка гемагглютинина (HA) из A/California/04/2009(H1N1)-подобного штамма вируса гриппа (AdcoCA09.HA «NasoVAX»), предпочтительно, его можно производить посредством размножения в репликационно-пермиссивных PER.C6 клетках с последующей очисткой вируса от собранных инфицированных клеток и получать в виде конечного продукта, включающего в себя следующие вспомогательные вещества: Tris-HCl (pH 7,4), гистидин, сахароза, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусная кислота и этанол. Настоящее раскрытие относится к некоторым вариантам осуществления, которые предусматривают иммуногенные композиции, содержащие AdD векторы (в том числе вирусные частицы AdD), и применение таких иммуногенных композиций для предупреждения и/или лечения коронавирусной инфекции, предпочтительно, при этом коронавирус представляет собой SARS-CoV-2, и способы такого применения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие AdD векторы можно вводить совместно с одним или более другими векторами на основе rdAd против SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое совместное введение может относиться к введению одной иммуногенной композиции, содержащей AdD векторы и один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2, и/или, по существу, к одновременному и/или последовательному введению нескольких иммуногенных композиций, содержащих AdD векторы, и другой иммуногенной композиции, содержащей один или более других векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2. Такие AdD векторы также можно вводить в рамках протокола «прайм-буст», при котором иммуногенную композицию, содержащую AdD векторы (например, в виде вирусных частиц), вводят до или после (например, за 7-21 суток до и/или после) введения иммуногенной композиции, содержащей один или более других типов векторов на основе rdAd против SARS-

CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам индукции (и/или усиления) иммунного ответа против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в этом, посредством введения (например, интраназального) эффективного количества такой(таких) композиции(композиций) (например, по меньшей мере около 10^7 вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10} или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) каждого из AdD вектора и, в случае, если они присутствуют, по меньшей мере одного из других векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммунный ответ против SARS-CoV-2, индуцируемый или усиливаемый посредством введения таких иммуногенных композиций, предпочтительно, начинается в течение около двадцати четырех часов после введения и, предпочтительно, длится в течение по меньшей мере около 21 суток. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления такие способы предусматривают интраназальное введение таких иммуногенных композиций с эффективным количеством (например, по меньшей мере около 10^7 vp или ifu (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10} или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) каждого из AdD вектора и, в случае, если они присутствуют, по меньшей мере одного из других векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления второй вектор на основе rdAd против SARS-CoV-2 представляет собой AdE и/или кодирует по меньшей мере один гетерологичный антиген SARS-CoV-2 и/или по меньшей мере одного другого возбудителя инфекции, таким образом обеспечивая двойную схему применения лекарственного средства-вакцины. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение нескольких доз AdD векторов (и/или других векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2) можно осуществлять с интервалом, составляющим около любой период из 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49 или 56 суток. Предпочтительно, такие иммуногенные композиции можно вводить интраназально. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хозяин представляет собой животное, как например, взрослого человека или ребенка, необязательно, при этом хозяин имеет нарушенную иммунологическую реактивность. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления иммунный ответ против коронавируса длится в течение по меньшей мере около 40-50 суток, и он может возобновляться при повторном введении AdD с одним или более векторами против SARS-CoV-2 или без них. В данном документе также предусмотрены другие варианты осуществления таких AdD векторов,

иммуногенных композиций, содержащих их, и/или способов их применения, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00156] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к иммуногенной композиции, содержащей один или более векторов против SARS-CoV-2, которые содержат вектор на основе rdAd, содержащий экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент, причем композиция способна индуцировать выработку нейтрализующих антител к RBD спайк-белка у субъекта-млекопитающего. Предварительные исследования указывают на то, что спайк-белок через свой рецептор-связывающий домен S1 связывается с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) (Y. Wan et al.; receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS; J. Virol. doi:10.1128/JVI.00127-20; размещенная онлайн 29 января 2020 года). Обеспечение иммунного ответа против по меньшей мере RBD спайк-белка является привлекательной целью для индукции выработки нейтрализующих антител, причем спайк-белок опосредует попадание коронавируса в клетки-хозяева, вначале связываясь с рецептором хозяина (например, ACE2), а затем обеспечивая слияние мембран вируса и хозяина. Спайк-белок SARS-CoV-2 представлен в данном документе в виде **SEQ ID NO: 3** (GenBank: QHD43416.1). *См.* **фиг. 3**.

[00157] В соответствии с определенными вариантами осуществления иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит один или более антигенов коронавируса. В соответствии с определенными вариантами осуществления коронавирус представляет собой SARS-CoV-2, причем кодирующая последовательность для уханьского изолята 2019 года (SARS-CoV-2) представлена в данном документе в виде **SEQ ID NO: 1**. В соответствии с вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса содержит одну или более кодирующих последовательностей с **SEQ ID NO: 1**. Эти последовательности содержат один или более иммуногенных доменов, таких как В-клеточный и/или Т-клеточный эпитоп. В соответствии с определенными вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса содержит и/или экспрессирует (например, содержит экспрессионную кассету, кодирующую) один или более иммуногенных доменов, представленных в любой из кодируемых **SEQ ID NO: 2-20**. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса содержит и/или экспрессирует (например, содержит экспрессионную кассету,

кодирующую) **SEQ ID NO: 15** или ее вариант (т.е. по любой из последовательности RBD (аминокислоты 57-253 в **SEQ ID NO: 15** (содержащая **SEQ ID NO: 446**)), и/или сигнальной, и/или лидерной, и/или фланкирующим последовательностям). В соответствии с вариантами осуществления кодирующая последовательность вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса кодирует по меньшей мере один или более В-клеточных эпитопов, один или более $CD8^+$ Т-клеточных эпитопов и/или один или более $CD4^+$ Т-клеточных эпитопов. Специалисту в данной области техники понятно, как идентифицировать такие эпитопы в более крупной последовательности с применением методик биоинформатики, таких как общедоступные инструменты, доступные в базе данных иммунных эпитопов (IEDB), с помощью *in vitro* анализа на основе PBMC от положительных в отношении инфекции субъектов в сочетании со сканированием последовательности антигена с помощью коротких линейных пептидов или с помощью *in vitro* анализа на основе сыворотки крови с использованием сканирования последовательности антигена с помощью коротких линейных или конформационных пептидов.

[00158] В соответствии с вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует антиген с **SEQ ID NO: 3**, **SEQ ID NO: 12**, **SEQ ID NO: 15**, аминокислотную последовательность RBD (аминокислоты 57-253 в **SEQ ID NO: 15** (**SEQ ID NO: 446**)) или их иммуногенный фрагмент. В соответствии с вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует спайк-белок SARS-CoV-2, домен S1, домен S2 или их иммуногенный фрагмент. В соответствии с вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для спайк (S) белка (например, как в предпочтительных вариантах осуществления **SEQ ID NO: 3** и **SEQ ID NO: 12**), домена S1 (например, как в предпочтительном варианте осуществления **SEQ ID NO: 13**) спайк-белка или их иммуногенного фрагмента (например, как в предпочтительных вариантах осуществления **SEQ ID NO: 14-17** (**фиг. 17B-21**)). В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления кодирующая последовательность кодирует последовательность RBD, содержащую аминокислоты 57-253 в **SEQ ID NO: 15** (**SEQ ID NO: 446**). В соответствии с определенными вариантами осуществления такие кодируемые последовательности содержат лидерную сигнальную последовательность либо в нативной форме, либо в форме рекомбинантной последовательности, содержащей сигнальную последовательность pTA

(например, предпочтительный вариант осуществления MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGS (**SEQ ID NO: 427**)).

[00159] В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 3**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией с **SEQ ID NO: 3**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 3**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 12**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 12**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 12**. В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 13**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 13**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 13**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 14**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 14**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или

идентичностью с **SEQ ID NO: 14**. В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 15**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 15**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 15**. В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 16**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 16**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 16**. В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 17**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 17**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 17**. В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 446**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 446**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 446**. В соответствии с определенными

предпочтительными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в любой из **SEQ ID NO: 412-417**, **SEQ ID NO: 438-445, SEQ ID NO: 460** и **SEQ ID NO: 475-476**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 412-417, SEQ ID NO: 438-445, SEQ ID NO: 460** и **SEQ ID NO: 475-476**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с любой из **SEQ ID NO: 412-420**.

[00160] В соответствии с определенными другими вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для домена S1 спайк-белка (например, **SEQ ID NO: 13**) или его иммуногенного фрагмента. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодирующая последовательность кодирует по меньшей мере аминокислотные остатки 331-527 в **SEQ ID NO: 3**, **SEQ ID NO: 12** или **SEQ ID NO: 13**, причем нумерация положений аминокислот основывается на полноразмерной последовательности спайк-белка. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с: аминокислотными остатками 331-527 в **SEQ ID NO: 3**; **SEQ ID NO: 12** или **SEQ ID NO: 13**; причем нумерация положений аминокислот основывается на полноразмерной последовательности спайк-белка (**фиг. 3**).

[00161] В соответствии с определенными вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для домена S1 спайк-белка (например, **SEQ ID NO: 13**; **фиг. 17A**) или его фрагмента (предпочтительно, иммуногенного фрагмента) (например, **SEQ ID NO: 14** или **15**), причем последовательность содержит один или более из следующих остатков: L455, F486, Q493, S494 и/или N501 (нумерация положений аминокислот основывается на полноразмерном спайк-белке). *См.*, например, **фиг. 3**, **15** и **17B-21**. В соответствии с вариантами осуществления кодируемая последовательность содержит Q493 и N501. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность содержит Q493. Полагают, что такие конкретные аминокислотные остатки SARS-CoV-2 в положениях 455, 486, 493, 494 и/или 501

напрямую взаимодействуют со своими рецепторами. Такие аминокислотные остатки могут быть независимо модифицированы посредством консервативных замен, исходя из физико-химических свойств аминокислот SARS-CoV-2 в положениях 455, 486, 493, 494 и 501 в спайк-белке. Таким образом, могут быть получены альтернативные последовательности, которые будут потенциально захватывать ускользающие формы (например, вирусные мутации, которые уклоняются от полученных нейтрализующих антител, но при этом все еще связываются с рецептором хозяина), причем иммуногенные композиции будут индуцировать нейтрализующие антитела, исходя из этой(этих) альтернативной(альтернативных) последовательности(последовательностей). В соответствии с вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для домена S1 спайк-белка, RBD домена S1 или их иммуногенного фрагмента, причем последовательность содержит **SEQ ID NO: 16**, при этом 455 (L) является выбранным из Y, F, L или S; 486 (F) является выбранным из L, F, S или P; 493 (Q) является выбранным из L, N, Q, R или K; 494 (S) является выбранным из D, G, P, L или S; и 501 (N) является выбранным из T, S, N или Y. В соответствии с вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для домена S1 спайк-белка, RBD S1 или их иммуногенного фрагмента, причем последовательность содержит **SEQ ID NO: 17**, при этом 455 (L) является выбранным из Y, F, L или S; 486 (F) является выбранным из L, F, S или P; 493 (Q) является выбранным из L, N, Q, R или K; 494 (S) является выбранным из D, G, P, L или S; и 501 (N) является выбранным из T, S, N или Y.

[00162] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для модификаций части последовательности спайк-белка с **SEQ ID NO. 13**, причем аминокислотная последовательность такой части представлена на **фиг. 17B** («последовательность») и ниже:

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLY
NSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWN
SNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGY
QPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNF (**SEQ ID NO: 411**)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодирующая последовательность может кодировать по меньшей мере одну замену любой из аминокислот в **SEQ ID NO: 411**. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодирующая последовательность может кодировать по меньшей мере одну замену («мутации») в **SEQ ID NO: 411**.

Предпочтительно, одна или более замен в **SEQ ID NO: 411** представляет собой одну из представленных в **фиг. 17B**. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или более замен могут представлять собой замены любой одной или более из аминокислот 333-388, 390-395, 397-399, 401-411, 413-415, 417-419, 424, 426-435, 437, 439-442, 444-446, 449, 450, 452, 453, 455-463, 465, 467-473, 475-479, 481-486, 490, 491, 493-495, 499-510 или 513-526, причем нумерация соответствует представленной на **фиг. 17B**. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления замена может происходить по одной или более из аминокислот, которые служат в качестве основных контактирующих остатков с человеческим ACE2 рецептором, предпочтительно, по аминокислотам 417, 446, 447, 449, 453, 455, 456, 473, 475-477, 484, 486, 487, 493, 495-498, 500-503 и/или 505 (нумерация, соответствующая представленной на **фиг. 17B**). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления замена в **SEQ ID NO: 411** представляет собой по меньшей мере одну из: замены аминокислоты 417 (K) на N; замена аминокислоты 446 (G) представляет собой V, S или A; замена аминокислоты 449 (Y) представляет собой N; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замены аминокислоты 455 (L) на F; замены аминокислоты 456 (F) на L; замены аминокислоты 473 (Y) на V; замены аминокислоты 475 (A) на V; замены аминокислоты 476 (G) на S или A; замены аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I; замена по аминокислота 484 (E) представляет собой Q, K, D, A или R; замены аминокислоты 486 (F) на L или S; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замены аминокислоты 493 (Q) на L или R; замены аминокислоты 495 (Y) на N или F; замены аминокислоты 500 (T) на I; замены аминокислоты 501 (N) на Y, T или S; замены аминокислоты 502 (G) на R, D или C; замены аминокислоты 503 (V) на L, I или F и/или замены аминокислоты 505 (Y) на H, E, W или C; причем нумерация соответствует представленной на **фиг. 17B**.

[00163] В соответствии с вариантами осуществления кодируемая последовательность RBD спайк-белка содержит остаток, выбранный из Y455, F455 или S455. В соответствии с другими вариантами осуществления кодируемая последовательность RBD спайк-белка содержит остаток, выбранный из L486 или P486. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность RBD спайк-белка содержит остаток, выбранный из N493, R493 или K493. В соответствии с вариантами осуществления кодируемая последовательность RBD спайк-белка содержит остаток, выбранный из D494 или G494. В соответствии с вариантами осуществления кодируемая последовательность RBD спайк-белка содержит остаток, выбранный из T501 или S501.

[00164] *Конструирование стабилизированного антигена спайк-белка*

[00165] Разработка иммуногенной композиции или вакцины на основе вирусного вектора против Covid-19 (например, SARS-CoV-2) сталкивается с некоторыми основными трудностями, связанными со: (1) способностью вирусного вектора экспрессировать белок с четвертичной структурой, характерной для нативного белка до слияния, который экспрессируется коронавирусом и является совместимым с индукцией нейтрализующих антител против вируса SARS-CoV-2; и (2) способностью к размножению вирусного вектора в ходе его производства в клеточной экспрессионной системе с ограниченной интерференцией, которая может быть ассоциирована с одновременной экспрессией трансгенного спайк-белка.

[00166] В соответствии с вариантами осуществления конструирование вирусного вектора, экспрессирующего стабилизированный антиген спайк-белка в тримерной конформации до слияния, в которой он экспрессируется на поверхности инфицированных клеток, может быть желательным для разработки иммуногенной композиции или вакцины против Covid-19, чтобы решить проблемы, связанные с антигенными свойствами и производством вакцины. В соответствии с другими вариантами осуществления для разработки иммуногенной композиции или вакцины против Covid-19 могут быть желательны его (спайк-белка) иммуногенные фрагменты, такие как S1 или рецептор-связывающий домен (RBD), которые также решают проблемы, связанные как с антигенными свойствами, так и с производством иммуногенной композиции или вакцины. Эти проблемы отчасти обусловлены «фузогенными» свойствами спайк-белка SARS-Cov-2, которые в контексте данного документа относятся к обеспечивающим слияние свойствам спайк-белка для обеспечения попадания в клетку-хозяина (например, в виде белка оболочки на поверхности вирусных частиц) с использованием ACE2 в качестве рецептора для попадания или, если он экспрессируется на поверхности клетки-хозяина, для слияния с соседними клетками с образованием крупных синцитиев или синцития (многоядерные клетки-хозяева) в качестве средства для очень быстрого размножения посредством использования этой структуры из слившихся клеток независимо от рецептора для попадания. Первичное воздействие на S-белки коронавируса протеаз клетки-хозяина является необходимым для попадания вируса в клетки, экспрессирующие ACE2, и включает расщепление S-белка в сайтах S1/S2 и S2′. Сайт расщепления S1/S2 в S-белке SARS-CoV-2 несет несколько аргининовых остатков (несколько основных остатков), что указывает на высокую способность к расщеплению (Hoffmann et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor; Cell; 2020 Apr 16; 181(2): 271–280.e8). Для успешных конформационных изменений S-белков, приводящих к слиянию

мембран, требуется не только связывание с рецептором, но также соответствующая активация протеазой. В S-белке SARS-CoV-2 между субъединицами S1 и S2 (аминокислоты 682-685, RRAR) присутствует фуриновый сайт, подобный обнаруживающимся в высокопатогенных вируса гриппа. Этот фуриновый сайт (RRAR) не присутствует в S-белках других коронавирусов (например, *см.* фиг. 1C в Walls et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein; Cell; 2020 Mar 9, включенный в данный документ посредством ссылки), и это может вносить вклад в нестабильность, возможно, затруднение разработки доставляемой в вирусном векторе вакцины. Таким образом, в соответствии с определенными вариантами осуществления эти аминокислотные остатки в спайк-белке SARS-Cov-2 можно удалить и/или модифицировать с целью улучшения или удаления сайта для ферментативного расщепления фурином между доменами S1 и S2, присутствующими в спайк-белке SARS-Cov-2.

[00167] Следовательно, один подход к стабилизации спайк-белка заключается в том, чтобы сделать белок более устойчивым к протеолитическому распаду (1) во время экспрессии белка при производстве в клеточных системах, как например, в дополняющих E1 клеточных линиях во время получения (аденовируса) вирусного вектора и/или (2) во время экспрессии белка у млекопитающего после введения вирусного вектора. Сайты протеолитического расщепления можно модифицировать посредством замен, вставок или делеций аминокислот для того, чтобы предотвратить или снизить ферментативное расщепление. Сайты протеолитического расщепления, представляющие интерес для этого типа подхода, предпочтительно, находятся в доступных для растворителя участках белка, которые образуют обращенную к растворителю поверхность трехмерной структуры белка в тримерном комплексе. Эти доступные для растворителя сайты включают в себя участок соединения S1/S2 QTQTNSPRRARSVASQ (**SEQ ID NO: 25**) и участок соединения S2' PDPSKPSKRSF (**SEQ ID NO: 26**). Другие доступные для растворителя области могут быть идентифицированы с помощью известных способов, в которых рассчитывают относительную площадь, доступную для растворителя (SASA). Возможные ферменты, вовлеченные в протеолитическое расщепление спайк-белка, включают в себя фурин, трипсин, эластазу, плазмин, TMPRSS2, химотрипсин, катепсин-L, катепсин-B, TMPRSS11D, дипептидилпептидазу IV, MMP-13, MMP-12, MMP-2, MMP-9, MMP-3, каспазу-3, каспазу-8, каспазу-9. Сайты расщепления протеазой можно спрогнозировать с применением известных алгоритмов, таких как Proper, Properous, PeptideCutter, Pripper, CasCleave, CasCleave 2.0, CASVM и iProt-Sub.

[00168] Было продемонстрировано, что расщепление в участке соединения S1/S2 QTQTNSPRRARSVASQ (**SEQ ID NO: 25**) из SARS-CoV-2 и/или соответствующих последовательностей в других коронавирусах преимущественно зависит от аргининовых остатков, таких как аргинин в положениях 685, 682 и/или 683 из **SEQ ID NO: 3** и **SEQ ID NO: 12**. Для препятствования протеолитическому расщеплению как замена аргининовых остатков рассматриваются гидрофильные, не имеющие положительного заряда аминокислоты или аминокислоты малого размера, такие как N, Q, D, E, T, S, G или A. Кроме того, участок соединения S1/S2 можно сделать устойчивым к протеолитическому расщеплению посредством делеции или вставки аминокислот при условии, что модификации последовательности не изменяют трехмерную конформацию антигена спайк-белка таким образом, чтобы сохранить его антигенные свойства и способность к стимулированию выработки нейтрализующих антител. Аналогичный подход также можно применять к участку соединения S2' PDPSKPSKRSF (**SEQ ID NO: 26**) для лизинового остатка в положении 814 и аргининового остатка в положении 815 в последовательности **SEQ ID NO: 3** и **SEQ ID NO: 12**. В соответствии с вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность с **SEQ ID NO: 18** (предпочтительный вариант осуществления); **SEQ ID NO: 19** (предпочтительный вариант осуществления) или **SEQ ID NO: 20**. *См.* **фиг. 22-24**. Таким образом, в соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность или ее иммуногенный фрагмент, представленные в **SEQ ID NO: 18** или **SEQ ID NO: 19**, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 18** или **SEQ ID NO: 19**. В соответствии с определенными вариантами осуществления кодируемая последовательность в иммуногенной композиции представляет собой последовательность по меньшей мере около с 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 18** или **SEQ ID NO: 19**.

[00169] В соответствии с другими вариантами осуществления еще один подход к стабилизации спайк-белка включает в себя поддержание метастабильного спайк-белка в его конформации до слияния. Модификации последовательности для стабилизации спайк-белка коронавируса в конформации до слияния были ранее раскрыты в Pallesen et al. 2017 (Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 29;114(35):E7348-E7357) и Wrapp et al. 2020 (Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike

in the prefusion conformation. Science. 2020 Mar 13;367(6483): 1260-1263), в которых демонстрируется, что замены на пролин в петле между первым гептадным повтором (HR1) и центральной спиралью (CH) ограничивают преждевременный запуск белка слияния и часто повышают выходы экспрессии эктодоменов до слияния. *См.* **фиг. 22-24** и **SEQ ID NO: 18**, **19** и **20**.

[00170] В соответствии с вариантами осуществления другие подходы заключаются в облегчении экспрессии белка на поверхности инфицированных клеток. Спайк-белок может удерживаться в эндоплазматическом ретикулуме и/или в компартменте, расположенном перед аппаратом Гольджи/в аппарате Гольджи, это явление связано с природой трансмембранного и/или внутриклеточного домена. Предотвращение удержания внутри клетки может быть достигнуто с помощью модификации внутриклеточного домена (IC) посредством замены цистеина в богатых цистеином доменах или посредством модификации С-концевого мотива для удержания в эндоплазматическом ретикулуме (VKLHYT (**SEQ ID NO: 409**)). *См.* **фиг. 24** и **SEQ ID NO: 20.**

[00171] В соответствии с определенными вариантами осуществления ограничение токсичности трансгенного спайк-белка в ходе производства вирусного вектора может быть достигнуто посредством модификации пептида слияния, содержащегося в последовательности антигена спайк-белка. Модификацию посредством делеции, вставки аминокислот и/или замены аминокислот можно вводить в последовательность спайк-белка для нарушения альфа-спиральной конформации пептида слияния. Нарушение альфа-спиральной конформации пептида слияния может быть достигнуто посредством замены конкретных аминокислот на пролиновые остатки.

[00172] Соответственно, в соответствии с вариантами осуществления конструирование иммуногенной композиции или вакцины против Covid-19 на основе вирусного вектора, экспрессирующего стабилизированный полноразмерный тримерный антиген спайк-белка, может предусматривать одну или более из модификаций, описанных выше. Примеры этих модификаций представлены в **таблице 1** (домены S1/S2, S2' и домен для слияния) и в **таблице 2** (домены HR1/CH и IC) (**фиг. 22-24, SEQ ID NO: 18-20**).

Таблица 1

Иллюстративные модификации для повышения стабильности или поверхностной экспрессии полноразмерного спайк-белка

Участок	**S1/S2**	**S2'**	**Пептид слияния**
Последовательность из SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 12	QTQTNSPRRARSVASQ (SEQ ID NO: 25)	PSKPSKRSF (SEQ ID NO: 26)	SFIEDLLFNKVTLADAGFI (SEQ ID NO: 447)
Модификации	.....XX.X.....	.....X..	.....P.....
	.....QQ.Q.....	.....Q..	.....P...
	.....SG.G.....	.....N..	.....P.....P...
	.....-----....	.....NA..	....---------.....
		.....--..	

«.» = консервативная аминокислота; X = N, Q, D, E, T, S, G или A; и «-» = делеция

Таблица 2

Иллюстративные модификации для повышения стабильности или поверхностной экспрессии полноразмерного спайк-белка

Участок	**HR1/CH**	**IC**
Последовательность из SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 12	SRLDKVEAEV (SEQ ID NO: 448)	CCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT (SEQ ID NO: 449)
Модификации	....PP....	.....------
		.....----------
		.....----------
		.....Z.#..
		.....Z.....
		.....Z.....
		.....Z.....
		.....Z.....
		.....Z.....

«.» = консервативная аминокислота; Z=N, Q, D, E, T, S, G или A; и «-» = делеция

[00173] В соответствии с вариантами осуществления данная иммуногенная композиция представляет собой поливалентную композицию. В соответствии с определенными вариантами осуществления экспрессионная кассета в векторе на основе репликационно-дефектного аденовируса дополнительно содержит кодирующую последовательность, которая кодирует один или более из структурных белков оболочки (E), мембраны (M) или нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2. Каждый из этих структурных белков представлен в данном документе в виде **SEQ ID NO: 5**; **SEQ ID NO: 6** и **SEQ ID NO: 10**, соответственно. *См.* также **фиг. 5**, **6** и **10**. В соответствии с альтернативными вариантами осуществления эти структурные белки могут быть закодированы в отдельном векторе на основе репликационно-дефектного аденовируса и обеспечены в виде поливалентного состава с вектором на основе репликационно-дефектного аденовируса, содержащим экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2 (новый коронавирус 2019 года; 2019-nCoV) или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент.

[00174] *Нейтрализация антигена спайк-белка после слияния*

[00175] Как обсуждалось выше, в отличие от других бета-коронавирусов из подгруппы B, S-белок SARS-CoV-2 несет уникальный распознаваемый фурином сайт S1/S2, что указывает на то, что его S-белок может обладать уникальными инфекционными свойствами. Действительно, было показано, что при активной инфекции SARS-CoV-2 наблюдалось явление образования синцития, который в естественных условиях образуется инфицированными клетками, о чем редко сообщали при инфекции SARS-CoV, что демонстрирует высокую способность к опосредованию слияния мембран (Xu Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. Lancet Respir Med. 2020 Apr;8(4):420-422.). Эти цитопатические синцитии, по видимому, ответственны, по меньшей мере отчасти, за патологию, наблюдаемую у пациентов с COVID-19. Кроме того, образование синцитиев помогает вирусу очень быстро размножаться за счет использования этого механизма слияния клетки с клеткой независимо от рецептора (независимое от рецептора распространение). Таким образом, индукция нейтрализующего антитела против антигена S-белка в его форме после слияния является средством для ограничения образования синцитиев и/или предотвращения быстрого распространения вируса независимым от рецептора способом. Антиген спайк-белка в форме после слияния получают после расщепления спайк-белка протеазами. Расщепление индуцирует перестройку трехмерной структуры домена S2, как представлено в Wall et al. 2017

(Walls, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(42):11157–11162.).

[00176] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор для иммунизации против SARS-CoV-2 может также или в качестве альтернативы содержать полинуклеотид, вызывающий экспрессию в клетке антигена спайк-белка без домена S1, как например, домен S2 спайк-белка (приблизительно с аминокислотного остатка 686 в **SEQ ID NO: 3**), или домен S2' спайк-белка (приблизительно с аминокислотного остатка 816 в **SEQ ID NO: 3**), или последовательность, начинающаяся за остатком 816 в **SEQ ID NO: 3** и, как минимум, содержащая HR1, HR2 и трансмембранный домен. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления эти векторы для иммунизации против SARS-CoV-2 индуцируют иммунный ответ, который нейтрализует спайк-белок в форме после слияния (например, антитела к домену S2), и обеспечивают защиту посредством предупреждения образования синцитиев и/или посредством предупреждения размножения вируса способом, независимым от рецептора для попадания в клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для S2 части спайк (S) белка (например, **SEQ ID NO: 21**, **SEQ ID NO: 22**, **SEQ ID NO: 23**). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессионная кассета в иммуногенной композиции содержит кодирующую последовательность для S2 части спайк (S) белка, содержащую дополнительный трансмембранный домен для замены пептида слияния (например, **SEQ ID NO: 24**). Полипептиды с **SEQ ID NO: 21, 22, 23** и **24** представлены ниже:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIP
TNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVE
QDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADA
GFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFG
AGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALG
KLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQS
LQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHG
VVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIIT
TDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGIN
ASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMV

TIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT (**SEQ ID NO: 21**; спайк-белок SARS-CoV-2 – домен S2 с сигнальной последовательностью pTA);

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIA ARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQM AYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQA LNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA EIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQE KNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVV IGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLN EVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCL KGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT (**SEQ ID NO: 22**; спайк-белок SARS-CoV-2 – домен S2' с сигнальной последовательностью pTA);

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQD SLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQI DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHL MSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVT QRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPD VDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFI AGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT (**SEQ ID NO: 23**; спайк-белок SARS-CoV-2 – домен HR1 + HR2 с сигнальной последовательностью pTA); и

GPPLSSSLGLALLLLLLALLFWLYIVMGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWT FGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASA LGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRL QSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAP HGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQ IITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGI NASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVM VTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT (**SEQ ID NO: 24**; спайк-белок SARS-CoV-2 – домен S2' + дополнительный трансмембранный домен).

[00177] *Пептиды Т-клеточных эпитопов*

[00178] В соответствии с вариантами осуществления векторы для иммунизации против SARS-CoV-2 содержат одну или более последовательностей, кодирующих пептиды длиной 8-60 аминокислот (и соединенные последовательно, если их больше чем один), причем каждый пептид содержит по меньшей мере один CD8+ Т-клеточный эпитоп и/или по меньшей мере один CD4+ Т-клеточный эпитоп. В этом случае полинуклеотид, кодирующий соединенные последовательно пептиды, экспрессирует полипептид, в котором Т-клеточные эпитопы или содержащие Т-клеточный эпитоп последовательности разделены спейсерной последовательностью, содержащей аминокислоты, такие как глициновые, сериновые или аланиновые остатки. Полинуклеотид может дополнительно содержать последовательности полинуклеотидов, кодирующие убиквитин или сигнальный пептид. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы для иммунизации против SARS-CoV-2 содержат один или более полинуклеотидов, кодирующих один или более антигенов S-белка. (Ahmed, et al. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. Viruses, 12: 254 (2020)). Один или более пептидных антигенов S-белка могут содержать любой Т-клеточный эпитоп, например, любой из пептидов, представленных в **таблице 3А.**

Таблица 3А

SEQ ID NO:	Пептид	SEQ ID NO:	Пептид
27/78	ILLNKHID	155	SASAFFGMSR
28	AFFGMSRIGMEVTPSGTW	156	SPRWYFYYL
29/80	MEVTPSGTWL	157	SQASSRSSSR
30/83	GMSRIGMEV	158	TPSGTWLTY
31/87	ILLNKHIDA	159	TTLPKGFYA
32/88	ALNTPKDHI	160	VLQLPQGTTL
33	IRQGTDYKHWPQIAQFA	161	VLQLPQGTTLPKGFY
34	KHWPQIAQFAPSASAFF	162	VTPSGTWLTY
35/91	LALLLLDRL	163	AEGSRGGSQA
36/92	LLLDRLNQL	164	FLCLFLLPSL
37	LLNKHIDAYKTFPPTEPK	165	FLGRYMSAL
38/95	LQLPQGTTL	166	FLLNKEMYL
39	AQFAPSASAFFGMSR	167	FLLPSLATV
40	AQFAPSASAFFGMSRIGM	168	FLNGSCGSV
41	RRPQGLPNNTASWFT	169	FLNRFTTTL
42	YKTFPPTEPKKDKKKK	170	FLPRVFSAV
43/152	GAALQIPFAMQMAYRF	171	FRYMNSQGL
44/153	MAYRFNGIGVTQNVLY	172	FTYASALWEI

45/154	QLIRAAEIRASANLAATK	173	AIILASFSA
46/271	FIAGLIAIV	174	GVYDYLVST
47/105	ALNTLVKQL	175	ILASFSAST
48/112	LITGRLQSL	176	ILGTVSWNL
49/124	NLNESLIDL	177	IQPGQTFSV
50/313	QALNTLVKQLSSNFGAI	178	ALRANSAVK
51/133	RLNEVAKNL	179	ALWEIQQVV
52/143	VLNDILSRL	180	KLWAQCVQL
53/146	VVFLHVTYV	181	LLSAGIFGA
54/63	SEETGTLIV	182	MPASWVMRI
55	FLWLLWPVT	183	NVLAWLYAA
56	FLWLLWPVTL	184	QLMCQPILL
57	FLWLLWPVTLACFVL	185	QLMCQPILLL
58	IKDLPKEITVATSRT	186	AVLQSGFRK
59	LEQWNLVIGF	187	SLLSVLLSM
60	LFARTRSMW	188	TLGVYDYLV
61	LWLLWPVTL	189	TVLSFCAFA
62	LWPVTLACF	190	VLAWLYAAV
63/54	SEETGTLIV	191	VLSFCAFAV
64	MWSFNPETNI	192	YIFFASFYY
65	NLVIGFLFL	193	FPPTSFGPL
66	PKEITVATSRTLSYY	194	FVDGVPFVV
67	ATSRTLSYY	195	AIMTRCLAV
68	ATSRTLSYYK	196	GVAMPNLYK
69	QWNLVIGFLF	197	ALLADKFPV
70	RYRIGNYKL	198	ILGLPTQTV
71	SELVIGAVI	199	ILHCANFNV
72	SFNPETNIL	200	IPRRNVATL
73	SMWSFNPET	201	ISDYDYYRY
74	TSRTLSYYK	202	IVDTVSALV
75	TVATSRTLSY	203	KLFAAETLK
76	WLLWPVTLA	204	KLNVGDYFV
77	WPVTLACFVL	205	KLSYGIATV
78/27	ILLNKHID	206	KMQRMLLEK
79	FPRGQGVPI	207	KQFDTYNLW
80/29	MEVTPSGTWL	208	LLDDFVEII
81	GMEVTPSGTWL	209	LLLDDFVEI
82	LLLLDRLNQ	210	LLMPILTLT
83/30	GMSRIGMEV	211	LMIERFVSL
84	GTTLPKGFY	212	LQLGFSTGV
85	ALALLLLDR	213	LVLSVNPYV
86	IDAYKTFPPTEPKKD	214	MLWCKDGHV
87/31	ILLNKHIDA	215	MMISAGFSL
88/32	ALNTPKDHI	216	MVMCGGSLYV
89	KTFPPTEPK	217	NLWNTFTRL
90	KTFPPTEPKK	218	NMLRIMASL
91/35	LALLLLDRL	219	ATVVIGTSK

92/36	LLLDRLNQL	220	RILGAGCFV
93	LLLLDRLNQL	221	RLYYDSMSY
94	APSASAFFGM	222	RQLLFVVEV
95/38	LQLPQGTTL	223	SSNVANYQK
96	AQFAPSASA	224	TLIGDCATV
97	LSPRWYFYY	225	TLVPQEHYV
98	MSRIGMEVTPSGTWL	226	TMADLVYAL
99	ASAFFGMSR	227	TTLPVNVAF
100	NKHIDAYKTFPPTEP	228	VLQAVGACV
101	ATEGALNTPK	229	VLWAHGFEL
102	QLPQGTTLPK	230	VMCGGSLYV
103	QQQGQTVTK	231	VVDKYFDCY
104	QQQQGQTVTK	232	VVYRGTTTY
105/47	ALNTLVKQL	233	YLDAYNMMI
106	ISGINASVVNIQKEI	234	YLNTLTLAV
107	LDKYFKNHTSPDVDL	235	YQKVGMQKY
108	APHGVVFLHV	236	YTMADLVYA
109	LGDISGINASVVNIQ	237	YVFCTVNAL
110	LGFIAGLIAIVMVTI	238	HLVDFQVTI
111	LIDLQELGKY	239	HPLADNKFAL
112/48	LITGRLQSL	240	KLFIRQEEV
113	LLLQYGSFC	241	QECVRGTTVLLKEPC
114	LLQYGSFCT	242	CELYHYQECV
115	LNTLVKQLSSNFGAI	243	SVSPKLFIR
116	LQDVVNQNAQALNTL	244	YEGNSPFHPL
117	LQIPFAMQM	245	AFLLFLVLI
118	LQSLQTYVTQQLIRA	246	AFLLFLVLIMLIIFW
119	LQTYVTQQLIRAAEI	247	FLAFLLFLV
120	AQALNTLVK	248	FLAFLLFLVL
121	AQKFNGLTVLPPLLT	249	FLAFLLFLVLIMLII
122	MTSCCSCLK	250	FLLFLVLIM
123	ASANLAATK	251	FLLFLVLIML
124/49	NLNESLIDL	252	FLLFLVLIMLIIFWF
125	PCSFGGVSVITPGTN	253	FLVLIMLII
126	PYRVVVLSF	254	FLVLIMLIIFWFSLE
127	QELGKYEQYI	255	FYLCFLAFL
128	QIPFAMQMAYRFNGI	256	FYLCFLAFLL
129	QPYRVVVLSF	257	IDFYLCFLAF
130	QQLIRAAEIRASANL	258	IMLIIFWFSL
131	QTYVTQQLIRAAEIR	259	LAFLLFLVLIMLIIF
132	RLDKVEAEV	260	LFLVLIMLIIFWFSL
133/51	RLNEVAKNL	261	LIDFYLCFL
134	RLQSLQTYV	262	LLFLVLIML
135	RVDFCGKGY	263	LLFLVLIMLI
136	AYRFNGIGVTQNVLY	264	LLFLVLIMLIIFWFS
137	SLIDLQELGK	265	MLIIFWFSL
138	SSNFGAISSVLNDIL	266	YLCFLAFLL

139	SVLNDILSR	267	YLCFLAFLLFLVLIM
140	TGRLQSLQTYVTQQL	268	DSFKEELDKY
141	TQNVLYENQK	269	AEVQIDRLI
142	CMTSCCSCLK	270	AEVQIDRLIT
143/52	VLNDILSRL	271/46	FIAGLIAIV
144	VQIDRLITGR	272	FPNITNLCPF
145	VRFPNITNL	273	GAALQIPFAMQMAYR
146/53	VVFLHVTYV	274	GLIAIVMVTI
147	WLGFIAGLIAIVMVT	275	GRLQSLQTY
148	CVNFNFNGLTGTGVL	276	GSFCTQLNR
149	YEQYIKWPWY	277	GVVFLHVTY
150	DKYFKNHTSPDVDLG	278	GWTFGAGAALQIPFA
151	AEIRASANLA	279	GYQPYRVVVL
152/43	GAALQIPFAMQMAYRF	280	IDRLITGRLQSLQTY
153/44	MAYRFNGIGVTQNVLY	281	IGAGICASY
154/45	QLIRAAEIRASANLAATK	282	IITTDNTFV

[00179] В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления векторы могут кодировать несколько эпитопов отдельно или в составе одного полипептида (например, последовательно соединеные, необязательно, разделенные линкерной аминокислотной последовательностью из двух-десяти аминокислот). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы могут кодировать несколько эпитопов, как в иллюстративных группах, представленных в **таблице 3B.**

Таблица 3B

Группа	Пептиды
1	FIAGLIAIV (SEQ ID NO: 46), GLIAIVMVTI (SEQ ID NO: 274), IITTDNTFV (SEQ ID NO: 282), ALNTLVKQL (SEQ ID NO: 105), LITGRLQSL (SEQ ID NO: 48), LLLQYGSFC (SEQ ID NO: 113), LQYGSFCT (SEQ ID NO: 465), NLNESLIDL (SEQ ID NO: 49), RLDKVEAEV (SEQ ID NO: 132), RLNEVAKNL (SEQ ID NO: 51), RLQSLQTYV (SEQ ID NO: 134), VLNDILSRL (SEQ ID NO: 52), VVFLHVTYV (SEQ ID NO: 53), ILLNKHID (SEQ ID NO: 27), FPRGQGVPI (SEQ ID NO: 79), LLLLDRLNQ (SEQ ID NO: 82), GMSRIGMEV (SEQ ID NO: 30), ILLNKHIDA (SEQ ID NO: 31), ALNTPKDHI (SEQ ID NO: 32), LALLLLDRL (SEQ ID NO: 35), LLLDRLNQL (SEQ ID NO: 36), LLLLDRLNQL (SEQ ID NO: 93), LQLPQGTTL (SEQ ID NO: 38), AQFAPSASA (SEQ ID NO: 96), TTLPKGFYA (SEQ ID NO: 159), VLQLPQGTTL (SEQ ID NO: 160), VRFPNITNL (SEQ ID NO: 145) и YEQYIKWPWY (SEQ ID NO: 149)
2	GYQPYRVVVL (SEQ ID NO: 279), PYRVVVLSF (SEQ ID NO: 126) и LSPRWYFYY (SEQ ID NO: 97)

3	DSFKEELDKY (SEQ ID NO: 268), LIDLQELGKY (SEQ ID NO: 111), PYRVVVLSF (SEQ ID NO: 126), GTTLPKGFY (SEQ ID NO: 84) и VTPSGTWLTY (SEQ ID NO: 162)
4	GSFCTQLNR (SEQ ID NO: 276), GVVFLHVTY (SEQ ID NO: 277), AQALNTLVK (SEQ ID NO: 120), MTSCCSCLK (SEQ ID NO: 122), ASANLAATK (SEQ ID NO: 123), SLIDLQELGK (SEQ ID NO: 137), SVLNDILSR (SEQ ID NO: 139), TQNVLYENQK (SEQ ID NO: 141), CMTSCCSCLK (SEQ ID NO: 142), VQIDRLITGR (SEQ ID NO: 144), KTFPPTEPK (SEQ ID NO: 89) и KTFPPTEPKK (SEQ ID NO: 90)
5	LSPRWYFYY (SEQ ID NO: 97), ASAFFGMSR (SEQ ID NO: 99), ATEGALNTPK (SEQ ID NO: 101), QLPQGTTLPK (SEQ ID NO: 102), QQQGQTVTK (SEQ ID NO: 103), QQQQGQTVTK (SEQ ID NO: 104), SASAFFGMSR (SEQ ID NO: 155), SQASSRSSSR (SEQ ID NO: 157) и TPSGTWLTY (SEQ ID NO: 158)
6	GSFCTQLNR (SEQ ID NO: 276), GVVFLHVTY (SEQ ID NO: 277), AQALNTLVK (SEQ ID NO: 120), MTSCCSCLK (SEQ ID NO: 122), ASANLAATK (SEQ ID NO: 123), SLIDLQELGK (SEQ ID NO: 137), SVLNDILSR (SEQ ID NO: 139), TQNVLYENQK (SEQ ID NO: 141), CMTSCCSCLK (SEQ ID NO: 142), VQIDRLITGR (SEQ ID NO: 144), KTFPPTEPK (SEQ ID NO: 89), KTFPPTEPKK (SEQ ID NO: 90), LSPRWYFYY (SEQ ID NO: 97), ASAFFGMSR (SEQ ID NO: 99), ATEGALNTPK (SEQ ID NO: 101), QLPQGTTLPK (SEQ ID NO: 102), QQQGQTVTK (SEQ ID NO: 103), QQQQGQTVTK (SEQ ID NO: 104), SASAFFGMSR (SEQ ID NO: 155), SQASSRSSSR (SEQ ID NO: 157) и TPSGTWLTY (SEQ ID NO: 158)
7	GYQPYRVVVL (SEQ ID NO: 279), PYRVVVLSF (SEQ ID NO: 126) и LSPRWYFYY (SEQ ID NO: 97)
8	GSFCTQLNR (SEQ ID NO: 276), GVVFLHVTY (SEQ ID NO: 277), AQALNTLVK (SEQ ID NO: 120), MTSCCSCLK (SEQ ID NO: 122), ASANLAATK (SEQ ID NO: 123), SLIDLQELGK (SEQ ID NO: 137), SVLNDILSR (SEQ ID NO: 139), TQNVLYENQK (SEQ ID NO: 141), CMTSCCSCLK (SEQ ID NO: 142), VQIDRLITGR (SEQ ID NO: 144), KTFPPTEPK (SEQ ID NO: 89), KTFPPTEPKK (SEQ ID NO: 90), LSPRWYFYY (SEQ ID NO: 97), ASAFFGMSR (SEQ ID NO: 99), ATEGALNTPK (SEQ ID NO: 101), QLPQGTTLPK (SEQ ID NO: 102), QQQGQTVTK (SEQ ID NO: 103), QQQQGQTVTK (SEQ ID NO: 104), SASAFFGMSR (SEQ ID NO: 155), SQASSRSSSR (SEQ ID NO: 157) и TPSGTWLTY (SEQ ID NO: 158)
9	FPNITNLCPF (SEQ ID NO: 272), APHGVVFLHV (SEQ ID NO: 108), FPRGQGVPI (SEQ ID NO: 79) и APSASAFFGM (SEQ ID NO: 94)
10	GAALQIPFAMQMAYR (SEQ ID NO: 273), GWTFGAGAALQIPFA (SEQ ID NO: 278), IDRLITGRLQSLQTY (SEQ ID NO: 280), ISGINASVVNIQKEI (SEQ ID NO: 106), LDKYFKNHTSPDVDL (SEQ ID NO: 107), LGDISGINASVVNIQ (SEQ ID NO: 109), LGFIAGLIAIVMVTI (SEQ ID NO: 110), LNTLVKQLSSNFGAI (SEQ ID NO: 115), LQDVVNQNAQALNTL (SEQ ID NO: 116), LQSLQTYVTQQLIRA (SEQ ID NO: 118), LQTYVTQQLIRAAEI (SEQ ID NO: 119), AQKFNGLTVLPPLLT (SEQ ID NO: 121),

	PCSFGGVSVITPGTN (SEQ ID NO: 125), QIPFAMQMAYRFNGI (SEQ ID NO: 128), QQLIRAAEIRASANL (SEQ ID NO: 130), QTYVTQQLIRAAEIR (SEQ ID NO: 131), AYRFNGIGVTQNVLY (SEQ ID NO: 136), SSNFGAISSVLNDIL (SEQ ID NO: 138), TGRLQSLQTYVTQQL (SEQ ID NO: 140), WLGFIAGLIAIVMVT (SEQ ID NO: 147), CVNFNFNGLTGTGVL (SEQ ID NO: 148), DKYFKNHTSPDVDLG (SEQ ID NO: 150), IDAYKTFPPTEPKKD (SEQ ID NO: 86), MSRIGMEVTPSGTWL (SEQ ID NO: 98), NKHIDAYKTFPPTEP (SEQ ID NO: 100) и VLQLPQGTTLPKGFY (SEQ ID NO: 161)
11	FPNITNLCPF (SEQ ID NO: 272), APHGVVFLHV (SEQ ID NO: 108), FPRGQGVPI (SEQ ID NO: 79) и APSASAFFGM (SEQ ID NO: 94)
12	LQIPFAMQM (SEQ ID NO: 117) и RVDFCGKGY (SEQ ID NO: 135)
13	GRLQSLQTY (SEQ ID NO: 275), RVDFCGKGY (SEQ ID NO: 135) и VRFPNITNL (SEQ ID NO: 145)
14	MTSCCSCLK (SEQ ID NO: 122), SLIDLQELGK (SEQ ID NO: 137), CMTSCCSCLK (SEQ ID NO: 142), VQIDRLITGR (SEQ ID NO: 144), SASAFFGMSR (SEQ ID NO: 155) и SQASSRSSSR (SEQ ID NO: 157)
15	LQIPFAMQM (SEQ ID NO: 117) и RVDFCGKGY (SEQ ID NO: 135)

[00180] В данном документе также предусмотрены другие комбинации эпитопов, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00181] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор(векторы) может(могут) кодировать один или более из следующих эпитопов, которые могут представлять собой В-клеточные эпитопы: DVVNQNAQALNTLVKQL (**SEQ ID NO: 283**), FFGMSRIGMEVTPSGTW (**SEQ ID NO: 284**), EAEVQIDRLITGRLQSL (**SEQ ID NO: 285**), GLPNNTASWFTALTQHGK (**SEQ ID NO: 286**), EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY (SEQ ID NO: 287), GTTLPK (**SEQ ID NO: 288**), EVAKNLNESLIDLQELG (**SEQ ID NO: 289**), IRQGTDYKHWPQIAQFA (**SEQ ID NO: 290**), GAALQIPFAMQMAYRFN (**SEQ ID NO: 291**), KHIDAYKTFPPTEPKKDKKK (**SEQ ID NO: 292**), GAGICASY (**SEQ ID NO: 293**), KHWPQIAQFAPSASAFF (**SEQ ID NO: 294**), AISSVLNDILSRLDKVE (**SEQ ID NO: 295**), YNVTQAFGRRGPEQTQGNF (**SEQ ID NO: 296**), GSFCTQLN (**SEQ ID NO: 297**), KTFPPTEPKKDKKKK (**SEQ ID NO: 298**), ILSRLDKVEAEVQIDRL (**SEQ ID NO: 299**), LLPAAD (**SEQ ID NO: 300**), KGIYQTSN (**SEQ ID NO: 301**), LNKHIDAYKTFPPTEPK (**SEQ ID NO: 302**), AMQMAYRF (**SEQ ID NO: 303**), LPQGTTLPKG (**SEQ ID NO: 304**), KNHTSPDVDLGDISGIN (**SEQ ID NO: 305**), LPQRQKKQ (**SEQ ID NO: 306**), MAYRFNGIGVTQNVLYE (**SEQ ID NO: 307**), PKGFYAEGSRGGSQASSR (**SEQ ID NO: 308**), AATKMSECVLGQSKRVD (**SEQ ID NO: 309**), QFAPSASAFFGMSRIGM (**SEQ ID NO: 310**),

PFAMQMAYRFNGIGVTQ (**SEQ ID NO: 311**), QGTDYKHW (**SEQ ID NO: 312**), QALNTLVKQLSSNFGAI (**SEQ ID NO: 313, 50**), QLPQGTTLPKGFYAE (**SEQ ID NO: 314**), QLIRAAEIRASANLAAT (**SEQ ID NO: 315**), QLPQGTTLPKGFYAEGSR (**SEQ ID NO: 316**), QQFGRD (**SEQ ID NO: 317**), QLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQ (**SEQ ID NO: 318**), RASANLAATKMSECVLG (**SEQ ID NO: 319**), TFPPTEPK (**SEQ ID NO: 320**), RLITGRLQSLQTYVTQQ (**SEQ ID NO: 321**), RRPQGLPNNTASWFT (**SEQ ID NO: 322**), EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY (**SEQ ID NO: 323**), SQASSRSS (**SEQ ID NO: 324**), SLQTYVTQQLIRAAEIR (**SEQ ID NO: 325**), SRGGSQASSRSSSRSR (**SEQ ID NO: 326**) и DLGDISGINASVVNIQK (**SEQ ID NO: 327**); и/или их комбинации. В соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления векторы могут кодировать несколько из таких эпитопов отдельно или в составе одного полипептида (например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательно соединенные, необязательно, разделенные линкерной аминокислотной последовательностью из двух-десяти аминокислот).

[00182] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептидные последовательности SARS-CoV-2, кодируемые векторами для иммунизации против SARS-CoV-2, могут быть выбраны на основании способности к стимулированию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточных ответов и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления могут быть выбраны на основании прогнозирования участков протеома, содержащих наибольшее количество связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II в спектре выбранных аллелей HLA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления анализ связывающих мотивов для HLA класса II в последовательностях SARS-CoV-2 можно осуществлять с применением NetMHCpan EL 4.0, доступной в IEDB (http://tools.iedb.org/mhci/; Jurtz, et al. NetMHCpan-4.0: Improved Peptide-MHC Class I Interaction Predictions Integrating Eluted Ligand and Peptide Binding Affinity Data. J Immunol. 2017;199(9):3360-3368). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления NetMHCpan EL 4.0 можно применять для идентификации связывающих мотивов, имеющих длину, которая варьирует от 9 до 11 аминокислот для молекул HLA класса I, и присвоения им процентного ранга (%-ранг). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пептиды с высокой аффинностью связывания можно идентифицировать как демонстрирующие %-ранг $\leq 0{,}1$, в то время как пептидами с умеренной активностью связывания можно считать имеющие %-ранг в диапазоне от $>0{,}1$ до $\leq 0{,}5$. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления

прогнозирование с помощью NetMHCpan EL 4.0 можно осуществлять с использованием набора из 18 аллелей HLA-A, 32 аллелей HLA-B и 20 аллелей HLA-C, которые представлены ниже: HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*23:0, HLA-A*24:02, HLA-A*25:01, HLA-A*26:01, HLA-A*29:02, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:03, HLA-A*68:01, HLA-A*68:02, HLA-A*74:01, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*13:01, HLA-B*13:02, HLA-B*14:02, HLA-B*15:01, HLA-B*15:02, HLA-B*15:25, HLA-B*18:01, HLA-B*27:02, HLA-B*27:05, HLA-B*35:01, HLA-B*35:03, HLA-B*37:01, HLA-B*38:01, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLA-B*40:02, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*46:01, HLA-B*48:01, HLA-B*49:01, HLA-B*50:01, HLA-B*51:01, HLA-B*52:01, HLA-B*53:01, HLA-B*55:01, HLA-B*56:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01, HLA-B*58:02, HLA-C*01:02, HLA-C*02:02, HLA-C*02:09, HLA-C*03:02, HLA-C*03:03, HLA-C*03:04, HLA-C*04:01, HLA-C*05:01, HLA-C*06:02, HLA-C*07:01, HLA-C*07:02, HLA-C*07:04, HLA-C*08:01, HLA-C*08:02, HLA-C*12:02, HLA-C*12:03, HLA-C*14:02, HLA-C*15:02, HLA-C*16:01 и HLA-C*17:01. Подходящими также могут являться другие аллели HLA класса I, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00183] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие мотивы для HLA класса II в полипептидных последовательностях SARS-CoV-2 можно спрогнозировать с помощью NetMHCII 2.3 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/; Jensen et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. Immunology. 2018 Jul;154(3):394-406.), которая основана на ансамблях искусственных нервных сетей, натренированных на данных количественного анализа аффинности связывания пептидов из базы данных иммунных эпитопов (IEDB). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления NetMHCII 2.3 можно применять для идентификации пептидов, которые могут презентироваться молекулами HLA класса II, посредством определения, например, процентного ранга (%-ранг) (связанный с аффинностью пептидов в отношении молекул HLA) и корового связывающего мотива из девяти аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления высокоаффинные связывающие пептиды для HLA класса II можно идентифицировать как демонстрирующие %-ранг $\leq$2, в то время как пептидами с умеренной аффинностью связывания можно считать имеющие %-ранг от >2 до 10. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления система NetMHCII 2.3 может основываться на наборе из 20 аллелей HLA-DR, 20 аллелей HLA-DQ и 9 аллелей HLA-DP, которые

представлены ниже: DRα1*0101-DRβ1*0101, DRα1*0101-DRβ1*0301, DRα1*0101-DRβ1*0401, DRα1*0101-DRβ1*0701, DRα1*0101-DRβ1*0801, DRα1*0101-DRβ1*0802, DRα1*0101-DRβ1*0901, DRα1*0101-DRβ1*1001, DRα1*0101-DRβ1*1101, DRα1*0101-DRβ1*1201, DRα1*0101-DRβ1*1301, DRα1*0101-DRβ1*1302, DRα1*0101-DRβ1*150, DRα1*0101-DRβ1*1602, DRα1*0101-DRβ3*0101, DRα1*0101-DRβ3*0202, DRα1*0101-DRβ3*0301, DRα1*0101-DRβ4*0101, DRα1*0101-DRβ4*0103, DRα1*0101-DRβ5*0101, DPα1*0103-DPβ1*0301, DPα1*0103-DPβ1*0401, DPα1*0103-DPβ1*0402, DPα1*0103-DPβ1*0601, DPα1*0201-DPβ1*0101, DPα1*0201-DPβ1*0501, DPα1*0201-DPβ1*1401, DPα1*0301-DPβ1*0402, DPα1*0103-DPβ1*0201, DQα1*0101-DQβ1*0501, DQα1*0102-DQβ1*0501, DQα1*0102-DQβ1*0502, DQα1*0102-DQβ1*0602, DQα1*0103-DQβ1*0603, DQα1*0104-DQβ1*0503, DQα1*0201-DQβ1*0202, DQα1*0201-DQβ1*0301, DQα1*0201-DQβ1*0303, DQα1*0201-DQβ1*0402, DQα1*0301-DQβ1*0301, DQα1*0301-DQβ1*0302, DQα1*0303-DQβ1*0402, DQα1*0401-DQβ1*0402, DQα1*0501-DQβ1*0201, DQα1*0501-DQβ1*0301, DQα1*0501-DQβ1*0302, DQα1*0501-DQβ1*0303, DQα1*0501-DQβ1*0402 и DQα1*0601-DQβ1*0402. Подходящими также могут являться другие аллели HLA класса II, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00184] Количество связывающих мотивов для HLA класса I среди выбранных 70 аллелей HLA класса I и количество связывающих мотивов для HLA класса II среди выбранных 49 аллелей HLA класса II, имеющих высокую или высокую плюс (+) умеренную аффинность, рассчитывали соответственно для каждого сканирования последовательностей SARS-CoV-2 при длине окна в 41 аминокислоту, и они представлены на **фиг. 27-70**. Для этого анализа прогнозируемые трансмембранные домены отсеивали вследствие их высокой гидрофобности. Исходя из этого анализа, сорок две (42) длинных пептидных последовательности с длиной, варьирующей от 34 до 124 аминокислот, которые представлены в **таблице 4**, выбирали на основании наиболее высокого содержания мотивов для HLA класса I и/или HLA класса II в протеоме SRAS-CoV-2 (**SEQ ID NO. 410**).

Таблица 4

Выбранные длинные пептидные последовательности SARS-CoV-2, содержащие высокую плотность связывающих мотивов для HLA класса I и/или HLA класса II (SEQ ID NO: 328-369)

SEQ ID No.	Длина	Положение относительно N-конца SEQ ID NO: 410	Положение относительно C-конца SEQ ID NO: 410	Последовательность
328	66	2580	2645	VGDSAEVAVKMFDAYVNTFSSTFNVPMEKLKTLVATA EAELAKNVSLDNVLSTFISAARQGFVDSD
329	106	4891	4996	DKSAGFPFNKWGKARLYYDSMSYEDQDALFAYTKRN VIPTITQMNLKYAISAKNRARTVAGVSICSTMTNRQFH QKLLKSIAATRGATVVIGTSKFYGGWHNMLKT
330	87	5238	5324	DIVKTDGTLMIERFVSLAIDAYPLTKHPNQEYADVFHL YLQYIRKLHDELTGHMLDMYSVMLTNDNTSRYWEPEF YEAMYTPHTVLQ
331	45	6407	6452	AVCRHHANEYRLYLDAYNMMISAGFSLWVYKQFDTY NLWNTFTRLQ
332	98	4704	4801	NFNVLFSTVFPPTSFGPLVRKIFVDGVPFVVSTGYHFRE LGVVHNQDVNLHSSRLSFKELLVYAADPAMHAASGNL LLDKRTTCFSVAALTNNVAFQT
333	83	7757	7839	ECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG AENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTM YIC
334	70	1532	1601	DKSVYYTSNPTTFHLDGEVITFDNLKTLLSLREVRTIKV FTTVDNINLHTQVVDMSMTYGQQFGPTYLDG
335	82	7948	8029	AQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFG AGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQ FNSAIGK
336	117	5531	5647	DAVVYRGTTTYKLNVGDYFVLTSHTVMPLSAPTLVPQ EHYVRITGLYPTLNISDEFSSNVANYQKVGMQKYSTLQ GPPGTGKSHFAIGLALYYPSARIVYTACSHAAVDALCE KALK

337	84	231	314	CREHEHEIAWYTERSEKSYELQTPFEIKLAKKFDTFNGE CPNFVFPLNSIIKTIQPRVEKKKLDGFMGRIRSVYPVASP NECNQ
338	85	2097	2181	AAYVDNSSLTIKKPNELSRVLGLKTLATHGLAAVNSVP WDTIANYAKPFLNKVVSTTTNIVTRCLNRVCTNYMPY FFTLLLQLCT
339	86	5107	5192	IADKYVRNLQHRLYECLYRNRDVDTDFVNEFYAYLRK HFSMMILSDDAVVCFNSTYASQGLVASIKNFKSVLYYQ NNVFMSEAKCW
340	80	4961	5040	RQFHQKLLKSIAATRGATVVIGTSKFYGGWHNMLKTV YSDVENPHLMGWDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLARK HTTCCSL
341	80	6465	6544	GHFDGQQGEVPVSIINNTVYTKVDGVDVELFENKTTLP VNVAFELWAKRNIKPVPEVKILNNLGVDIAANTVIWD YKRDA
342	92	5943	6034	LHPTQAPTHLSVDTKFKTEGLCVDIPGIPKDMTYRRLIS MMGFKMNYQVNGYPNMFITREEAIRHVRAWIGFDVE GCHATREAVGTNLPLQL
343	55	2935	2989	DTNVLEGSVAYESLRPDTRYVLMDGSIIQFPNTYLEGS VRVVTTFDSEYCRHGTC
344	96	4782	4877	DKRTTCFSVAALTNNVAFQTVKPGNFNKDFYDFAVSK GFFKEGSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYYRYNLPTMC DIRQLLFVVEVVDKYFDCYDG
345	107	822	928	KVTFGDDTVIEVQGYKSVNITFELDERIDKVLNEKCSA YTVELGTEVNEFACVVADAVIKTLQPVSELLTPLGIDL DEWSMATYYLFDESGEFKLASHMYCSFYPPD
346	80	7406	7485	KGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFAS VYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK LND
347	91	7287	7377	EFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDL PIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVG YLQPRTFLLKYNE

348	102	6622	6723	EAVKTQFNYYKKVDGVVQQLPETYFTQSRNLQEFKPR SQMEIDFLELAMDEFIERYKLEGYAFEHIVYGDFSHSQL GGLHLLIGLAKRFKESPFELEDFIPM
349	97	6800	6896	SQAWQPGVAMPNLYKMQRMLLEKCDLQNYGDSATLP KGIMMNVAKYTQLCQYLNTLTLAVPYNMRVIHFGAGS DKGVAPGTAVLRQWLPTGTLLVDS
350	77	8568	8644	DCVVLHSYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFFIYNKI VDEPEEHVQIHTIDGSSGVVNPVMEPIYDEPTTTTSVPL
351	37	8683	8719	LCAYCCNIVNVSLVKPSFYVYSRVKNLNSSRVPDLLV
352	124	8818	8941	SFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESEL VIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTLS YYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLNTDHSSSS DNIALLVQ
353	85	9039	9123	SGTYEGNSPFHPLADNKFALTCFSTQFAFACPDGVKHV YQLRARSVSPKLFIRQEEVQELYSPIFLIVAAIVFITLCFT LKRKTE
354	107	9552	9658	TKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKH WPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIK LDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKD
355	81	3149	3229	STKHFYWFFSNYLKRRVVFNGVSFSTFEEAALCTFLLN KEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYNKYKYFSGAMD TTSYREA
356	84	4057	4140	VPLNIIPLTTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTTFTYASAL WEIQQVVDADSKIVQLSEISMDNSPNLAWPLIVTALRA NSAVKLQ
357	80	441	520	EGSEGLNDNLLEILQKEKVNINIVGDFKLNEEIAIILASF SASTSAFVETVKGLDYKAFKQIVESCGNFKVTKGKAK KGA
358	108	523	630	IGEQKSILSPLYAFASEAARVVRSIFSRTLETAQNSVRVL QKAAITILDGISQYSLRLIDAMMFTSDLATNNLVVMAY ITGGVVQLTSQWLTNIFGTVYEKLKPVLDW
359	77	993	1069	GSEDNQTTTIQTIVEVQPQLEMELTPVVQTIEVNSFSGY LKLTDNVYIKNADIVEEAKKVKPTVVVNAANVYLKHG G

360	81	1123	1203	NKGEDIQLLKSAYENFNQHEVLLAPLLSAGIFGADPIHS LRVCVDTVRTNVYLAVFDKNLYDKLVSSFLEMKSEKQ VEQKI
361	104	1351	1454	SAFYILPSIISNEKQEILGTVSWNLREMLAHAEETRKLM PVCVETKAIVSTIQRKYKGIKIQEGVVDYGARFYFYTSK TTVASLINTLNDLNETLVTMPLGYVT
362	104	1409	1512	IKIQEGVVDYGARFYFYTSKTTVASLINTLNDLNETLVT MPLGYVTHGLNLEEAARYMRSLKVPATVSVSSPDAVT AYNGYLTSSSKTPEEHFIETISLAGSYK
363	82	1611	1692	NSHEGKTFYVLPNDDTLRVEAFEYYHTTDPSFLGRYMS ALNHTKKWKYPQVNGLTSIKWADNNCYLATALLTLQ QIELKFNP
364	76	7115	7190	TTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLP FFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAS
365	83	7014	7096	REQIDGYVMHANYIFWRNTNPIQLSSYSLFDMSKFPLK LRGTAVMSLKEGQINDMILSLLSKGRLIIRENNRVVISS DVLVNN
366	61	8942	9002	MFHLVDFQVTIAEILLIIMRTFKVSIWNLDYIINLIIKNLS KSLTENKYSQLDEEQPMEID
367	84	8046	8129	DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKV EAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAA TKMSECV
368	63	3943	4005	AIASEFSSLPSYAAFATAQEAYEQAVANGDSEVVLKKL KKSLNVAKSEFDRDAAMQRKLEKMA
369	80	4174	4253	TTKGGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSDGTGTIYTELEP PCRFVTDTPKGPKVKYLYFIKGLNNLNRGMVLGSLAA TVRLQ

[00185] Для каждой из выбранных длинных последовательностей с **SEQ ID NO: 328** по **SEQ ID NO: 369** количество аллелей HLA класса I и HLA класса II, в отношении которых было спрогнозировано высокое или умеренное связывание, представлено в **таблице 5**.

Таблица 5

Количество аллелей HLA класса I и HLA класса II, в отношении которых было спрогнозировано высокое или умеренное связывание в пределах выбранных длинных пептидных последовательностей SARS-CoV-2, содержащих высокую плотность связывающих мотивов для HLA класса I и/или HLA класса II (SEQ ID NO: 328-369)

SEQ ID NO.	Длина	Положение относительно N-конца SEQ ID NO: 410	Положение относительно C-конца SEQ ID NO: 410	Количество аллелей HLA класса II			Количество аллелей HLA класса I		
				Умеренная + высокая аффинность	Умеренная аффинность	Умеренная + высокая аффинность	Умеренная аффинность	Высокая аффинность	Умеренная + высокая аффинность
328	66	2580	2645	40	21	43	64	50	68
329	106	4891	4996	42	26	43	63	48	66
330	87	5238	5324	44	26	46	64	57	69
331	45	6407	6452	38	49	49	66	70	70
332	98	4704	4801	48	24	48	58	49	61
333	83	7757	7839	34	21	36	63	39	64
334	70	1532	1601	32	17	35	60	52	63
335	82	7948	8029	41	24	43	61	32	62
336	117	5531	5647	46	24	46	68	47	68
337	84	231	314	37	11	38	61	44	70
338	85	2097	2181	43	16	44	65	45	70
339	86	5107	5192	47	38	49	58	33	59
340	80	4961	5040	39	23	40	59	53	64
341	80	6465	6544	36	9	37	63	41	65
342	92	5943	6034	37	17	43	61	38	64
343	55	2935	2989	29	8	29	59	39	63
344	96	4782	4877	39	17	40	65	46	68
345	107	822	928	33	15	36	64	48	64
346	80	7406	7485	41	18	42	61	37	64
347	91	7287	7377	47	31	49	63	49	66
348	102	6622	6723	38	18	38	66	49	68
349	97	6800	6896	38	20	40	66	36	66
350	77	8568	8644	32	14	35	54	24	58

351	37	8683	8719	25	9	29	36	27	48
352	124	8818	8941	40	23	41	68	49	70
353	85	9039	9123	38	19	39	65	44	69
354	107	9552	9658	37	13	37	66	47	69
355	81	3149	3229	45	29	45	55	41	60
356	84	4057	4140	44	31	47	65	44	67
357	80	441	520	39	28	44	50	20	52
358	108	523	630	48	21	48	70	51	70
359	77	993	1069	36	12	37	59	41	62
360	81	1123	1203	41	13	43	64	41	70
361	104	1351	1454	45	24	47	64	38	67
362	104	1409	1512	41	26	44	61	35	63
363	82	1611	1692	41	14	42	59	47	69
364	76	7115	7190	39	17	39	63	26	63
365	83	7014	7096	46	21	46	63	38	67
366	61	8942	9002	37	23	43	44	11	46
367	84	8046	8129	38	19	38	60	35	62
368	63	3943	4005	35	27	40	52	26	56
369	80	4174	4253	46	27	47	64	17	64

[00186] Дополнительно к длинным пептидным последовательностям с **SEQ ID NO: 328** по **SEQ ID NO: 369** также идентифицировали тридцать девять (39) более коротких последовательностей с длиной, варьирующей от 31 до 47 аминокислотных остатков. Тридцать девять более коротких пептидных последовательностей, соответствующих частям последовательности в пределах участка с **SEQ ID NO: 328** по **SEQ ID NO: 369** с наиболее высоким количеством связывающих мотивов для HLA класса I и класса II, представлены в **таблице 6** (**SEQ ID NO: 370-408**). В соответствии с вариантами осуществления эти более короткие пептиды могут быть соединены последовательно для вставки и экспрессии с вектора на основе аденовируса.

Таблица 6

Выбранные более короткие пептидные последовательности SARS-CoV-2, содержащие высокую плотность связывающих мотивов для HLA класса I и/или HLA класса II (SEQ ID NO: 370-408)

SEQ ID No	Содержащиеся в SEQ ID NO:	Длина	Положение относительно N-конца	Положение относительно C-конца	Последовательность
370	328	45	2589	2633	KMFDAYVNTFSSTFNVPMEKLKTLVATAEAELAKNVSLDNVLSTF
371	329	41	4911	4951	MSYEDQDALFAYTKRNVIPTITQMNLKYAISAKNRARTVAG
372	330	45	5243	5287	DGTLMIERFVSLAIDAYPLTKHPNQEYADVFHLYLQYIRKLHDEL
373	331	43	6410	6452	RHHANEYRLYLDAYNMMISAGFSLWVYKQFDTYNLWNTFTRLQ
374	332	41	4704	4744	NFNVLFSTVFPPTSFGPLVRKIFVDGVPFVVSTGYHFRELG
375	333	45	7781	7825	RSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPV
376	334	47	1532	1578	DKSVYYTSNPTTFHLDGEVITFDNLKTLLSLREVRTIKVFTTVDNIN
377	335	45	7961	8005	LTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGI
378	336	45	5532	5576	AVVYRGTTTYKLNVGDYFVLTSHTVMPLSAPTLVPQEHYVRITGL
379	337	41	243	283	ERSEKSYELQTPFEIKLAKKFDTFNGECPNFVFPLNSIIKT
380	338	45	2097	2141	AAYVDNSSLTIKKPNELSRVLGLKTLATHGLAAVNSVPWDTIANY
381	339	41	5129	5169	VDTDFVNEFYAYLRKHFSMMILSDDAVVCFNSTYASQGLVA
382	339	33	5158	5190	FNSTYASQGLVASIKNFKSVLYYQNNVFMSEAK
383	340	43	4997	5039	VYSDVENPHLMGWDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLARKHTTCCS
384	342	45	5972	6016	KDMTYRRLISMMGFKMNYQVNGYPNMFITREEAIRHVRAWIGFDV
385	343	41	2945	2985	YESLRPDTRYVLMDGSIIQFPNTYLEGSVRVVTTFDSEYCR
386	344	41	4817	4857	SKGFFKEGSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYYRYNLPTMCD
387	345	43	881	923	KTLQPVSELLTPLGIDLDEWSMATYYLFDESGEFKLASHMYCS
388	346	45	7418	7462	PTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYS
389	346	43	7443	7485	FASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLND
390	347	45	7332	7376	TRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYN
391	350	42	8570	8611	VVLHSYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFFIYNKIVDEPEE
392	351	31	8689	8719	NIVNVSLVKPSFYVYSRVKNLNSSRVPDLLV
393	352	43	8884	8926	PKEITVATSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN
394	353	42	9073	9114	VKHVYQLRARSVSPKLFIRQEEVQELYSPIFLIVAAIVFITL
395	354	42	9587	9628	HWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDD

396	355	46	3149	3194	STKHFYWFFSNYLKRRVVFNGVSFSTFEEAALCTFLLNKEMYLKLR
397	355	46	3184	3229	LLNKEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYNKYKYFSGAMDTTSYREA
398	356	44	4057	4100	VPLNIIPLTTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTTFTYASALWEIQQ
399	357	42	460	501	NINIVGDFKLNEEIAIILASFSASTSAFVETVKGLDYKAFKQ
400	358	43	528	570	SILSPLYAFASEAARVVRSIFSRTLETAQNSVRVLQKAAITIL
401	359	43	994	1036	SEDNQTTTIQTIVEVQPQLEMELTPVVQTIEVNSFSGYLKLTD
402	360	43	1154	1196	FGADPIHSLRVCVDTVRTNVYLAVFDKNLYDKLVSSFLEMKSE
403	361	43	1410	1452	KIQEGVVDYGARFYFYTSKTTVASLINTLNDLNETLVTMPLGY
404	363	41	1616	1656	KTFYVLPNDDTLRVEAFEYYHTTDPSFLGRYMSALNHTKKW
405	366	46	8944	8989	HLVDFQVTIAEILLIIMRTFKVSIWNLDYIINLIIKNLSKSLTENK
406	367	44	8083	8126	VEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMS
407	368	36	3943	3978	AIASEFSSLPSYAAFATAQEAYEQAVANGDSEVVLK
408	369	41	4213	4253	CRFVTDTPKGPKVKYLYFIKGLNNLNRGMVLGSLAATVRLQ

[00187] Для каждой из **SEQ ID NO: 370-408** (**таблица 3**) количество аллелей HLA класса I и HLA класса II, в отношении которых было спрогнозировано высокое или умеренное связывание, представлено в **таблице** 7.

Таблица 7

Количество аллелей HLA класса I и HLA класса II, в отношении которых было спрогнозировано высокое или умеренное связывание в пределах выбранных более коротких пептидных последовательностей SARS-CoV-2, содержащих высокую плотность связывающих мотивов для HLA класса I и/или HLA класса II (SEQ ID NO: 370-408)

SEQ ID NO:	Длина	Положение относительно N-конца SEQ ID NO: 410	Положение относительно C-конца SEQ ID NO: 410	Количество аллелей HLA класса II			Количество аллелей HLA класса I		
				Умеренная аффинность	Высокая аффинность	Умеренная + высокая аффинность	Умеренная аффинность	Высокая аффинность	Умеренная + высокая аффинность
370	45	2589	2633	27	14	32	59	50	67
371	41	4911	4951	31	13	32	57	30	65
372	45	5243	5287	37	15	40	61	43	65
373	43	6410	6452	35	15	39	63	37	68
374	41	4704	4744	32	14	35	48	34	55
375	45	7781	7825	31	15	33	54	35	55
376	47	1532	1578	31	16	34	56	41	60
377	45	7961	8005	35	19	37	53	30	55
378	45	5532	5576	38	18	39	59	40	64
379	41	243	283	28	5	30	47	36	60
380	45	2097	2141	34	10	35	63	36	68
381	41	5129	5169	45	32	49	44	21	47
382	33	5158	5190	33	14	37	37	13	41
383	43	4997	5039	32	15	35	45	37	57
384	45	5972	6016	32	17	38	50	31	56
385	41	2945	2985	24	6	24	56	37	61
386	41	4817	4857	23	6	23	52	32	60
387	43	881	923	25	7	26	47	36	58
388	45	7418	7462	33	15	35	51	28	58
389	43	7443	7485	31	9	34	33	14	34
390	45	7332	7376	39	24	41	48	37	56
391	42	8570	8611	28	12	31	41	19	47
392	31	8689	8719	25	9	29	36	27	48

393	43	8884	8926	34	16	35	53	24	53
394	42	9073	9114	27	16	31	58	32	67
395	42	9587	9628	29	11	30	54	28	61
396	46	3149	3194	36	24	41	45	23	52
397	46	3184	3229	34	13	35	46	27	53
398	44	4057	4100	34	16	40	43	32	47
399	42	460	501	33	26	40	46	13	48
400	43	528	570	42	16	42	62	18	63
401	43	994	1036	20	6	23	41	23	47
402	43	1154	1196	33	8	34	56	29	60
403	43	1410	1452	30	16	34	50	28	52
404	41	1616	1656	32	10	35	45	36	58
405	46	8944	8989	36	22	43	42	11	44
406	44	8083	8126	32	14	34	49	18	52
407	36	3943	3978	27	19	30	40	18	45
408	41	4213	4253	36	20	41	43	8	44

[00188] Для каждой из выбранных последовательностей с **SEQ ID NO: 328** по **SEQ ID NO: 369** карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II представлена на **фиг. 29-70**. На **фиг. 29-70** N-концевая аминокислота (т.е. аминокислота №1) в каждом мотиве для HLA класса I и II обозначена как X или O, причем X дополнительно указывает на мотив с высокой аффинностью, а O указывает на умеренную аффинность у связывающего мотива в отношении HLA. Иллюстративные связывающие мотивы для HLA можно вывести из **фиг. 29-70** посредством включения аминокислотного остатка X или O и включения последующих восьми-десяти аминокислот в мотив таким образом, чтобы каждый мотив включал девять-одиннадцать аминокислотных остатков (т.е. каждый мотив представляет собой 9-11-аминокислотный пептид) с учетом номера SEQ ID, указанного на каждой фигуре. Любые такие связывающие мотивы можно применять в качестве иммуногенов отдельно и/или в комбинации в векторах, раскрытых в данном документе. Другие связывающие мотивы в любой из **SEQ ID NO. 328-369** также могут являться подходящими для включения в векторы для иммунизации против SARS-CoV-2, представленные в данном документе, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00189] *Последовательности RBD, соответствующие циркулирующим вариантам SARS-CoV-2*

[00190] Как описано выше, векторы на основе rdAd могут быть сконструированы таким образом, что они кодировали последовательности, гомологичные **SEQ ID NO: 13**, **SEQ ID NO: 14**, **SEQ ID NO: 15** или любым последовательностям, содержащим **SEQ ID NO: 446** с дополнительными фланкирующими остатками или без них и включающим одну или несколько мутаций в RBD, как те, которые описаны на **фиг. 17B**. Предпочтительно, варианты последовательности RBD могут включать в себя одиночную или комбинированные мутации в положениях аминокислот 367, 403, 439, 417, 446, 447, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 487, 490, 493, 494, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505, причем нумерация положений аминокислот соответствует **SEQ ID NO: 3** (полноразмерный спайк-белок) (**фиг. 17B**). Более предпочтительно, последовательности RBD включают в себя одиночную или комбинированные мутации в положении K417T, K417N, E484K, L452R и/или N501Y (**фиг. 17B**). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления варианты белковой последовательности RBD могут быть выбраны из группы, состоящей из **SEQ ID NO: 412-417**, в которых последовательность RBD выделена подчеркиванием:

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии California CAL.20C B.1.429:

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKC
VFNFN (**SEQ ID NO: 412**)

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии Brazil P.2 линии B.1.1.28.2:

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKC
VFNFN (**SEQ ID NO: 413**)

RBD спайк-белка из SARS-CoV UK VOC 202012/01; линии B.1.1.7 (также известная как 20I/501Y.V1):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKC
VFNFN (**SEQ ID NO: 414**)

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии UK B.1.1.7 (E484K):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKC
VFNFN (**SEQ ID NO: 415**)

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии Brazil P.1 линии B.1.1.28.1 (также известная как 20J/501Y.V3):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGTIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKC
VFNFN (**SEQ ID NO: 416**)

Южно-Африканская линия 501Y.V2 B.1.351 (также известная как 20H/501Y.V2):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKC
VFNFN (**SEQ ID NO: 417**)

[00191] В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления перед последовательностями RBD, подлежащими экспрессии с помощью rdAd (моновалентный вектор с RBD), будет находиться лидерная последовательность/последовательность сигнального пептида для направления экспрессии полипептида по пути секреции из клетки. Широко применяемые лидерные пептидные последовательности для эффективного нацеливания рекомбинантного белка, экспрессируемого в клетках млекопитающего, описаны в **таблице 9**.

Таблица 9

Название лидерной последовательности	**Последовательность**
OSM человека	MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM (**SEQ ID NO: 418**)
VSV-G	MKCLLYLAFLFIGVNC (**SEQ ID NO: 419**)
Ig-каппа мыши	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD (**SEQ ID NO: 420**)
IgG2 H человека	MGWSCIILFLVATATGVHS (**SEQ ID NO: 421**)
BM40	MRAWIFFLLCLAGRALA (**SEQ ID NO: 422**)
Секрекон (Secrecon)	MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA (**SEQ ID NO: 423**)
IgKVIII человека	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC (**SEQ ID NO: 424**)
CD33	MPLLLLLPLLWAGALA (**SEQ ID NO: 425**)
tPA	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS (**SEQ ID NO: 426**) MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGS (**SEQ ID NO: 427**)
Химотрипсиноген человека	MAFLWLLSCWALLGTTFG (**SEQ ID NO: 428**)
Трипсиноген-2 человека	MNLLLILTFVAAAVA (**SEQ ID NO: 429**)
IL-2 человека	MYRMQLLSCIALSLALVTNS (**SEQ ID NO: 430**)
Люцифераза Gaussia	MGVKVLFALICIAVAEA (**SEQ ID NO: 431**)
Альбумин (HSA)	MKWVTFISLLFSSAYS (**SEQ ID NO: 432**)
Гемагглютинин вируса гриппа	MKTIIALSYIFCLVLG (**SEQ ID NO: 433**)
Инсулин человека	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA (**SEQ ID NO: 434**)
LC фиброина шелкопряда	MKPIFLVLLVVTSAYA (**SEQ ID NO: 435**)
Белок E3/gp19K адновируса	MRYMILGLLALAAVCSAA (**SEQ ID NO: 436**)
IgG	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (**SEQ ID NO: 437**)

[00192] *Варианты последовательностей RBD и композиции поливалентных вакцин*

[00193] Предпочтительной также может являться разработка поливалентных иммуногенных композиций или вакцин, обеспечивающих иммунитет против одновременно циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 и, возможно, против будущих вариантов. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления поливалентные генетические иммуногенные композиции или композиции вакцин можно получить посредством объединения нескольких моновалентных генетических иммуногенных композиций или композиций вакцин, каждая из которых экспрессирует вариант последовательности антигена, в одном препарате. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна генетическая конструкция также может быть сконструирована для совместной экспрессии нескольких вариантов последовательности антигена, обеспечивая поливалентные иммуногенные композиции или композицию вакцины против RBD SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, например, вектор на основе rdAd согласно настоящему раскрытию может содержать одну или более экспрессионных кассет, содержащих кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, которая включает одну или более мутаций в RBD участке спайк-белка и которая будет способна защищать от циркулирующих вариантов SARS-CoV-2 и, возможно, от будущих вариантов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна генетическая конструкция может содержать несколько блоков вариантов RBD, расположенных колинеарно в пределах одной экспрессионной кассеты. Блоки вариантов RBD могут быть выбраны из **SEQ ID NO: 13**, **SEQ ID NO: 14**, **SEQ ID NO: 15** или любых последовательностей, содержащих **SEQ ID NO: 446** с дополнительными фланкирующими остатками или без них и включающих одну или несколько мутаций в RBD, как те, которые описаны на **фиг. 17B**. Каждый блок варианта RBD может быть отделен от другого варианта RBD при колинеарном размещении гибкой спейсерной последовательностью, содержащей, например, глициновые и сериновые аминокислотные остатки. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления спейсерный пептид может содержать аминокислотную последовательность (GGGGS)n, (GGGGA)n, (GGGGQ)n, (GGGPS)n, (GPGPG)n и их комбинации, где n составляет от 1 до 10. Подходящими также могут быть другие спейсеры, предпочтительно, гидрофильные по своей природе и содержащие полярные аминокислоты, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления спейсеры могут включать в себя один или более мотивов для протеолитического расщепления пропротеин-конвертазами (PC), также известными как эукариотические субтилазы, представленные группой сериновых протеаз, содержащих фурин (PACE), PC1 (PC3), PC2, PC4, PACE4, PC5 (PC6) и PC7 (LPC, PC8), которые образуют биологически активные белки и пептиды, такие как гормоны, рецепторы и ростовые факторы, посредством расщепления белков-предшественников в мотивах с несколькими основными аминокислотами. В соответствии с предпочтительными вариантами

осуществления такие мотивы с несколькими основными аминокислотами включают в себя описанные в таблице ниже:

Таблица 8

Названия пропротеин-конвертазы	**Специфичность сайта расщепления**
PC1/3	KR↓ или RR↓
PC2	KR↓ или RR↓
фурин; PACE	RXK/RR↓ RXXR↓ RXRXXXR/KR↓
PC4	KXXR↓ RXK/RR↓
PC5/6A; PC5/6B	RXK/RR↓
PACE4	RXK/RR↓
PC7; PC8; LPC; SPC7	RXK/RR↓

X=любая природная аминокислота; ↓ =положение, по которому происходит расщепление

[00194] Спейсерные последовательности предпочтительно являются оптимизированными для избежания введения неоэпитопов в последовательность псевдобелка. Более того, разные спейсеры можно комбинировать в одной последовательности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления спейсеры могут включать в себя гибкую часть и расщепляемую часть. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления разные спейсерные последовательности можно применять между блоками вариантов RBD в пределах одной поливалентной конструкции. В предпочтительном поливалентном векторе с RBD количество блоков вариантов RBD, размещенных колинеарно в одной генетической последовательности, может варьировать от 2 до 10 блоков, предпочтительно, 2-6 блоков. Относительный порядок размещения последовательностей вариантов RBD также может варьировать; при этом применяют спейсер, вводимый таким образом, чтобы каждый блок варианта RBD являлся независимым в плане иммуногенных свойств. Каждый блок варианта RBD может включать в себя любую одну мутацию или комбинацию мутаций, которые описаны на **фиг. 17B**.

[00195] Предпочтительно, последовательности вариантов RBD могут включать в себя одну или комбинированные мутации в положениях 367, 403, 439, 417, 446, 447, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 487, 490, 493, 494, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505 (**фиг. 17B**). Более предпочтительно, последовательности RBD включают в себя одну или комбинированные мутации в положении K417T, K417N, E484K, L452R и/или N501Y, причем нумерация положений аминокислот соответствует **SEQ ID NO: 3** (полноразмерный

спайк-белок) (**фиг. 17B**). **SEQ ID NO: 438-443** и **460** представлены в качестве предпочтительных вариантов осуществления последовательностей вариантов RBD, которые можно применять для конструирования поливалентного вектора с RBD. Предпочтительные примеры поливалентных последовательностей RBD, содержащих несколько блоков вариантов RBD, представлены в виде **SEQ ID NO: 444**, **SEQ ID NO: 445, SEQ ID NO: 475 и SEQ ID NO: 476**. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления перед поливалентными последовательностями RBD, подлежащими экспрессии с помощью rdAd («поливалентный вектор с RBD», тип поливалентного hAd5-SARS-CoV-2), будет находиться лидерная последовательность/последовательность сигнального пептида для направления экспрессии полипептида по пути секреции из клетки. Широко применяемые лидерные пептидные последовательности для эффективного нацеливания рекомбинантного белка, экспрессируемого в клетках млекопитающего, описаны в **таблице 9**.

[00196] В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления варианты белковой последовательности RBD могут быть выбраны из группы, состоящей из **SEQ ID NO: 438-443** и **460**, и иллюстративные поливалентные конструкции с RBD представлены в **SEQ ID NO: 444, 445, 475** и **476** ниже, в которых последовательность RBD выделена подчеркиванием:

RBD спайк-белка из SARS-CoV (GenBank: MN908947.3):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTF (**SEQ ID NO: 438**) (CVFNFN заменены на SVNFT)

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии California CAL.20C B.1.429:

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTF (**SEQ ID NO: 439**) (CVFNFN заменены на SVNFT)

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии Brazil P.2 линии B.1.1.28.2:

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTF (**SEQ ID NO: 440**) (CVFNFN заменены на SVNFT)

RBD спайк-белка из SARS-CoV UK VOC 202012/01; линии B.1.1.7 (также известная как 20I/501Y.V1):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTF (**SEQ ID NO: 460**) (CVFNFN заменены на SVNFT)

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии UK B.1.1.7 (E484K):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTF (**SEQ ID NO: 441**) (CVFNFN заменены на SVNFT)

RBD спайк-белка из SARS-CoV линии Brazil P.1 линии B.1.1.28.1 (также известная как 20J/501Y.V3):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGTIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTF (**SEQ ID NO: 442**) (CVFNFN заменены на SVNFT)

Южно-Африканская линия 501Y.V2 B.1.351 (также известная как 20H/501Y.V2):

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTF (**SEQ ID NO: 443**) (CVFNFN заменены на SVNFT)

Поливалентная конструкция с комбинацией RBD, содержащая **SEQ ID NO: 438**, **SEQ ID NO: 443** и **SEQ ID NO: 441**:

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTFGGGGSGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVF
NATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSF
VIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRK
SNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELL
HAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTFGGGGSGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFR
VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKC
YGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNS
NNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGF

QPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTF (**SEQ ID NO: 444**) (спейсер $(GGGGS)_3$)

Поливалентная конструкция с комбинацией RBD, содержащая **SEQ ID NO: 438**, **SEQ ID NO: 443** и **SEQ ID NO: 441**:

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTFGGGGSGGGGSRRKRSVGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRF
PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLN
DLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG
GNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGY
QPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTFGGGGSGGGGSRRKRSVGGGG
SGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQT
GKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQ
AGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTN
LVKNKSVNFTF (**SEQ ID NO: 445**) (спейсер $(GGGGS)_2RRKRSV(GGGGS)_2$)

Поливалентная конструкция с комбинацией RBD, содержащая **SEQ ID NO: 438**, **SEQ ID NO: 439**, **SEQ ID NO: 440**, **SEQ ID NO: 441**, **SEQ ID NO: 442** и **SEQ ID NO: 443**

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTFGGGGSGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVF
NATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSF
VIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRK
SNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELL
HAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTFGGGGSGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFR
VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKC
YGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNS
NNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGF
QPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTFGGGGSGGGGSGG
GGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRIS
NCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKI
ADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGS
TPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVK
NKSVNFTFGGGGSGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPF
GEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVY
ADSFVIRGDEVRQIAPGQTGTIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYR
LFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLS
FELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTFGGGGSGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTS
NFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFST
FKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIA

WNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQS
YGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTF
(**SEQ ID NO: 475**) (спейсер $(GGGGS)_2$RRKRSV$(GGGGS)_2$)

Поливалентная конструкция с комбинацией RBD, содержащая **SEQ ID NO: 438**, **SEQ ID NO: 439**, **SEQ ID NO: 440**, **SEQ ID NO: 441**, **SEQ ID NO: 442** и **SEQ ID NO: 443**

TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADY
NYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKS
VNFTFGSGGGGSRRKRSVGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNIT
NLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF
TNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYN
YRYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRV
VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTFGSGGGGSRRKRSVGGGGSGGGGSTL
KSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVA
DYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYN
YKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCN
GVKGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSV
NFTFGSGGGGSRRKRSVGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITN
LCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFT
NVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNY
LYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRV
VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTFGSGGGGSRRKRSVGGGGSGGGGSTL
KSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVA
DYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGTIADYN
YKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCN
GVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSV
NFTFGSGGGGSRRKRSVGGGGSGGGGSTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITN
LCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFT
NVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNY
LYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRV
VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKSVNFTF (**SEQ ID NO: 476**) (спейсер $(GGGGS)_2$RRKRSV$(GGGGS)_2$)

[00197] В данном документе также предусмотрены другие пептиды, полипептиды, конструкции и их комбинации, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00198] *Антагонисты связывания с рецептором*

[00199] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы для иммунизации против SARS-CoV-2 (т.е. экспрессирующие один или более экзогенных антигенов) могут содержать полинуклеотиды, кодирующие один из блокирующих SARS-CoV-2 белков (например, антагонисты связывания с рецептором). Например, известно, что коронавирусы,

такие как SARS-CoV-2, используют гомотримеры спайк (S) белка для прикрепления к клетке-хозяину, слияния и попадания в клетку-хозяина, и в это могут быть вовлечены сиаловые кислоты и/или ACE2 (заякоренный в клеточной мембране С-концом белок, который катализирует расщепление ангиотензина 1 в ангиотензин 1-9 и ангиотензина II в вазодилятатор ангиотензин 1-7, тем самым играя ключевую роль в системной регуляции давления крови (Alifano, et al. Renin-angiotensin system at the heart of COVID-19 pandemic. Biochimie, 174: 30-33 (2020)). Известно, что протеазы клетки-хозяина осуществляют процессинг S-белка коронавируса с образованием двух субъединиц (S1 и S2), которые остаются нековалентно связанными в конформации до слияния у вируса (см., например, Tortorici, et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. Nat. Struc. Mol. Biol. 26: 481-489 (2019)). Субъединица S1 содержит четыре домена: NTD, RBD, SD1 и SD1, причем NTD и RBD разделены линкерной последовательностью, которая представлена на фиг. 13. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор для иммунизации против SARS-CoV-2 может также или в качестве альтернативы содержать полинуклеотид, вызывающий экспрессию в клетке по меньшей мере одного или обоих из доменов S1 (NTD и/или RBD) или в составе полноразмерного S-белка (с трансмембранным доменом или без него) и/или их иммуногенного фрагмента, что в соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления индуцирует иммунный ответ, препятствующий связыванию S-белка (например, антитело к RDB и/или NTD домену(доменам) S1) с вышеупомянутыми сиаловыми кислотами и/или ACE2, таким образом препятствуя попаданию SARS-CoV-2 в клетку-хозяина и/или его воздействию на ACE2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор для иммунизации против SARS-CoV-2 может также или в качестве альтернативы содержать полинуклеотид, вызывающий экспрессию в клетке белка (например, антитела или его фрагмента или пептида (например, миметика ACE2, связывающего RBD пептида)), который может связываться с S-белком (например, с его RDB и/или NTD доменом(доменами) S1 и/или S2), таким образом препятствуя попаданию SARS-CoV-2 в клетку-хозяина (например, блокируя связывание S-белка с рецепторами в его клетках-хозяевах, как например, с ACE2) и/или его воздействию на ACE2 (собирательно называемые «связывающими RBD средствами»). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающее RBD средство может представлять собой пептид по меньшей мере с одним доменом, соответствующим связывающемуся с вирусом домену ACE2, например, пептид конформационно совпадает с RBD. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор для иммунизации против SARS-CoV-2 может также или в качестве альтернативы содержать полинуклеотид, вызывающий экспрессию в

клетке белка, который может связываться с ACE2 (например, связывающего ACE2 средства) и/или иным образом предотвращать прикрепление к нему S-белка (например, его RDB и/или NTD домен(домены) S1 и/или S2 могут экспрессироваться в виде свободных белков), таким образом препятствуя попаданию SARS-CoV-2 в клетку-хозяина и/или его воздействию на ACE2, предпочтительно, не препятствуя нормальному физиологическому функционированию ACE2 (т.е. отличному от его способности служить в качестве рецептора для SARS-CoV-2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такое связывающее ACE2 средство может представлять собой пептид, такой как пептид, который препятствует связыванию SARS-CoV-2 с ACE2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор для иммунизации против SARS-CoV-2 может содержать один или более полинуклеотидов, кодирующих как связывающее RBD средство, так и связывающее ACE2 средство и/или средство, связывающее как RBD, так и ACE2. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления связывающее(связывающие) RBD средство(средства) и/или связывающее(связывающие) ACE2 средство(средства) препятствуют взаимодействию ACE2 и RBD в одном или более из 15 остатков в ACE2 (24(Q), 27(T), 30(D), 31(K), 34(H), 35(E), 37(E), 38(D), 41(Y) и 42(Q) находятся в α1, один остаток (остаток 82 M) происходит из α2, остатки 353(K), 354(G), 355(D) и 357(R) происходят из линкера между β3 и β4), которые, как понятно в настоящее время, взаимодействуют с RBD (Han, et al. Computational Design of ACE2-Based Peptide Inhibitors of SARS-CoV-2. *ACS Nano* 2020, Publication Date: April 14, 2020 (https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02857); Yan, et al. Structural Basis for the Recognition of the SARS-CoV-2 by Full-Length Human ACE2. Science 367: 1444−1448 (2020)); предпочтительно, без воздействия на нормальное физиологическое функционирование (т.е. отличное от его способности служить в качестве рецептора для SARS-CoV-2) белка ACE2. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы для иммунизации против SARS-CoV-2 согласно настоящему раскрытию могут содержать один или более полинуклеотидов, кодирующих секретируемые антигены (например, связывающее S1, NTD, RBD, ACE2 средство), которые могут связываться с рецептором ACE2 и блокировать его, обеспечивая дополнительную активность помимо иммунитета.

[00200] *Доставляемые в вирусном векторе адъюванты*

[00201] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор(векторы) для иммунизации против SARS-CoV-2 может(могут) также или в качестве альтернативы содержать по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий полипептид и/или пептид, который улучшает или усиливает иммуногенность вектора(векторов) (например, действует в

качестве адъюванта (например, молекулярного адъюванта)), который экспрессируется клетками-хозяевами и содействует индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, и/или усиливает продолжающийся иммунный ответ против SARS-CoV-2, являющийся результатом введения вектора(векторов) хозяину (например, в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления без индукции системной воспалительной реакции, которая может препятствовать выздоровлению пациента от инфекции SARS-CoV-2). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор(векторы) для иммунизации против SARS-CoV-2 может(могут) кодировать один или более: 1) полипептидов или пептидов, которые функционируют в качестве «костимулирующего»(«костимулирующих») компонента(компонентов), таких как, например, полипептиды или пептиды, которые связывают члены семейства CD28 (т.е. CD28, ICOS; Hutloff, et al. Nature 1999, 397: 263–265; Peach, et al. J Exp Med 1994, 180: 2049–2058), такие как связывающие CD28 полипептиды B7.1 (CD80; Schwartz, 1992; Chen et al, 1992; Ellis, et al. J. Immunol., 156(8): 2700-9) и B7.2 (CD86; Ellis, et al. J. Immunol., 156(8): 2700-9); члены семейства интегринов (т.е. LFA-1 (CD11a / CD18); Sedwick, et al. J Immunol 1999, 162: 1367–1375; Wülfing, et al. Science 1998, 282: 2266–2269; Lub, et al. Immunol Today 1995, 16: 479–483), в том числе члены семейства ICAM (т.е. ICAM-1, -2 или -3); члены семейства CD2 (т.е. CD2, сигнальная молекула активации лимфоцитов (CDw150 или «SLAM»; Aversa, et al. J Immunol 1997, 158: 4036–4044), такая как CD58 (LFA-3; лиганд CD2; Davis, et al. Immunol Today 1996, 17: 177–187), или лиганды SLAM (Sayos, et al. Nature 1998, 395: 462–469); термостабильный антиген (HSA или CD24; Zhou, et al. Eur J Immunol 1997, 27: 2524–2528); члены семейства рецепторов TNF (TNFR) (т.е. 4-1BB (CD137; Vinay, et al. Semin Immunol 1998, 10: 481–489)), OX40 (CD134; Weinberg, et al. Semin Immunol 1998, 10: 471–480; Higgins, et al. J Immunol 1999, 162: 486–493) и CD27 (Lens, et al. Semin Immunol 1998, 10: 491–499)), такой как 4-1BBL (лиганд 4-1BB; Vinay, et al. Semin Immunol 1998, 10: 481–48; DeBenedette, et al. J Immunol 1997, 158: 551–559), TNFR ассоциированный фактор-1 (TRAF-1; лиганд 4-1BB; Saoulli, et al. J Exp Med 1998, 187: 1849–1862, Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558–565), TRAF-2 (лиганд 4-1BB и OX40; Saoulli, et al. J Exp Med 1998, 187: 1849–1862; Oshima, et al. Int Immunol 1998, 10: 517–526, Kawamata, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808–5814), TRAF-3 (лиганд 4-1BB и OX40; Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558–565; Jang, et al. Biochem Biophys Res Commun 1998, 242: 613–620; Kawamata S, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808–5814), OX40L (лиганд OX40; Gramaglia, et al. J Immunol 1998, 161: 6510–6517), TRAF-5 (лиганд OX40; Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558–565; Kawamata, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808–5814) и CD70 (лиганд CD27; Couderc, et al. Cancer Gene Ther., 5(3): 163-75). CD154 (лиганд CD40 или

«CD40L»; Gurunathan, et al. J. Immunol., 1998, 161: 4563-4571; Sine, et al. Hum. Gene Ther., 2001, 12: 1091-1102); 2) один или более цитокинов (например, которые описаны для ретровирусов в Ohs, et al. Interleukin-Encoding Adenoviral Vectors as Genetic Adjuvant for Vaccination against Retroviral Infection. PLos One, 8(12): e82528 (Dec. 2013)), такие как интерлейкин-2 (IL-2) (Rosenberg, et al. Nature Med. 4: 321-327 (1998)), IL-4, IL-5, IL-6 IL-7, IL-12 (обсуждается в Pardoll, 1992; Harries, et al. J. Gene Med. 2000 Jul-Aug;2(4):243-9; Rao, et al. J. Immunol. 156: 3357-3365 (1996)), IL-15 (Xin, et al. Vaccine, 17:858-866, 1999), IL-16 (Cruikshank, et al. J. Leuk Biol. 67(6): 757-66, 2000), IL-18 (J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2001. 127(12): 718-726), GM-CSF (CSF (Disis, et al. Blood, 88: 202-210 (1996)), IL-23, фактор некроза опухолей-альфа (TNF-α) или интерферон (например, интерферон-гамма (INF-γ)); 3) хемокины, такие как гибридные белки, содержащие CXCL10 (IP-10) и CCL7 (MCP-3), слитые с опухолевым аутоантигеном, которые, как было показано, индуцируют противоопухолевый иммунитет (Biragyn, et al. Nature Biotech. 1999, 17: 253-258), CCL3 (MIP-1α) и/или CCL5 (RANTES) (Boyer, et al. Vaccine, 1999, 17 (Supp. 2): S53-S64); 4) иммуноингибирующие белки и/или пептиды, такие как средство(средства) против CTLA-4 (Shrikant, et al. Immunity, 1996, 14: 145-155; Sutmuller, et al. J. Exp. Med., 2001, 194: 823-832), средство(средства) против CD25 (Sutmuller, выше), средство(средства) против CD4 (Matsui, et al. J. Immunol., 1999, 163: 184-193), гибридный белок IL13Rα2-Fc (Terabe, et al. Nature Immunol., 2000, 1: 515-520), противоцитокиновые средства (например, антитела или их фрагменты, такие как антитело к IL6, антитело к рецептору IL6, антитело к IL17 (например, BMS-945429 (ALD518), клазакизумаб, дупилумаб, эльсилимомаб, олокизумаб (CDP6038), силтуксимаб (силвант), сирукумаб (CNTO 136), тоцилизумаб (актемра); см. также средства, представленные в **таблице 4** в данном документе); 5) один или более агонистов TLR (пептид-миметик LPS из 7-мономерных звеньев (агонист TLR4; например, Gln Glu Ile Asn Ser Ser Tyr (**SEQ ID NO: 463**) (RS01); Ser His Pro Arg Leu Ser Ala (**SEQ ID NO: 464**) (RS02); Ser Met Pro Asn Pro Met Val (**SEQ ID NO: 465**) (RS03); Gly Leu Gln Gln Val Leu Leu (**SEQ ID NO: 466**) (RS04); His Glu Leu Ser Val Leu Leu (**SEQ ID NO: 467**) (RS05); Tyr Ala Pro Gln Arg Leu Pro (**SEQ ID NO: 468**) (RS06); Thr Pro Arg Thr Leu Pro Thr (**SEQ ID NO: 469**) (RS07); Ala Pro Val His Ser Ser Ile (**SEQ ID NO: 470**) (RS08); Ala Pro Pro His Ala Leu Ser (**SEQ ID NO: 471**) (RS09); Thr Phe Ser Asn Arg Phe Ile (**SEQ ID NO: 472**) (RS10); Val Val Pro Thr Pro Pro Tyr (**SEQ ID NO: 473**) (RS11) и Glu Leu Ala Pro Asp Ser Pro (**SEQ ID NO: 474**) (RS12)); или флагеллин (агонист TLR5 (например, FliC; Skountzou, et al. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine, Vaccine. May 28; 28(24): 4103–4112 (2010)); например, субъединицы S1 с интегрированными последовательностями

агониста TLR (Kim et al. Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and rapid translational development. EBioMedicine (2020)); и их комбинации. В данном документе также предусмотрено применение других типов молекулярных адъювантов, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00202] *Составы*

[00203] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данный вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит и экспрессирует антиген спайк (S) белка SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент, который может быть оптимизирован по кодонам для субъекта-человека, можно комбинировать с другими антигенами коронавируса (например, с антигенами, экспрессируемыми вирусным вектором) с образованием поливалентного фармацевтического состава против коронавируса. Другие компоненты могут быть включены для индукции гуморального ответа с выработкой антител к эпитопу, отличному от присутствующего в данном векторе на основе аденовируса, содержащем антиген спайк-белка. В соответствии с другими вариантами осуществления другой(другие) компонент(компоненты) можно включать с целью индукции другой ветви иммунной системы, такой как клеточно-опосредованный иммунный ответ или иммунный ответ слизистых оболочек на антиген коронавируса.

[00204] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе представлен моновалентный или поливалентный фармацевтический состав против коронавируса, подходящий для интраназального введения субъекту-человеку, содержащий: эффективное количество, составляющее по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) вектора на основе rdAd (т.е. одного или более векторов против SARS-CoV-2); и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель и/или носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе rdAd содержит и экспрессирует антиген спайк-белка SARS-CoV-2 или его иммуногенный фрагмент, оптимизированный по кодонам для субъекта-человека; и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель и/или носитель. В соответствии с определенными вариантами осуществления эффективное количество индуцирует защитный иммунный ответ, способный обеспечивать серологическую защиту, защиту слизистых оболочек или клеточную защиту (например, на основе клеточного иммунного ответа, такого как Т-клеточный) субъекта-человека от инфицирования SARS-CoV-2 в течение по меньшей мере 1 месяца (например, 28

суток или 4 недели), по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев. Период, составляющий по меньшей мере от одного месяца до по меньшей мере 14 месяцев, можно рассматривать как продолжительность защиты. В соответствии с определенными вариантами осуществления защитный иммунный ответ предусматривает комплексный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и/или Т-клеточный иммунный ответ. В соответствии с вариантами осуществления защитный иммунный ответ индуцируют с помощью однократной интраназальной дозы. В соответствии с альтернативными вариантами осуществления защитный иммунный ответ индуцируют с помощью двух или более интраназальных доз, например, с помощью примирующей дозы, за которой следует бустерная доза спустя около 2-3 недели.

[00205] В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления в данном документе представлен фармацевтический состав с иммуногенной композицией против SARS-CoV-2 (например, вакцины), подходящий для интраназального введения субъекту-человеку, содержащий: эффективное количество, составляющее 10^7 вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2 или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент, оптимизированный по кодонам для субъекта-человека, причем композиция способна индуцировать выработку нейтрализующего антитела к RBD спайк-белка у субъекта-человека; и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[00206] Что касается дозировок, путей введения, составов, адъювантов и применений для рекомбинантных вирусов и продуктов экспрессии с них, композиции согласно настоящему изобретению можно применять для парентерального, местного или мукозального введения, предпочтительно, посредством интрадермального, подкожного, интраназального или внутримышечного путей. Когда применяют мукозальное введение, представляется возможным применение перорального, глазного или назального путей. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления данные иммуногенные композиции (например, вакцину) вводят интраназально. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления данные иммуногенные композиции (например, вакцину) вводят субъекту-млекопитающему интраназально. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления

иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 можно вводить с применением устройства, такого как микроигла (например, как в Kim et al. EBioMedicine, 00 (2020)).

[00207] Иммуногенные композиции (например, составы), которые содержат представляющий интерес вектор на основе аденовируса можно получать в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики или ветеринарии. *См.* пример 1 и 2. Такие составы можно вводить в дозировках и с помощью методик, которые хорошо известны клиническим специалистам, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, масса и путь введения. Составы можно вводить отдельно (т.е. в виде отдельного(отдельных) активного(активных) средства(средств)) или их можно вводить совместно или вводить последовательно с композициями, например, с «другими» иммуногенными композициями, или аттенуированными, инактивированными, рекомбинантными иммуногенными композициями (например, с вакциной), или с терапевтическими композициями, таким образом обеспечивая поливалентные композиции, или композиции типа «коктейль», или комбинированные композиции согласно настоящему изобретению и способы их использования. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления составы могут содержать сахарозу в качестве криопротектора и полисорбат-80 в качестве неионного поверхностно-эффективного вещества. В соответствии с определенными вариантами осуществления составы дополнительно содержат ингибиторы свободнорадикального окисления этанол и гистидин, хелатор ионов металлов этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) или другие средства со сравнимой активностью (например, блокирующей или предотвращающей катализируемое ионами металлов свободнорадикальное окисление).

[00208] Композиции (например, составы) могут присутствовать в жидком препарате для мукозального введения, например, в пероральных, назальных, глазных составах и т.д., таких как суспензии, и в препаратах для парентерального, подкожного, интрадермального, внутримышечного, внутривенного введения (например, инъекционного введения), таких как стерильные суспензии или эмульсии. В таких составах вектор на основе аденовируса может находиться в смеси с подходящим носителем, разбавителем или вспомогательным веществом, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, усиливающих вязкость вспомогательных веществ или т.п. Можно применять определенные специализированные составы для мукозального введения, в том числе мукоадгезивные средства, средства, обеспечивающие проникновение в слизистые оболочки, и средства, нарушающие слизистые оболочки. Составы также можно лиофилизировать или замораживать. Составы могут

содержать вспомогательные средства, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, pH-буферные средства, адъюванты, консерванты и т.п., в зависимости от желаемого пути введения и препарата. Составы могут содержать по меньшей мере одно соединение-адъювант. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления данные иммуногенные композиции (например, вакцины) являются безадъювантными. В стандартных текстах, таких как "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985, включенных в данный документ посредством ссылки, можно получить информацию по получению подходящих препаратов без излишнего экспериментирования.

[00209] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество (например, количество, которое индуцирует защитный иммунный ответ) вектора на основе аденовируса составляет по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса, содержащего и экспрессирующего антиген спайк-белка коронавируса или его фрагмент, оптимизированный по кодонам для субъекта-человека. Как понятно специалисту в данной области техники, оптимизация по кодонам улучшает экспрессию гетерологичных генов в организме-хозяине.

[00210] В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления «эффективное количество» вектора на основе аденовируса и/или иммуногенной композиции вводят хозяину в форме, дозе и/или согласно схеме введения, достаточной для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 (например, гуморального иммунного ответа, иммунного ответа слизистых оболочек и/или клеточно-опосредованного иммунного ответа), который в соответствии с некоторыми вариантами осуществления может являться защитным против инфицирования SARS-CoV-2 (и/или развития заболевания CoV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, такими как описанные в примерах в данном документе, хозяин, которому вводили эффективное количество, может демонстрировать индукцию (например, возникновение), и/или повышение количества, и/или усиление функционирования клеток, продуцирующих антитела к SARS-CoV-2, (например, B-клеток, плазматических клеток), которые продуцируют антитела, связывающиеся с CoV и/или его антигенами (или иммуногенами), как например, ответ с выработкой специфичного к SARS-CoV-2 иммуноглобулина G (IgG). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, такими как описанные в примерах в данном документе, хозяин, которому вводили эффективное количество, может демонстрировать индукцию (например, возникновение), и/или увеличение

количества, и/или усиление функционирования клеток, формирующих клеточно-опосредованный ответ против SARS-CoV-2 (например, опосредованный Т-клетками, гранулоцитами, клетками-естественными киллерами (NK) и т.п.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хозяин, которому вводили эффективное количество, может демонстрировать индукцию (например, возникновение), и/или увеличение количества, и/или усиление функционирования клеток, продуцирующих антитела к SARS-CoV-2, и клеток, формирующих клеточно-опосредованный ответ против SARS-CoV-2.

[00211] Для того чтобы определить, демонстрирует ли хозяин, которому вводили эффективное количество, индукцию (например, возникновение) и/или увеличение количества и/или усиление функционирования клеток, продуцирующих антитела к SARS-CoV-2, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно применять специфичный в отношении SARS-CoV-2 твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Как показано в примерах с применением мышиной модели, после введения иммуногенной композиции (например, спустя 21 сутки после введения) у мышей можно забирать кровь для обеспечения образцов для определения присутствия системного антитела с применением специфичного в отношении SARS-CoV-2 ELISA (например, для определения того, что присутствует ответ с выработкой IgG, специфичного в отношении SARS-CoV-2). Вкратце, ELISA можно осуществлять посредством покрытия полистирольных 96-луночных планшетов в течение ночи при 4°C с использованием 1 мкг/мл S-белка SARS-CoV-2 в натрий-карбонатном буфере (pH 9,3). Планшеты можно промывать (например, три раза в PBS с 0,02% Tween 20) и блокировать (например, обезжиренным сухим молоком) в течение подходящего периода времени и при подходящей температуре (например, один час при 37°C с PBS, 2% BSA и 0,02% Tween 20). Сыворотку крови от вакцинированных hAd5-SARS-CoV-2 мышей можно подвергать серийному разведению (например, в PBS) и инкубировать при соответствующей температуре и в течение соответствующего периода времени (например, 37°C), промывать (например, четыре раза PBS с 0,02% Tween 20), а затем инкубировать с меченым вторичным антителом (например, меченым биотином козьим вторичным антителом к мышиному антителу) в течение соответствующего периода времени (например, один час). Образцы затем можно промывать и инкубировать с соответствующим реактивом (например, конъюгированным с HRP стрептавидином) и проявлять с применением соответствующего средства (например, тетраметилбензидинового субстрата), при этом реакцию останавливают добавлением соответствующего реактива (например, 2 н H_2SO_4) и излучение (450 нм) считывают с применением микропланшет-ридера. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления введение хозяину эффективного количества иммуногенной композиции, содержащей вектор на основе аденовируса, кодирующий один или более антигенов CoV (например, спайк-белка), может приводить в результате к экспрессии специфичных в отношении SARS-CoV-2 (например, специфичных в отношении S-белка CoV) антител конкретного типа (например, IgA, IgM, IgG) и/или в конкретном количестве (например, конкретная величина, обратная среднему значению конечного показателя ответа (например, по сравнению с не подвергавшимися воздействию хозяевами). Для определения того, было ли введено эффективное количество, также можно применять другие системы для анализа, такие как, например, без ограничения, анализы нейтрализующих антител.

[00212] Для того чтобы определить, демонстрирует ли хозяин, которому вводили эффективное количество, индукцию (например, возникновение), и/или повышение количества, и/или усиление функционирования клеток, формирующих клеточно-опосредованный ответ против SARS-CoV-2, можно применять анализы типов и/или количеств клеток, и/или анализы экспрессии цитокинов, и/или функциональные анализы. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления Т-клетки хозяина, которому вводили иммуногенную композицию, можно выделять и изучать (например, физически отделенные от других клеток и/или присутствующие в биологическом образце, таком как кровь). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления анализ внутриклеточного окрашивания цитокинов можно осуществлять для определения типа и/или количества клеток, экспрессирующих конкретный цитокин, и/или уровня такого цитокина, экспрессирующегося в них. Вкратце, биологический образец (например, кровь, селезенка) от хозяина, которому была введена иммуногенная композиция, можно выделять в конкретный момент после введения (например, через восемь-21 сутки после введения). Клетки (например, приблизительно 10^6 клеток в среде культивирования клеток (например, RPMI с 10% FBS и HEPES)), выделенные из указанного(указанных) биологического(биологических) образца(образцов), можно затем высевать в культуральный(культуральные) планшет(планшеты) (например, круглодонный 96-луночный планшет), стимулировать в течение соответствующего периода времени, при соответствующей температуре и т.д. (например, 6 часов при 37°C, 5% CO_2) в присутствии стимулятора(стимуляторов) (например, 10 мкг/мл брефелдина А и либо α-CD3 (клон 2C11), либо 10 мкг пептида CoV (например, пептида антигена спайк-белка SARS-CoV-2 (SEQ ID NO 3) в 90% DMSO). После стимуляции пептидом CoV клетки можно промывать (например, однократно фосфатно-солевым буферным раствором (PBS)) и окрашивать в отношении следующих маркеров на клеточной поверхности, указывающих на тип клеток (например, α-

CD8-PerCP-Cy 5.5 (клон 53-6.7), α-CD3-AF700 (клон 500A2) и α-CD19-BV605 (клон 1D3)). Затем клетки можно фиксировать (например, с применением формалина), пермеабилизировать, окрашивать в отношении маркерных внутриклеточных цитокинов (например, α-IFN-γ-APC (клон B27)) и анализировать с помощью проточной цитометрии (например, с применением Attune-NXT). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество может представлять собой количество иммуногенной композиции, которое повышает количество клеток, экспрессирующих цитокин (например, IFN-γ), и/или количество цитокина, экспрессируемого такими клетками.

[00213] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммунный ответ против SARS-CoV-2 является защитным, что означает, что он может защищать хозяина от воздействия одного или более из симптомов инфекции SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления защитный иммунный ответ предупреждает инфицирование SARS-CoV-2, что может быть продемонстрировано посредством вторичного заражения хозяина, которому вводили эффективное количество. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенная композиция, которая является защитной, и/или ее эффективное количество, которое является защитным, представляет собой вакцину. Для определения того, является ли иммуногенная композиция защитной, можно применять модель на животных в доклинических исследованиях. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 можно вводить мышам, чувствительным к инфекции и заболеванию, и мышей можно подвергать контрольному заражению живым SARS-CoV-2 в последующий момент времени (например, спустя 7-21 сутки после введения) и осуществлять мониторинг в отношении выживания и/или симптомов в сравнении с контрольной группой. Также можно осуществлять мониторинг симптомов инфекции SARS-CoV-2, в том числе клинических проявлений заболевания (например, симптомы в верхних и нижних дыхательных путях). Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления для того, чтобы определить, является ли иммуногенная композиция, содержащая hAd5-SARS-CoV-2, защитной (т.е. является ли она вакциной), квалифицированный специалист в данной области техники может провести исследование с контрольным заражением животных.

[00214] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после вакцинации модельного животного выполняют анализ для определения титра нейтрализующего антитела, такой как реакция нейтрализации бляшкообразования (PRNT) или реакция нейтрализации фокусов (FRNT), которые будут демонстрировать индукцию защитного иммунного ответа. В

этом случае сыворотку крови или другие биологические жидкости собирают у животных после вакцинации (например, hAd5-SARS-CoV-2), и смешивают с суспензией SARS-CoV-2, и инкубируют в течение периода времени, обеспечивающего возможность реакции антител в сыворотке крови с SARS-CoV-2. Смесь сывороточное антитело/SARS-CoV-2 выливают на конфлюентный монослой клеток-хозяев (т.е. пермиссивных для SARS-CoV-2). Поверхность слоя клеток покрывают слоем агара или карбоксиметилцеллюлозы для предотвращения беспорядочного распространения вируса SARS-CoV-2. Концентрацию бляшкообразующих единиц (pfu) можно оценить на основании количества бляшек (участков с инфицированными клетками), образовавшихся спустя несколько суток. Бляшкообразующие единицы можно измерять с помощью микроскопического исследования, с использованием флуоресцентных антител или специфичных красителей, которые реагируют с инфицированными клетками. Концентрация сыворотки для уменьшения количества бляшек на 50% по сравнению с вирусом без сыворотки обеспечивает показатель того, какое количество нейтрализующего антитела присутствует, или насколько эффективным (т.е. защитным) оно является. Этот измеряемый показатель обозначают как значение $PRNT_{50}$. Кроме того, в FRNT анализе вирус можно визуализировать с применением мечения антителами, чтобы аналогичным образом рассчитать $FRNT_{50}$. Другие способы с применением реакции нейтрализации псевдовируса или анализа ингибирования связывания с ACE-2 можно применять для количественного определения присутствия нейтрализующих антител к SARS-CoV-2.

[00215] В соответствии с определенными вариантами осуществления данная иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит эффективное количество, составляющее около 10^7 вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления данная иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит эффективное количество, составляющее около 10^8 вирусных частиц (vp) вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса. В соответствии с определенными другими иллюстративными вариантами осуществления данная иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит эффективное количество, составляющее около 10^9 вирусных частиц (vp) вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса. В соответствии с определенными другими иллюстративными вариантами осуществления данная иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит эффективное количество, составляющее около 10^{10} или больше вирусных частиц (vp) вектора на основе

репликационно-дефектного аденовируса. В соответствии с определенными другими иллюстративными вариантами осуществления данная иммуногенная композиция (например, вакцина) содержит эффективное количество, составляющее около 10^{11} или больше вирусных частиц (vp) вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления млекопитающее представляет собой животное-компаньон, или одомашненное животное, или животное, используемое в производстве пищевых продуктов, или животное, используемое в производстве кормов, или сельскохозяйственное животное, или животное, используемое в играх, или животное, используемое в гонках, или животное, используемое в спорте, такое как корова, собака, кошка, коза, овца, кролик, или свинья, или лошадь, или даже домашнюю птицу, такую как индейки, утки или куры. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления субъект-млекопитающее представляет собой человека.

[00216] *Способы применения*

[00217] В данном документе представлен способ индукции иммунного ответа против коронавируса, причем способ предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции против SARS-CoV-2 субъекту-млекопитающему. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлен способ трансмукозального введения фармацевтической дозы данной терапевтической/иммуногенной композиции (например, вакцины), способной индуцировать иммунный ответ (например, защитный иммунный ответ в случае вакцины) при интраназальном введении. В соответствии с определенными вариантами осуществления данные иммуногенные композиции содержат вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген коронавируса или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент, причем кодирующая последовательность кодирует по меньшей мере один или более В-клеточных эпитопов, один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов, и/или один или более CD4+ Т-клеточных эитопов. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления субъект-млекопитающее представляет собой человека, а антиген коронавируса происходит из SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект-млекопитающее представляет собой человека, инфицированного SARS-CoV-2 (например, госпитализированного человека). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 можно применять для лечения инфекции SARS-CoV-2 (например, у такого инфицированного и/или госпитализированного человека).

[00218] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы согласно настоящему раскрытию могут включать в себя введение одного или более иммуногенных композиций согласно настоящему раскрытию млекопитающему, предпочтительно, человеку: для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, предпочтительно, статистически значимого иммунного ответа против SARS-CoV-2; индукции защитного и/или лечебного иммунного ответа против SARS-CoV-2; индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 с приемлемым профилем безопасности; обеспечения профилактической терапии против SARS-CoV-2; снижения показателей частоты поступления в реанимационное отделение (ICU) и искусственной вентиляции легких у пациентов с ранним началом COVID-19; снижения тяжести COVID-19 у пациентов с ранним началом COVID-19, которые требуют госпитализации; ингибирования, подавления и/или предупреждения развития «цитокинового шторма» во время инфекции SARS-CoV-2 (в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления совместное введение одной или более из иммуногенных композиций с одним или более противоцитокиновыми реактивами); индукции значительных уменьшений (например, по сравнению с плацебо-контролями) уровней IL-1α, IL-6 и/или IL-12p70 и/или интерстициального воспаления легких у пациента, имеющего COVID-19 (т.е. пациента, инфицированного SARS-CoV-2); ускорения клинического улучшения и/или выздоровления у пациентов (например, госпитализированных пациентов), инфицированных SARS-CoV-2; индукции нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 (в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления IgG и/или IgA); индукции Т-клеточного иммунитета против SARS-CoV-2 (например, системного ответа и/или ответа слизистых оболочек); индукции образования резидентных секретирующих клеток памяти в костном мозге и легких; индукции иммунного ответа (например, выработки нейтрализующих антител и/или Т-клеточного иммунитета), который является эффективным и/или может быть выявлен в течение по меньшей мере 4 месяцев, в течение по меньшей мере около 5 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 7 месяцев, по меньшей мере около 8 месяцев, по меньшей мере около 9 месяцев, по меньшей мере около 10 месяцев, по меньшей мере около 11 месяцев или по меньшей мере около 12 месяцев; и/или обеспечения повторного введения (например, в качестве сезонной вакцины, вводимой около один раз каждые 11-14 месяцев) без индукции существенного иммунного ответа против самого вектора на основе аденовируса.

[00219] Доза иммуногенной композиции (например, вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2) при применении с адъювантом или без него может находиться в диапазоне от около 10^7 до около 10^{12} инфекционных единиц или бляшкообразующих единиц (ifu или pfu),

или единицей дозирования может являться вирусная частица (vp), причем 1 vp равна около 1-100 ifu или pfu. В соответствии с одним вариантом осуществления доза иммуногенной композиции или вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет около или по меньшей мере около 10^7 vp или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu). В соответствии с еще одним аспектом доза иммуногенной композиции или вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет около или по меньшей мере около 10^8 vp. В соответствии с еще одним аспектом доза иммуногенной композиции или вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет около или по меньшей мере около 10^9 vp. В соответствии с еще одним аспектом доза иммуногенной композиции или вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет около или по меньшей мере около 10^{10} vp. В соответствии с еще одним аспектом доза иммуногенной композиции или вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет около или по меньшей мере около 10^{11} vp. В соответствии с еще одним аспектом доза иммуногенной композиции или вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2, вводимая субъекту-млекопитающему, составляет около или по меньшей мере около 10^{12} vp.

[00220] Специалисту в данной области техники понятно, что эффективную дозу у мыши можно масштабировать на более крупных животных, таких как человек, собаки, свиньи, приматы, отличные от человека, норки, хорьки, кошки, лошади/лошадиные и т.д.; и эти более крупные животные являются субъектами для введения в соответствии с настоящим раскрытием. Таким образом, посредством аллометрического масштабирования (также называемого биологическим масштабированием) доза для более крупного животного может быть экстраполирована относительно дозы для мыши с получением эквивалентной дозы, исходя из массы тела или площади поверхности тела животного.

[00221] В соответствии с определенными вариантами осуществления неинвазивное введение иммуногенной композиции или вакцины на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2 включает в себя, без ограничения, местное нанесение на кожу, и/или интраназальное, и/или мукозальное, и/или перлингвальное, и/или буккальное, и/или пероральное введение и/или введение в ротовую полость. Лекарственные формы для введения иммуногенной композиции на основе Ad-вектора против SARS-CoV-2 или вакцины могут включать в себя жидкости, мази, порошки и распыляемые растворы. Активный компонент может быть смешан в стерильных условиях с

физиологически приемлемым носителем и любым консервантом, буферами, газами-вытеснителями или усилителями абсорбции, если они могут быть необходимы.

[00222] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе представлен способ трансмукозального введения терапевтической дозы иммуногенной композиции, доставляемой в векторе на основе нереплицирующегося вируса, (например, вакцины) субъекту-человеку, причем способ предусматривает интраназальное введение субъекту-человеку иммуногенной композиции (например, вакцины), содержащей эффективное количество, составляющее по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) вектора на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит и экспрессирует гетерологичный антиген SARS-CoV-2, оптимизированный по кодонам для субъекта-млекопитающего; в результате чего терапевтическая доза, вводимая трансмукозально, индуцирует защитный иммунный ответ.

[00223] В соответствии с вариантами осуществления в случае (транс)мукозального введения композиции могут присутствовать в форме и могут дозироваться с помощью приводимого в действие нажатием дозатора распыляемого раствора, насоса-дозатора, многодозового дозатора, дозатора типа пипетки или аэрозольного дозатора. Такие дозаторы также можно использовать для доставки композиции в слизистую оболочку рта (например, буккально или перлингвально) или ротовую полость. Аэрозоли обычно находятся под давлением с использованием углеводорода. Насосы-дозаторы предпочтительно могут дозировать отмеренную дозу или дозу, характеризующуюся конкретным размером частиц. Распределение размера частиц/капель аэрозоля может быть выражено посредством любого из: масс-медианного аэродинамического диаметра (MMAD) — размера капель, при котором половина массы аэрозоля содержится в меньших каплях, а половина - в больших каплях; объемного среднего диаметра (VMD); массового медианного диаметра (MMD) или фракции тонкодисперсных частиц (FPF) — процента частиц, которые имеют диаметр <5 мкм. Измерения этих показателей можно выполнять на основании импакции (MMD и MMAD) или с помощью лазера (VMD). Для жидких частиц VMD, MMD и MMAD могут являться такими же при поддержании условий окружающей среды, например, при стандартной влажности. Тем не менее, если влажность не поддерживают, определенные значения MMD и MMAD будут меньше, чем VMD вследствие дегидратации во время измерений с применением импактора. В контексте данного описания измеряемые показатели VMD, MMD и MMAD рассматривают в

стандартных условиях, вследствие чего описания VMD, MMD и MMAD будут сравнимыми. Частицы, имеющие масс-медианный аэродинамический диаметр (MMAD), составляющий больше чем около 5 микрон, обычно не достигают легкого; вместо этого при пероральном введении они обычно ударяются в заднюю часть горла и проглатываются и, возможно, абсорбируются в ротовой полости; и частицы этого размера, вводимые назально, будут оседать на слизистой оболочке носа. Частицы, имеющие диаметры от около 1 до около 5 микрон, являются достаточно небольшими для достижения пространства от верхней до средней области легких (дыхательные пути, в которых не происходит газообмен), но которые являются слишком крупными для достижения альвеол. Меньшие частицы, т.е. от около 0,5 до около 2 микрон, способны достигать альвеолярной области. Частицы, имеющие диаметры, меньшие чем около 0,5 микрона, также могут откладываться в альвеолярной области вследствие оседания, хотя очень маленькие частицы могут выдыхаться. В зависимости от того, является ли желательным мукозальное введение в слизистую оболочку носа, или в верхнюю-среднюю область легких, или в альвеолы, квалифицированный специалист может достичь любые или все из этих целей, исходя из настоящего раскрытия и знаний из уровня техники. Кроме того, в случае интраназального введения преимущественно можно применять распыляющее устройство, такое как LMA MAD300 от Teleflex LLC (распыляющее устройство для интраназального введения в слизистую оболочку LMA™ #MAD300 носовое устройство без шприца с длиной наконечника 1,65 дюйма и диаметром 0,17 дюйма). Аэрозольное устройство или дозатор, такой как распылитель, который доставляет аэрозоль, имеющий типичный размер частиц от около 30 до около 100 микрон, в слизистую оболочку органов обоняния или слизистые оболочки носа, можно преимущественно использовать в практическом осуществлении настоящего изобретения, и преимущественные размеры частиц в каплях составов согласно настоящему раскрытию могут составлять от около 30 до около 100 микрон, например, от около 30, или от около 40, или от около 50 до около 60, или до около 70, или до около 80, или до около 90, или до около 100 микрон, в случае интраназального введения.

[00224] В соответствии с вариантами осуществления данный фармацевтический состав против SARS-CoV-2 применяют для обеспечения защиты от сезонного коронавируса. В соответствии с определенными другими вариантами осуществления данный фармацевтический состав против CoV применяют для обеспечения защиты от пандемического SARS-CoV-2. В соответствии с определенными другими вариантами осуществления данный фармацевтический состав против SARS-CoV-2 применяют для обеспечения защиты от SARS-CoV-2. В соответствии с вариантами осуществления серологическая защита длится по

меньшей мере около 1 месяц, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 10 месяцев, 12 месяцев или по меньшей мере около 13 месяцев.

[00225] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представлен способ индукции иммунного ответа против коронавируса, причем способ предусматривает введение однократной дозы данной иммуногенной композиции/состава/дозы субъекту-млекопитающему (например, человеку). В соответствии с определенными вариантами осуществления способ предусматривает интраназальное введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту-млекопитающему, причем иммунный ответ обеспечивает защиту от вторичного заражения SARS-CoV-2. В соответствии с определенными вариантами осуществления представлен способ индукции комплексного защитного иммунного ответа слизистых оболочек, гуморального и/или Т-клеточного защитного иммунного ответа у субъекта-человека против коронавируса, предусматривающий интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы фармацевтического состава (иммуногенной композиции) против SARS-CoV-2 или фармацевтической дозы с ним, причем введение индуцирует выработку сывороточных антител против коронавируса, антител в слизистых оболочках против коронавируса и индуцирует Т-клетки против коронавируса. В соответствии с вариантами осуществления субъект-человек является серологически защищенным по меньшей мере около 1 месяц, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 10 месяцев, 12 месяцев или по меньшей мере около 13 месяцев. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере около 9 месяцев.

[00226] В соответствии с альтернативными вариантами осуществления представлен способ индукции иммунного ответа против коронавируса, причем способ предусматривает введение по меньшей мере примирующей и бустерной дозы данной иммуногенной композиции/состава/дозы. В соответствии с определенными вариантами осуществления бустерную дозу вводят около через 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21 неделю, 22 недели, 23 недели, 24 недели, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 29 недель, 30 недель, 31 неделю, 32 недели, 33 недели, 34 недели, 35 недель, 36 недель, 37 недель, 38 недель, 39 недель, 40 недель, 41 неделю, 42 недели, 43 недели, 44 недели, 45 недель, 46 недель, 47 недель, 48 недель, 49 недель, 50 недель, 51 неделю или 52 недели после введения примирующей дозы.

[00227] В соответствии с вариантами осуществления примирующая и бустерная дозы являются гомологичными, что значит, что они представляют собой один и тот же состав. В соответствии с определенными вариантами осуществления представленные способы и композиции включают введение гетерологичных примирующей дозы и бустерной дозы иммуногенной композиции или вакцины, что приводит к индукции иммунного ответа (например, Т-клеточного, гуморального иммунного ответа и/или иммунного ответа слизистых оболочек), причем «гетерологичный» означает, что примирующая доза отличается от бустерной дозы при условии, что обе дозы содержат по меньшей мере один или более из эпитопов антигена SARS-Cov-2. В соответствии с определенными вариантами осуществления это означает примирующую дозу и бустерную дозу, в которых антиген/иммуногены/пептиды презентируются иммунной системе с помощью отличающихся носителей и/или векторов для доставки. В контексте данного документа «гетерологичная схема дозирования» означает примирующую дозу и бустерную дозу, в которых антиген/иммуногены/пептиды презентируются иммунной системе с помощью отличающихся носителей и/или векторов для доставки. Например, согласно настоящему изобретению первая композиция (либо в виде примирующей дозы, либо в виде бустерной дозы) содержит доставляемый в вирусном векторе антиген или иммуноген, и вторая композиция (либо в виде примирующей дозы, либо в виде бустерной дозы) содержит связанные с фторуглеродами пептиды, причем пептид содержит один или более Т-клеточных эпитопов наряду с доставляемым в вирусном векторе антигеном или иммуногеном. Иначе говоря, в соответствии с определенными вариантами осуществления данная комбинация иммуногенных композиций или вакцин представляет собой две отличающиеся индуцирующие образование Т-клеток иммуногенные композиции или композиции вакцин, причем каждая композиция индуцирует образование антигенспецифичных CD8+ Т-клеток против одного и того же антигена. В соответствии с альтернативными вариантами осуществления первая композиция (либо в виде примирующей дозы, либо в виде бустерной дозы) содержит доставляемый в вирусном векторе антиген или иммуноген, и вторая композиция (либо в виде примирующей дозы, либо в виде бустерной дозы) содержит иммуногенную композицию или композицию вакцины на основе РНК, такую как композиция, содержащая модифицированную мРНК, немодифицированную мРНК или самоамплифицирующуюся мРНК, составленную в липосомах или липидных наночастицах, композицию ДНК, вводимую с помощью электропорации или с применением состава на липидной основе, живую аттенуированную иммуногенную композицию или композицию вакцины, композицию на основе белка, составленную с адъювантом или без адъюванта или с

системой доставки, убитую иммуногенную композицию или композицию вакцины, иммуногенную композицию или композицию вакцины, доставляемую в векторе на основе другого аденовируса, такого как HAdV-1-57, аденовируса обезьян, или в векторе на основе вируса, отличного от аденовируса, такого как, без ограничения, аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус или поксвирус. Первую композицию можно вводить вначале для локальной или системной стимуляции иммунного ответа и вторую иммуногенную композицию или вакцину, такую как аденовирусная, можно вводить в слизистые оболочки в качестве бустерной дозы, «привлекая» примированные иммунные клетки локально и повторно стимулируя их антигенспецифическим образом.

[00228] В соответствии с вариантами осуществления примирующую и бустерную дозу вводят с интервалом по меньшей мере 7 суток, с интервалом по меньшей мере 14 суток или больше. В соответствии с вариантами осуществления примирующую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом около 7 суток, с интервалом около 14 суток, с интервалом около 20 суток, с интервалом около 25 суток, с интервалом около 30 суток, с интервалом около 35 суток, с интервалом около 40 суток, с интервалом около 45 суток, с интервалом около 50 суток, с интервалом около 55 суток, с интервалом около 60 суток или с интервалом около 65 суток. Преимущественно, дозы вводят с интервалом около 40 суток, с интервалом около 41 сутки, с интервалом около 42 суток, с интервалом около 43 суток, с интервалом около 44 суток, с интервалом около 45 суток, с интервалом около 46 суток, с интервалом около 47 суток, с интервалом около 48 суток, с интервалом около 49 суток или с интервалом около 50 суток. В соответствии с определенными вариантами осуществления примирующую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом около 1 неделя, с интервалом около 2 недели, с интервалом около 3 недели, с интервалом около 4 недели, с интервалом около 5 недель, с интервалом около 6 недель, с интервалом около 7 недель, с интервалом около 8 недель, с интервалом около 9 недель, с интервалом около 10 недель, с интервалом около 11 недель или с интервалом около 12 недель. В соответствии с определенными другими вариантами осуществления примирующую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом около 1 месяц, с интервалом около 2 месяца, с интервалом около 3 месяца, с интервалом около 4 месяца, с интервалом около 5 месяцев, с интервалом около 6 месяцев, с интервалом около 7 месяцев, с интервалом около 8 месяцев, с интервалом около 9 месяцев, с интервалом около 10 месяцев, с интервалом около 11 месяцев или с интервалом около 12 месяцев.

[00229] В соответствии с вариантами осуществления первую или вторую иммуногенную композицию или композицию вакцины вводят в виде примирующей и бустерной дозы,

вводимых с интервалом по меньшей мере 7 суток, с интервалом по меньшей мере 14 суток или больше. В соответствии с вариантами осуществления примирующую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом около 7 суток, с интервалом около 14 суток, с интервалом около 20 суток, с интервалом около 25 суток, с интервалом около 30 суток, с интервалом около 35 суток, с интервалом около 40 суток, с интервалом около 45 суток, с интервалом около 50 суток, с интервалом около 55 суток, с интервалом около 60 суток или с интервалом около 65 суток. Преимущественно, дозы вводят с интервалом около 40 суток, с интервалом около 41 сутки, с интервалом около 42 суток, с интервалом около 43 суток, с интервалом около 44 суток, с интервалом около 45 суток, с интервалом около 46 суток, с интервалом около 47 суток, с интервалом около 48 суток, с интервалом около 49 суток или с интервалом около 50 суток. В соответствии с определенными вариантами осуществления примирующую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом около 1 неделя, с интервалом около 2 недели, с интервалом около 3 недели, с интервалом около 4 недели, с интервалом около 5 недель, с интервалом около 6 недель, с интервалом около 7 недель, с интервалом около 8 недель, с интервалом около 9 недель, с интервалом около 10 недель, с интервалом около 11 недель или с интервалом около 12 недель. В соответствии с определенными другими вариантами осуществления примирующую дозу и бустерную дозу вводят с интервалом около 1 месяц, с интервалом около 2 месяца, с интервалом около 3 месяца, с интервалом около 4 месяца, с интервалом около 5 месяцев, с интервалом около 6 месяцев, с интервалом около 7 месяцев, с интервалом около 8 месяцев, с интервалом около 9 месяцев, с интервалом около 10 месяцев, с интервалом около 11 месяцев или с интервалом около 12 месяцев.

[00230] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления векторы на основе rdAd против SARS-CoV-2 (например, иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 (которая может включать в себя более чем один тип вектора на основе rdAd против SARS-CoV-2)) можно вводить с одним или более противоцитокиновыми реактивами. Как показано в примере 2, введение AdE мышам показало снижение экспрессии цитокинов, которые, как известно, вовлечены в развитие и симптомы инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами, такими как вирус гриппа. Например, AdE может вызывать повышение экспрессии моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1 (CCL2)), интерферона гамма (IFN-γ) и RANTES (CCL5) при введении неинфицированным млекопитающим, которое может сопровождаться снижением экспрессии IL-12. Спустя трое суток после воздействия вируса гриппа оказалось, что животные, которым вводили AdE, демонстрировали пониженную экспрессию IL-1α, IL-6, IL-

12, MCP-1 со значительным снижением IL-1α и IL-12. Спустя шесть (6) суток после воздействия вируса гриппа животные демонстрировали пониженную экспрессию IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, MCP-1 и GM-CSF и повышенную экспрессию воспалительного белка макрофагов 1 альфа (MIP-1α (CCL3)) и RANTES (CCL5). Эти результаты соответствуют развитию «цитокинового шторма» во время инфекции SARS-CoV-2. Следовательно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления для предупреждения и/или лечения инфекции SARS-CoV-2 иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 можно вводить млекопитающему, такому как человек, с одним или более противоцитокиновыми реактивами (т.е. вводить совместно). Такое совместное введение можно осуществлять в виде одной смеси (например, один или более противоцитокиновых реактивов можно включать в иммуногенную композицию против SARS-CoV-2) или в виде отдельных композиций, которые вводят, по существу, одновременно и/или в одну и ту же или близкую анатомическую область или в разные анатомические области посредством соответствующего пути (например, интраназальное введение иммуногенной композиции против SARS-CoV-2 и интрадермальное или внутривенное введение одного или более противоцитокиновых реактивов) и в эффективном количестве, которое может варьировать для каждого типа противоцитокинового реактива (и которое является известным в уровне техники). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 можно вводить в виде однократной дозы, как и один или более противоцитокиновых реактивов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов можно вводить несколько раз (например, в любой момент из около 7, 14, 21 суток или в любой момент из около одного, двух или трех месяцев) после введения композиции против SARS-CoV-2, в том числе в соответствии с некоторыми вариантами осуществления после первоначального введения композиции против SARS-CoV-2. Таким образом, иллюстративные противоцитокиновые реактивы для введения млекопитающему для предупреждения и/или лечения SARS-CoV-2 могут включать в себя, без ограничения, один или более реактивов против IL-1α, один или более реактивов против IL5, один или более реактивов против IL-6, один или более реактивов против IL-12, один или более реактивов против IL-17, один или более реактивов против MCP-1, один или более реактивов против TNF-α, один или более реактивов против GM-CSF и/или один или более реактивов против RANTES. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов не будут включать в себя один или более реактивов против MIPα и/или один или более реактивов

против RANTES. Иллюстративные противоцитокиновые реактивы, которые можно применять, как описано в данном документе, могут включать в себя, например, любые из представленных в **таблице 10**.

Таблица 10

Цитокин	Иллюстративные противоцитокиновые реактивы
IL-1α	анакинра (Kineret®), канакинумаб (Ilaris®), рилонацепт (Arcalyst®)
IL-5	меполизумаб (GlaxoSmithKline); бенрализумаб (фазенра)
IL-6	тоцилизумаб (актемра), сарилумаб (кевзара), силтуксимаб (сильвант)
IL-12	бриакинумаб (ABT-874, Abbott); устекинумаб
IL-17	бродалумаб (Siliq; Amgen), иксекизумаб (Taltz®, Eli Lilly), секукинумаб (козэнтикс; Novartis)
TNF-α	инфликсибмаб (ремикейд), адалимумаб (хумира), цертолизумаб пегол (симзия), голимумаб (симпони), этанерцепт (энбрел), талидомид (иммуноприн), леналидомид (ревлимид), помалидомид (помалист, имновид), ксантиновое производное (например, пентоксифиллин), бупропион
GM-CSF	отилимаб (MOR103, GSK3196165)

[00231] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одно или более дополнительных средств против SARS-CoV-2 также можно вводить субъекту(субъектам) до, по существу, одновременно или после введения иммуногенной композиции против SARS-CoV-2, такие как, например, хлорохин (например, его фармацевтическая соль и/или производное; например, гидроксихлорохин по 400 мг в сутки в течение 5 суток или по 200 мг три раза в сутки в течение 10 суток), и/или азитромицин (например, 500 мг в первые сутки с последующим введением четырех суточных доз 250 мг), и/или ремдесивир (например, первоначальная доза 200 мг с последующим введением суточных доз 100 мг), и/или одно или более противовоспалительных средств (например, преднизон, дексаметазон), и/или любой другой подходящий реактив. Другие режимы введения/дозирования противоцитокиновых реактивов, их комбинаций и комбинации с другими средствами против SARS-CoV-2, которые

доступны квалифицированным специалистам в данной области техники, могут быть подходящими для применения, которое раскрыто в данном документе, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00232] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект (например, человек) может быть подвергнут тесту в отношении коронавирусной инфекции с помощью подходящей методики (например, полимеразная цепная реакция (ПЦР), мазок из носа для выявления вирусных частиц). Иммуногенную композицию, содержащую один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2 (например, в виде вирусных частиц; иммуногенная композиция против SARS-CoV-2), можно затем вводить индивидам, которые по результатам теста являются положительными в отношении коронавирусной инфекции. Предпочтительно, такое введение можно выполнять в течение периода от семи до десяти суток после первоначального воздействия коронавируса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенную композицию против SARS-CoV-2, содержащую один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2 (например, в виде вирусных частиц), можно вводить индивидам с высоким риском инфекции и/или симптомов (например, респираторных симптомов, смерти), как например, индивидам с нарушенной иммунологической реактивностью и/или страдающим от другого болезненного состояния (например, почечной недостаточности), и/или лицам в ситуациях с высоким риском (например, лицам, находящимся в поездке в условиях пандемии, в замкнутых пространствах, таких как круизные корабли) вне зависимости от того, являлись ли такие индивиды положительными в отношении коронавирусной инфекции по результатам теста.

[00233] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции, раскрытые в данном документе, можно вводить хозяину, имеющему ноздри, причем такие ноздри смещают вверх (т.е. в положении лежа на спине), для обеспечения сильного иммунного ответа с помощью интраназального введения. В данном документе также предусмотрены другие стратегии введения и дозирования, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

[00234] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к иммуногенной композиции, содержащей вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), причем у вектора на основе rdAd: a) отсутствует кодирующая последовательность, кодирующая экзогенный антиген, отличный от аденовирусного, (например, AdE); b) вектор содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующая последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2,

необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2; c) содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2 (например, AdD); d) комбинация векторов из a) и b), причем векторы вводят вместе или отдельно; e) комбинация векторов на основе rdAd из b) и c), причем векторы вводят вместе или отдельно; f) комбинация любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c) причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно; и/или g) комбинация двух разных типов векторов на основе rdAd из b), при этом каждый тип вектора на основе rdAd содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другими типами векторов на основе rdAd в комбинации, причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно; при этом указанная иммуногенная композиция способна индуцировать иммунный ответ с выработкой нейтрализующих антител и/или клеточный иммунный ответ против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, которому вводят указанную иммуногенную композицию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенная композиция может содержать комбинацию любых двух из векторов на основе rdAd из a)-c), как например, в двухкомпонентной композиции, содержащей по меньшей мере одну композицию, содержащую векторы на основе rdAd из a)-c), и по меньшей мере вторую композицию, содержащую отличающийся вектор на основе rdAd из a)-c). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, выбранную из: кодирующей последовательности для спайк (S) белка или домена S1 спайк-белка; последовательности, представленной в **SEQ ID NO: 3**, или последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% гомологией с **SEQ ID NO: 3**; содержит по меньшей мере аминокислоты 331-527 в **SEQ ID NO: 3**; кодирует последовательность RBD спайк-белка, содержащую один или более из следующих остатков (нумерация, соответствующая **SEQ ID NO: 3**): L455, F486, Q493, S494 и/или N501, предпочтительно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, Q493 и N501, предпочтительно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, остаток, выбранный из Y455, F455 или S455, предпочтительно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, остаток, выбранный из L486 или P486, предпочтительно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, остаток, выбранный из N493, R493 или K493, предпочтительно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, остаток, выбранный из D494 или G494,

предпочтительно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, остаток, выбранный из T501 или S501; содержит аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 12**, **SEQ ID NO: 13**, **SEQ ID NO: 14**, предпочтительно, **SEQ ID NO: 15**, **SEQ ID NO: 16** или **SEQ ID NO: 17**, **SEQ ID NO: 446**; любую из **SEQ ID NO: 412-417**, и **SEQ ID NO: 438-445,** и **SEQ ID NO: 475-476** или **460** или любой их иммуногенный фрагмент; содержит аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 16** или **SEQ ID NO: 17**, причем аминокислота 455 является выбранной из Y, F, L или S; аминокислота 486 является выбранной из L, F или P; аминокислота 493 является выбранной из N, Q, R или K; аминокислота 494 является выбранной из D, G или S; и аминокислота 501 является выбранной из T, S или N; кодирующую последовательность, которая кодирует один или более из структурных белков оболочки (E), мембраны (M) или нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность для модифицированного варианта **SEQ ID NO: 411**, содержащую: одну или более замен любой одной или более из аминокислот 333-388, 390-395, 397-399, 401-411, 413-415, 417-419, 424, 426-435, 437, 439-442, 444-446, 449, 450, 452, 453, 455-463, 465, 467-473, 475-479, 481-486, 490, 491, 493-495, 499-510 и/или 513-526; одну или более замен одной или более из аминокислот 367, 403, 417, 439, 446, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 490, 493, 494, 495, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505 и/или одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из замены аминокислоты 367 (V) на F, I, L S или A, аминокислоты 403 (R) на K или S, 417 (K) на N или T; аминокислоты 439 (N) на K, аминокислоты 446 (G) на V, S или A; аминокислоты 449 (Y) на N; аминокислоты 452 (L) на L, M или Q, аминокислоты 453 (Y) на F; аминокислоты 455 (L) на F; аминокислоты 456 (F) на L; аминокислоты 470 (T) на I, A или N, аминокислоты 473 (Y) на V; аминокислоты 475 (A) на V; аминокислоты 476 (G) на S или A; аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I; аминокислоты 476 (G) на S или A, аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I, аминокислоты 478 (T) на I, K, R или A, аминокислоты 484 (E) на Q, K, D, A или R; аминокислоты 486 (F) на L или S; аминокислоты 490 (F) на L или S, аминокислоты 493 (Q) на L или R; аминокислоты 494 (S) на P или L, аминокислоты 495 (Y) на N или F; аминокислоты 496 (G) на V или S, аминокислоты 499 (P) на H, S или R, аминокислоты 500 (T) на I; аминокислоты 501 (N) на Y, T или S; аминокислоты 502 (G) на R, D или C; аминокислоты 503 (V) на L, I или F; и аминокислоты 504 (G) на V, D или S, аминокислоты 505 (Y) на H, E, W или C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере один антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2, получен из вируса гриппа. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления иммуногенная композиция дополнительно способна индуцировать комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ против SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодирующая последовательность кодирует по меньшей мере один или более В-клеточных эпитопов, один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов и/или один или более CD4+ Т-клеточных эпитопов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодирующая последовательность является оптимизированной по кодонам для субъекта-млекопитающего. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенная композиция индуцирует выработку нейтрализующих антител, обеспечивающих серологическую защиту от инфекции SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, необязательно, при этом субъект-млекопитающее представляет собой человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd) представляет собой аденовирус человека, необязательно, Ad5 или Ad26. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления rdAd представляет собой аденовирус приматов, аденовирус кур, или свиной аденовирус, или аденовирус свиней. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления rdAd представляет собой аденовирус с делецией E1, E3 и/или E4 или аденовирус с разрушенным E1, E3 и/или E4.

[00235] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к фармацевтическим составам, содержащим эффективное количество такой иммуногенной композиции (т.е. композиции, содержащей один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2) и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, необязательно, при этом разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтический состав выполнен с возможностью неинвазивного введения и/или интраназального введения субъекту-млекопитающему. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение фармацевтического состава субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунный ответ у субъекта-млекопитающего, необязательно, комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтически приемлемый носитель имеет форму распыляемого раствора или аэрозоля. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) (вектора(векторов) на основе rdAd против SARS-CoV-2). В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления фармацевтический состав выполнен в виде однократной интраназальной дозы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фармацевтический состав выполнен в виде двух или более интраназальных доз. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к фармацевтическому составу против коронавируса, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку и содержащему: эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) или инфекционных единиц (ifu) (например, по меньшей мере 1×10^7, или по меньшей мере 1×10^8, или по меньшей мере 1×10^9, или по меньшей мере 1×10^{10}, или по меньшей мере 1×10^{11} vp или ifu) иммуногенной композиции, содержащей по меньшей мере один вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2 или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент, причем эффективное количество индуцирует комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ; и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состав способен обеспечивать серологическую защиту субъекта-человека от SARS-CoV-2 в течение по меньшей мере 6 месяцев или, предпочтительно, 9 месяцев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к фармацевтической дозе для интраназального введения, содержащей фармацевтически приемлемый носитель в форме распыляемого раствора или аэрозоля, смешанный с иммуногенной композицией, раскрытой в данном документе, причем доза выполнена с возможностью интраназального введения для неинвазивной индукции защитного иммунного ответа против SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенная композиция содержит эффективное количество, составляющее по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) вектора(векторов) на основе rdAd против SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество индуцирует комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ против коронавируса, предпочтительно, SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления состав в фармацевтической дозе выполнен в виде двух или более доз для индукции защитного иммунного ответа против SARS-CoV-2.

[00236] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам индукции иммунного ответа против коронавируса, предпочтительно, SARS-CoV-2, причем способ предусматривает введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции (или состава или лекарственной формы), раскрытой в данном документе, предпочтительно, при этом иммунный ответ является защитным против SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает интраназальное введение субъекту-млекопитающему эффективного количества иммуногенной композиции, раскрытой в данном документе, причем иммунный ответ обеспечивает защиту от вторичного заражения SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам индукции комплексного защитного иммунного ответа слизистых оболочек, гуморального и/или Т-клеточного защитного иммунного ответа против коронавируса у субъекта-человека, предусматривающим: интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы коронавируса, предпочтительно, SARS-CoV-2, фармацевтического состава или дозы, раскрытых в данном документе, причем введение индуцирует выработку сывороточных антител, антител в слизистых оболочках и индуцирует Т-клетки против SARS-CoV-2, необязательно, в результате чего субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере около 6 месяцев или, предпочтительно, в течение по меньшей мере около 9 месяцев. Предпочтительно, серологическая защита длится в течение по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев.

[00237] В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления вектор на основе rdAd против SARS-CoV-2 содержит **SEQ ID NO: 15** (или содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую **SEQ ID NO: 15**), предпочтительно, в экспрессионной кассете. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления вектор на основе rdAd против SARS-CoV-2 содержит экспрессионную кассету, содержащую рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2, сигнальную последовательность pTA (выделена курсивом) и длинные фланкирующие последовательности (выделены подчеркиванием), как проиллюстрировано на **фиг. 19**. Также предусмотрены варианты **SEQ ID NO: 15**. Например, любую из лидерных и фланкирующих последовательностей, представленных на **фиг. 19**, можно удалить (т.е. не включать) или заменять на другие лидерные и/или фланкирующие последовательности. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления вектор на основе rdAd против SARS-CoV-2, содержащий **SEQ ID NO: 15** (или содержащий нуклеотидную последовательность,

кодирующую **SEQ ID NO: 15**) или ее вариант, можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество, составляющее по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp); предпочтительно, можно вводить интраназально (предпочтительно, при этом млекопитающее (предпочтительно, человек) находится в положении лежа на спине во время введения); и, предпочтительно, в виде однократного введения (дозы), но в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусмотрены по меньшей мере два введения (дозы), отделенные друг от друга периодом времени (например, 7-21 суток). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления введение индуцирует выработку нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 и/или клеточный ответ (например, Т-клетки) против SARS-CoV-2, что обеспечивает защиту (например, в соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления серологическую защиту) в течение по меньшей мере около 6, 9, 10, 11, 12, 13 или месяцев. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления введение вектора на основе rdAd против SARS-CoV-2, содержащего **SEQ ID NO: 15** (или содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую **SEQ ID NO: 15**) приводит в результате к защите от инфицирования SARS-CoV-2, ускоряет выздоровление от инфекции SARS-CoV-2, замедляет и/или обращает течение заболевания у пациента, инфицированного SARS-CoV-2, и/или снижает или исключает потребность в госпитализации и/или уходе в отделении ICU для пациента, инфицированного SARS-CoV-2.

[00238] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам, таким как представленные выше, дополнительно предусматривающим введение одного или более противоцитокиновых реактивов (см., например, **таблицу 4**) человеку с целью предупреждения и/или лечения SARS-CoV-2, необязательно, при этом один или более противоцитокиновых реактивов включают в себя один или более реактивов против IL-1α, один или более реактивов против IL5, один или более реактивов против IL-6, один или более реактивов против IL-12, один или более реактивов против IL-17, один или более реактивов против MCP-1, один или более реактивов против TNF-α, один или более реактивов против GM-CSF и/или один или более реактивов против RANTES. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов не включают в себя один или более реактивов против MIPα и/или один или более реактивов

против RANTES. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов вводят совместно, по существу, с эффективным количеством иммуногенной композиции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов не вводят, по существу, с эффективным количеством иммуногенной композиции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенную композицию вводят млекопитающему однократно и один или более противоцитокиновых реактивов вводят несколько раз. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенную композицию вводят млекопитающему совместно с одним или более противоцитокиновыми реактивами, и один или более противоцитокиновых реактивов впоследствии вводят млекопитающему. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения и/или подавления (например, ослабления) симптомов респираторной вирусной инфекции у млекопитающего, причем указанная респираторная вирусная инфекция вызывает повышенную экспрессию интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1-альфа (IL-1α) и/или интерлейкина-12 (IL-12) в легком указанного млекопитающего, что может вызывать неблагоприятные эффекты у хозяина. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие способы предусматривают интраназальное введение субъекту эффективного количества вектора на основе аденовируса с делецией E1 и E3, в результате чего снижается экспрессия IL-6, IL-1a и/или IL-12 в легком, таким образом облегчая указанные симптомы в течение периода до около 28 суток после введения вектора. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления такие способы вызывают снижение экспрессии моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1), фактора некроза опухолей альфа (TNF-α), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), RANTES и/или IL-17 в легком после введения вектора. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессия воспалительного белка макрофагов 1 альфа (MIP-1α) и/или RANTES не снижается после введения вектора. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам индукции противовирусного иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего с респираторной вирусной инфекцией, или имеющего риск респираторной вирусной инфекции, причем способ предусматривает: интраназальное введение субъекту эффективного количества вектора на основе аденовируса с делецией E1 и E3, причем противовирусный иммунный ответ создает повышенную экспрессию моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1) и/или интерферона альфа (IFN-γ) после стадии введения. В соответствии с некоторыми вариантами

осуществления таких способов субъект-млекопитающее (например, человек) является инфицированным SARS-CoV-2 (например, находится в больнице, получая лечение от инфекции SARS-CoV-2) перед введением ему фармацевтического состава. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одно или более дополнительных средств против SARS-CoV-2 можно вводить субъекту(субъектам) до, по существу, одновременно или после введения иммуногенной композиции против SARS-CoV-2, такие как, например, хлорохин (например, его фармацевтическая соль и/или производное; например, гидроксихлорохин по 400 мг в сутки в течение 5 суток или по 200 мг три раза в сутки в течение 10 суток), и/или азитромицин (например, 500 мг в первые сутки с последующим введением четырех суточных доз 250 мг), и/или ремдесивир (например, первоначальная доза 200 мг с последующим введением суточных доз 100 мг), и/или любой другой подходящий реактив.

[00239] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к иммуногенным композициям против SARS-CoV-2, содержащим один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2, содержащих одну или более кодирующих последовательностей антигена SARS-CoV-2, которые кодируют один или более пептидов, содержащих один или более Т-клеточных эпитопов из таблицы 3A, одну или более групп Т-клеточных эпитопов из таблицы 3B или **SEQ ID NO: 27-282**; и/или один или более В-клеточных эпитопов с **SEQ ID NO: 283-327**; и/или одну или более из **SEQ ID NO: 328-408**, необязательно, при этом пептиды являются последовательно соединенными и, необязательно, разделенными линкерной аминокислотной последовательностью из двух-десяти аминокислот.

[00240] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к иммуногенным композициям против SARS-CoV-2, содержащим один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один молекулярный адъювант, выбранный из группы, состоящей из: одного или более полипептидов или пептидов, которые функционируют в качестве костимулирующего компонента; одного или более цитокинов; одного или более хемокинов; одного или более иммуноингибирующих белков; одного или более агонистов TLR, необязательно, при этом один или более агонистов TLR являются выбранными из группы, состоящей из **SEQ ID NO: 463-474**; и их комбинации.

[00241] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к иммуногенным композициям против SARS-CoV-2, содержащим один или более векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2, которые содержат по меньшей мере одну последовательность полинуклеотида, кодирующую по меньшей мере один белок,

блокирующий SARS-CoV-2; причем по меньшей мере одна последовательность полинуклеотида кодирует по меньшей мере один пептид или полипептид: который индуцирует иммунный ответ, препятствующий связыванию S-белка SARS-CoV-2 со своим клеточным рецептором, напрямую препятствует связыванию S-белка SARS-CoV-2 с его клеточным рецептором, представляет собой связывающее RBD средство, представляет собой связывающее ACE2 средство и/или представляет собой как связывающее RBD средство, так и связывающее ACE2 средство.

[00242] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к одному или более полинуклеотидам, кодирующим вектор на основе rdAd против SARS-CoV-2, раскрытый в данном документе. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к одному или более векторам на основе rdAd против SARS-CoV-2, вырабатывающимся при экспрессии такого(таких) полинуклеотида(полинуклеотидов) в клетке-хозяине. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к одной или более композициям, содержащим такие полинуклеотиды и/или векторы на основе rdAd против SARS-CoV-2, которые в соответствии с некоторыми вариантами осуществления представляют собой фармацевтическую композицию или фармацевтическую лекарственную форму.

[00243] **<u>Предпочтительные аспекты настоящего раскрытия</u>**

[00244] Предпочтительные аспекты настоящего раскрытия включают в себя следующие:

[00245] Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), причем вектор на основе rdAd является выбранным из:

a) вектора на основе rdAd, у которого отсутствует кодирующая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, отличный от аденовирусного;

b) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2;

c) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2;

d) комбинации векторов из a) и b), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

e) комбинации векторов из b) и c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

f) комбинации любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

g) комбинации двух отличающихся типов векторов на основе rdAd из b), причем каждый тип вектора на основе rdAd содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другими типами векторов на основе rdAd в комбинации, при этом векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

причем указанная иммуногенная композиция способна индуцировать ответ с выработкой нейтрализующих антител и/или клеточный иммунный ответ против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, которому вводится указанная иммуногенная композиция.

[00246] Иммуногенная композиция согласно предшествующему аспекту, причем экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2 для спайк (S) белка или домена S1 спайк-белка.

[00247] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, выбранную из группы, состоящей из **SEQ ID NO: 3**; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 3**; последовательности, представленной в **SEQ ID NO: 12**; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 12**; **SEQ ID NO: 15**; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере

86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 15**; **SEQ ID NO: 446**; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) гомологией и/или идентичностью с **SEQ ID NO: 446**; любой из **SEQ ID NO: 412-417**; любых **SEQ ID NO: 438-445 и SEQ ID NO: 475-476** и **460**; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) гомологией и/или идентичностью с любой из **SEQ ID NO: 412-417**, и **SEQ ID NO: 438-445, и SEQ ID NO: 475-476** и **460**.

[00248] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует последовательность спайк-белка, содержащую последовательность, в которой расщепляемый сайт S1/S2 и/или S2' являются устойчивыми к протеомной деградации, и/или последовательность, в которой пептид слияния был удален или модифицирован для предотвращения его фузогенной активности, и/или последовательность, в которой внутриклеточный домен был модифицирован или частично с изменением мотива для удержания в эндоплазматическом ретикулуме. Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, выбранную из группы, состоящей, и/или последовательность, включающую в себя по меньшей мере одну из NSPQQAQSVAS (**SEQ ID NO: 451**), NSPSGAGSVAS (**SEQ ID NO: 456**) или NSP-----VAS (**SEQ ID NO: 461**) в сайте расщепления S1/S2, KRSFIADA (**SEQ ID NO: 453**), PSKPSKQSF (**SEQ ID NO: 457**), PSKPSKNSF (**SEQ ID NO: 458**), PSKPSNASF

(**SEQ ID NO: 459**) в сайте расщепления S2' или SRLDPPEAEV (**SEQ ID NO: 455**), и/или любую модификацию последовательности, представленную в таблице 1 и/или таблице 2.

[00249] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 представляет собой последовательность, представленную в **SEQ ID NO: 18**, **SEQ ID NO: 19**, **SEQ ID NO: 20,** или ее иммуногенный фрагмент.

[00250] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует по меньшей мере аминокислоты 331-527 в **SEQ ID NO: 3**.

[00251] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) спайк-белка и содержит одну или более из следующих замен: K417N, K417T, R403K, N439K, G446V, G446S, L452R, G476A, S477N, T478K, E484D, T478I, E484K, F490S, Q493R, S494P, P499H и/или N501Y.

[00252] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) спайк-белка или ее иммуногенный фрагмент и/или содержит аминокислотную последовательность с **SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 412-417, SEQ ID NO: 438-445, SEQ ID NO: 446, SEQ ID NO: 460, SEQ ID NO: 475 и SEQ ID NO: 476** или их иммуногенный фрагмент.

[00253] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем экспрессионная кассета в векторе на основе репликационно-дефектного аденовируса дополнительно содержит кодирующую последовательность, которая кодирует один или более из структурных белков оболочки (E), мембраны (M) или нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2.

[00254] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, содержащая дополнительный вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, содержащий кодирующую последовательность, которая кодирует один или более из структурных белков оболочки (E), мембраны (M) или нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2.

[00255] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем экспрессионная кассета в векторе на основе репликационно-дефектного аденовируса содержит

кодирующую последовательность для модифицированного варианта **SEQ ID NO: 411**, содержащую:

одну или более замен любой одной или более из аминокислот 333-388, 390-395, 397-399, 401-411, 413-415, 417-419, 424, 426-435, 437, 439-442, 444-446, 449, 450, 452, 453, 455-463, 465, 467-473, 475-479, 481-486, 490, 491, 493-495, 499-510 и/или 513-526; одну или более замен любой одной или более из аминокислот 367, 403, 417, 439, 446, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 490, 493, 494, 495, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505; одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из аминокислоты 367 (V), на F, I, L S или A, аминокислоты 403 (R) на K или S, 417 (K) на N или T; аминокислоты 439 (N) на K, аминокислоты 446 (G) на V, S или A; аминокислоты 449 (Y) на N; аминокислоты 452 (L) на L, M или Q, аминокислоты 453 (Y) на F; аминокислоты 455 (L) на F; аминокислоты 456 (F) на L; аминокислоты 470 (T) на I, A или N, аминокислоты 473 (Y) на V; аминокислоты 475 (A) на V; аминокислоты 476 (G) на S или A; аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I; аминокислоты 476 (G) на S или A, аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I, аминокислоты 478 (T) на I, K, R или A, аминокислоты 484 (E) на Q, K, D, A или R; аминокислоты 486 (F) на L или S; аминокислоты 490 (F) на L или S, аминокислоты 493 (Q) на L или R; аминокислоты 494 (S) на P или L, аминокислоты 495 (Y) на N или F; аминокислоты 496 (G) на V или S, аминокислоты 499 (P) на H, S или R, аминокислоты 500 (T) на I; аминокислоты 501 (N) на Y, T или S; аминокислоты 502 (G) на R, D или C; аминокислоты 503 (V) на L, I или F и аминокислоты 504 (G) на V, D или S, аминокислоты 505 (Y) на H, E, W или C.

[00256] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем по меньшей мере один антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2, получен из вируса гриппа.

[00257] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, содержащая комбинацию любых двух из векторов на основе rdAd из a)-c).

[00258] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем указанная иммуногенная композиция представляет собой двухкомпонентную композицию, содержащую по меньшей мере одну композицию, которая содержит векторы на основе rdAd из a)-c), и по меньшей мере вторую композицию, содержащую отличающийся вектор на основе rdAd из a)-c).

[00259] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, дополнительно способная индуцировать комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ против SARS-CoV-2.

[00260] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность кодирует по меньшей мере один или более В-клеточных эпитопов, один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов и/или один или более CD4+ Т-клеточных эпитопов.

[00261] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность является оптимизированной по кодонам для субъекта-млекопитающего.

[00262] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем нейтрализующие антитела обеспечивают серологическую защиту от инфекции SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, необязательно, при этом субъект-млекопитающее представляет собой человека.

[00263] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой аденовирус человека, необязательно, Ad5 или Ad26.

[00264] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой бычий аденовирус, собачий аденовирус, аденовирус приматов, отличных от человека, аденовирус кур, или свиной аденовирус, или аденовирус свиней.

[00265] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой аденовирус с удаленным или разрушенным E1, E3 и/или E4.

[00266] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует один или более пептидов, содержащих один или более Т-клеточных эпитопов из таблицы 3A, одну или более групп Т-клеточных эпитопов из таблицы 3B или **SEQ ID NO: 27-282**; и/или один или более В-клеточных эпитопов с **SEQ ID NO. 25-68**; и/или одну или более из **SEQ ID NO. 328-369**; необязательно, при этом пептиды являются последовательно соединенными и, необязательно, разделенными линкерной аминокислотной последовательностью из двух-десяти аминокислот.

[00267] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем вектор на основе rdAd дополнительно содержит по меньшей мере один молекулярный адъювант, выбранный из группы, состоящей из: одного или более полипептидов или пептидов, которые функционируют в качестве костимулирующего компонента; одного или более цитокинов; одного или более хемокинов; одного или более иммуноингибирующих белков;

одного или более агонистов TLR, необязательно, при этом один или более агонистов TLR являются выбранными из группы, состоящей из **SEQ ID NO: 463-474**; и их комбинации.

[00268] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем вектор на основе rdAd содержит по меньшей мере одну последовательность полинуклеотида, кодирующую по меньшей мере один белок, блокирующий SARS-CoV-2; при этом по меньшей мере одна последовательность полинуклеотида кодирует по меньшей мере один пептид или полипептид, который индуцирует иммунный ответ, препятствующий связыванию S-белка SARS-CoV-2 с его клеточным рецептором, напрямую препятствует связыванию S-белка SARS-CoV-2 с его клеточным рецептором, представляет собой связывающее RBD средство, представляет собой связывающее ACE2 средство и/или представляет собой как связывающее RBD средство, так и связывающее ACE2 средство.

[00269] Полинуклеотид, кодирующий вектор на основе rdAd, в иммуногенной композиции согласно любому предшествующему аспекту, векторе на основе rdAd, продуцирующемся при экспрессии полинуклеотида в клетке-хозяине, и композиции, содержащей вектор на основе rdAd.

[00270] Фармацевтический состав, содержащий эффективное количество иммуногенной композиции согласно любому предшествующему аспекту и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, необязательно, при этом разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор.

[00271] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, выполненный с возможностью неинвазивного введения.

[00272] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, выполненный с возможностью интраназального введения субъекту-млекопитающему.

[00273] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, причем введение фармацевтического состава субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунный ответ у субъекта-млекопитающего, необязательно, комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ.

[00274] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, причем фармацевтически приемлемый носитель имеет форму распыляемого раствора или аэрозоля.

[00275] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество составляет по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp).

[00276] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, выполненный в виде однократной интраназальной дозы.

[00277] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, выполненный в виде двух или более интраназальных доз.

[00278] Фармацевтический состав, подходящий для введения однократной интраназальной дозы субъекту-человеку, содержащий:

эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) в иммуногенной композиции согласно любому предшествующему аспекту, содержащей по меньшей мере один вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2 или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент, причем эффективное количество индуцирует комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ; и

фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[00279] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, причем состав способен обеспечивать серологическую защиту субъекта-человека от SARS-CoV-2 в течение по меньшей мере 6 месяцев.

[00280] Фармацевтический состав согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность является оптимизированной по кодонам для субъекта-человека.

[00281] Фармацевтическая доза для интраназального введения, содержащая:

фармацевтически приемлемый носитель в форме распыляемого раствора или аэрозоля, смешанный с иммуногенной композицией согласно любому предшествующему аспекту, причем доза выполнена с возможностью интраназального введения для неинвазивной индукции защитного иммунного ответа против SARS-CoV-2.

[00282] Фармацевтическая доза согласно любому предшествующему аспекту, причем иммуногенная композиция содержит эффективное количество, составляющее по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp).

[00283] Фармацевтическая доза согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество индуцирует комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ.

[00284] Фармацевтическая доза согласно любому из предшествующих аспектов, выполненная в виде однократной дозы для индукции защитного иммунного ответа против коронавируса.

[00285] Фармацевтическая доза согласно любому из предшествующих аспектов, выполненная в виде двух или больше доз для индукции защитного иммунного ответа против SARS-CoV-2.

[00286] Способ индукции иммунного ответа против коронавируса, причем способ предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции согласно любому предшествующему аспекту субъекту-млекопитающему.

[00287] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем иммунный ответ является защитным против SARS-CoV-2.

[00288] Способ индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, причем способ предусматривает введение фармацевтического состава согласно любому предшествующему аспекту или фармацевтической дозы согласно любому предшествующему аспекту субъекту-млекопитающему.

[00289] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем иммунный ответ является защитным против SARS-CoV-2.

[00290] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем способ предусматривает интраназальное введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту-млекопитающему, при этом иммунный ответ обеспечивает защиту против вторичного заражения SARS-CoV-2.

[00291] Способ индукции комплексного защитного иммунного ответа слизистых оболочек, гуморального и/или Т-клеточного защитного иммунного ответа против коронавируса у субъекта-человека, предусматривающий:

интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы фармацевтического состава против коронавируса (SARS-CoV-2) согласно любому предшествующему аспекту или фармацевтической дозы согласно любому предшествующему аспекту, причем введение индуцирует выработку сывороточных антител, антител в слизистых оболочках и индуцирует Т-клетки против SARS-CoV-2, необязательно, в результате чего субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере около 6 месяцев или, более предпочтительно, около 9 месяцев.

[00292] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем серологическая защита длится в течение по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев.

[00293] Способ согласно любому предшествующему аспекту, дополнительно, предусматривающий введение одного или более противоцитокиновых реактивов человеку для предупреждения и/или лечения SARS-CoV-2, необязательно, при этом один или более противоцитокиновых реактивов включают в себя один или более реактивов против IL-1α, один или более реактивов против IL5, один или более реактивов против IL-6, один или более реактивов против IL-12, один или более реактивов против IL-17, один или более реактивов против MCP-1, один или более реактивов против TNF-α, один или более реактивов против GM-CSF и/или один или более реактивов против RANTES.

[00294] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем один или более противоцитокиновых реактивов не включают в себя один или более реактивов против MIPa и/или один или более реактивов против RANTES.

[00295] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем:

один или более противоцитокиновых реактивов вводят совместно, по существу, с эффективным количеством иммуногенной композиции;

один или более противоцитокиновых реактивов не вводят, по существу, с эффективным количеством иммуногенной композиции;

иммуногенную композицию вводят млекопитающему однократно и один или более противоцитокиновых реактивов вводят несколько раз; или

иммуногенную композицию вводят млекопитающему совместно с одним или более противоцитокиновыми реактивами, и один или более противоцитокиновых реактивов впоследствии вводят млекопитающему.

[00296] Способ лечения или подавления симптомов респираторной вирусной инфекции у млекопитающего, причем указанная респираторная вирусная инфекция вызывает повышенную экспрессию интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1-альфа (IL-1α) и/или интерлейкина-12 (IL-12) в легком указанного млекопитающего, при этом способ предусматривает: интраназальное введение субъекту эффективного количества вектора на основе аденовируса с делецией E1 и E3 или состава или композиции, содержащей его, согласно любому предшествующему аспекту, благодаря чему экспрессия IL-6, IL-1α и/или IL-12 в легком снижается, тем самым облегчая указанные симптомы в течение периода до около 28 суток после введения вектора.

[00297] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем экспрессия моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1), IFN-γ и/или RANTES повышается в легком после введения вектора.

[00298] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем экспрессия воспалительного белка макрофагов 1 альфа (MIP-1α) и/или RANTES не снижается после введения вектора.

[00299] Способ индукции противовирусного иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего с респираторной вирусной инфекцией или имеющего риск респираторной вирусной инфекции, причем способ предусматривает: интраназальное введение субъекту эффективного количества вектора на основе аденовируса с делецией E1 и E3 или состава или композиции, содержащей его, согласно любому предшествующему аспекту, при этом противовирусный иммунный ответ вызывает повышенную экспрессию моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1) и/или интерферона альфа (IFN-γ) после стадии введения.

[00300] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем одно или более дополнительных средств против SARS-CoV-2 вводят субъектам перед, по существу, одновременно или после введения вектора на основе аденовируса с делецией E1 и E3, необязательно, при этом указанные одно или более дополнительных средств являются выбранными из группы, состоящей из хлорохина, азитромицина, ремдесивира, противовоспалительного средства и их комбинации.

[00301] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем субъект-млекопитающее является инфицированным SARS-CoV-2 перед введением ему фармацевтического состава.

[00302] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем субъект-млекопитающее представляет собой человека.

[00303] Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), причем вектор на основе rdAd является выбранным из:

a) вектора на основе rdAd, у которого отсутствует кодирующая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, отличный от аденовирусного;

b) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2;

c) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, кодирующую по меньшей мере один экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2;

d) комбинации векторов из a) и b), причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

e) комбинации векторов из b) и c), причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

f) комбинации любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c), причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

g) комбинации двух отличающихся типов векторов на основе rdAd из b), причем каждый тип вектора на основе rdAd содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другими типами векторов на основе rdAd в комбинации, при этом векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

причем указанная иммуногенная композиция способна индуцировать ответ с выработкой нейтрализующих антител и/или клеточный иммунный ответ в отношении SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, которому вводят указанную иммуногенную композицию, для применения в лечении или предупреждении SARS-CoV-2.

[00304] Применение иммуногенной композиции, содержащей вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), причем вектор на основе rdAd является выбранным из:

a) вектора на основе rdAd, у которого отсутствует кодирующая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, отличный от аденовирусного;

b) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2;

c) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, кодирующую по меньшей мере один экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2;

d) комбинации векторов из a) и b), причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

e) комбинации векторов из b) и c), причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

f) комбинации любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c), причем векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

g) комбинации двух отличающихся типов векторов на основе rdAd из b), причем каждый тип вектора на основе rdAd содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другими типами векторов на основе rdAd в комбинации, при этом векторы на основе rdAd вводят вместе или отдельно;

причем указанная иммуногенная композиция способна индуцировать ответ с выработкой нейтрализующих антител и/или клеточный иммунный ответ в отношении SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, которому вводится указанная иммуногенная композиция,

характеризующееся тем, что иммуногенная композиция применяется в производстве лекарственного препарата для обеспечения лечения или предупреждения SARS-CoV-2.

[00305] Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 446, или вариант, характеризующийся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 446.

[00306] Иммуногенная композиция согласно предыдущему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует SEQ ID NO: 15.

[00307] Иммуногенная композиция согласно любому предыдущему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует SEQ ID NO: 13.

[00308] Иммуногенная композиция согласно любому предыдущему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует одну или более из SEQ ID NO: 412-417, SEQ ID NO: 438-445, SEQ ID NO: 475-476 и SEQ ID NO: 460.

[00309] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более точковых мутаций в SEQ ID NO: 3.

[00310] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций в положениях 333-388, 390-395, 397-399, 401-411, 413-415, 417-419, 424, 426-435, 437, 439-442, 444-446, 449, 450, 452, 453, 455-463, 465, 467-473, 475-479, 481-486, 490, 491, 493-495, 499-510 или 513-526, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

[00311] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций в положениях аминокислот 367, 403, 439, 417, 446, 447, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 487, 490, 493, 494, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

[00312] Иммуногенная композиция согласно предшествующему аспекту, причем одна или более мутаций являются выбранными из замены аминокислоты 417 (K) на N; замены аминокислоты 446 (G) на V, S или A; замены аминокислоты 449 (Y) на N; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замена аминокислоты 455 (L) на F; замены аминокислоты 456 (F) на L; замены аминокислоты 473 (Y) на V; замены аминокислоты 475 (A) на V; замены аминокислоты 476 (G) на S или A; замены аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I; замены аминокислоты 484 (E) на Q, K, D, A или R; замены аминокислоты 486 (F) на L или S; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замены аминокислоты 493 (Q) на L или R; замены аминокислоты 495 (Y) на N или F; замены аминокислоты 500 (T) на I; замены аминокислоты 501 (N) на Y, T или S; замены аминокислоты 502 (G) на R, D или C; замены аминокислоты 503 (V) на L, I или F или замены аминокислоты 505 (Y) на H, E, W или C, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

[00313] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций, выбранных из K417T, K417N, E484K, L452R и/или N501Y, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

[00314] Иммуногенная композиция согласно любому предыдущему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует одну или более из SEQ ID NO: 412-417.

[00315] Иммуногенная композиция согласно любому предыдущему аспекту, причем нуклеотидная последовательность кодирует одну или более из SEQ ID NO: 438-443 или 460.

[00316] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 446, дополнительно содержит лидерную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 418-437.

[00317] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем кодирующая последовательность является оптимизированной по кодонам для субъекта-млекопитающего.

[00318] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой бычий аденовирус, собачий аденовирус, аденовирус приматов, отличных от человека, аденовирус кур, свиной аденовирус, или аденовирус свиней, или аденовирус человека.

[00319] Иммуногенная композиция согласно предшествующему аспекту, причем аденовирус приматов, отличных от человека, представляет собой аденовирус шимпанзе или горилл.

[00320] Иммуногенная композиция согласно любому предшествующему аспекту, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой аденовирус человека.

[00321] Иммуногенная композиция согласно предшествующему аспекту, причем аденовирус человека представляет собой Ad5 или Ad26.

[00322] Фармацевтический состав, содержащий эффективное количество иммуногенной композиции согласно любым предшествующим аспектам, причем композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, необязательно, при этом разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор.

[00323] Фармацевтический состав согласно предшествующему аспекту, выполненный с возможностью неинвазивного или интраназального введения, необязательно, причем фармацевтически приемлемый носитель имеет форму распыляемого раствора или аэрозоля.

[00324] Способ индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, причем способ предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции согласно любому предшествующему аспекту человеку.

[00325] Способ согласно предшествующему аспекту, причем эффективное количество составляет по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp).

[00326] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем иммуногенную композицию вводят интраназально.

[00327] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем иммунный ответ против SARS-CoV-2 продолжается в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев после введения субъекту-человеку.

[00328] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем иммунный ответ против SARS-CoV-2 включает ответ с выработкой IgA и/или Т-клеточный ответ слизистых оболочек против SARS-CoV-2, индуцируемый после введения иммуногенной композиции.

[00329] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения легких или умеренных связанных с COVID-19 заболеваний после введения субъекту-человеку.

[00330] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения тяжелых связанных с COVID-19 заболеваний после введения субъекту-человеку.

[00331] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает тяжесть связанных с COVID-19 заболеваний после введения субъекту-человеку.

[00332] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения инфекции SARS-CoV-2 после введения субъекту-человеку.

[00333] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения бессимптомного COVID-19 после введения субъекту-человеку.

[00334] Способ согласно любому предшествующему аспекту, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает передачу SARS-CoV-2 после введения субъекту-человеку.

[00335] В данном документе также предусмотрены другие варианты осуществления, как будет понятно квалифицированным специалистам в данной области техники.

ПРИМЕРЫ

[00336] Нижеследующие примеры представлены с целью предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания того, как применять представленные в данном документе варианты осуществления, и не предназначены для ограничения объема раскрытия, равно как и не предназначены для представления того, что нижеследующие примеры являются всеми возможными экспериментами или единственными проведенными экспериментами. Были предприняты усилия по обеспечению точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т. д.), но следует принимать во внимание некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части обозначают объемные части, а температура указана в градусах Цельсия. Следует понимать, что в описываемых способах можно произвести изменения без изменения фундаментальных аспектов, и что примеры предназначены для иллюстрации.

[00337] **Пример 1. Материалы и методы**

[00338] **Рекомбинантный репликационно-дефектный аденовирус 5 типа.** Репликационно-дефектный аденовирус человека 5 (hAd5) получали с помощью ранее описанных способов (Miravet, et al. *Methods Mol Biol* **2014**, *1089*, 159-173). Вкратце: у дефектного hAd5 отсутствуют гены E1 и E3, что обеспечивает наличие пространства в геноме для вставки трансгена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у hAd5 отсутствуют кодирующие последовательности для каких-либо экзогенных антигенов (т. е. неаденовирусных антигенов, как у вектора AdE). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления hAd5 кодирует один или более антигенов SARS-CoV-2 (называемых в данном документе "hAd5-SARS-CoV-2"). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления hAd5 кодирует один или более антигенов гриппа (как у вектора AdD). Векторы hAd5-SARS-CoV-2 и векторы AdD могут кодировать соответственно любой антиген SARS-CoV-2 или антиген гриппа, который является иммуногенным в отношении такого(-их) антигена(-ов) у человека или отличного от человека животного (например, млекопитающего). Например, вставка антигена SARS-CoV-2 может кодировать любой белок (и/или любой его один или более фрагментов и/или производных), кодируемый посредством SEQ ID NO:1 (**фиг. 1A-J**), такой как одна или более из SEQ ID NO: 2-11, 13 или 15, и/или любой его один или более фрагментов и/или производных (например, его пептид по меньшей мере из 3, 6, 9 или 11 смежных аминокислот). Экспрессионная кассета представляет собой предранний трансген цитомегаловируса (CMV), необязательно кодирующий сигнальную последовательность (tPA) тканевого активатора плазминогена, после которой идет оптимизированная по кодонам кассета спайк-белка (S) SARS-CoV-2, вставленная в участок E1 вектора на основе аденовируса. Настоящие иммуногенные композиции производят путем разращивания вектора RD-Ad5 в репликационно-пермиссивных клетках CAP (Wölfel, et al. BMC Proceedings, 2011, 5(Supp 8):P133; Cevec) с последующей очисткой вируса от собранных инфицированных клеток, а конечный продукт может включать следующие вспомогательные вещества: Tris HCl (pH 7,4), гистидин, сахарозу, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусную кислоту и этанол, конечный продукт хранят при -80°C.

[00339] Для исследований на животных и/или клинических исследований настоящие фармацевтические составы поставляют в одноразовых стеклянных флаконах, каждый из которых содержит номинальный объем 0,7 мл стерильной замороженной суспензии иммуногенной композиции (например, вакцины), составленной для доставки номинальной дозы 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} или 1×10^{11} вирусных частиц (vp). В альтернативном случае

настоящие фармацевтические составы поставляют в одноразовом (предварительно заполненном) шприце, необязательно с атомизатором (например, BD Accuspray), который содержит номинальный объем 0,5 мл стерильной замороженной суспензии иммуногенной композиции (например, вакцины), составленной для доставки номинальной дозы 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} или 1×10^{11} вирусных частиц (vp).

[00340] Анализ формирования фокусов. Определение титра вектора hAd5 (например, AdE, hAd5-SARS-CoV-2, AdD) проводили с помощью анализа формирования фокусов (FFA) или другого подходящего анализа. Вкратце: что касается FFA, клетки, экспрессирующие вирусный рецептор (например, рецептор ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2)), высевали за сутки до анализа в 96-луночный планшет, затем серийно разводили исходные растворы вируса, оставляли для инфицирования клеток, а затем необязательно наносили слой метилцеллюлозы. Клетки инкубировали при 37°C в течение 48 часов с последующей фиксацией параформальдегидом. Для визуализации формирования фокусов отдельных инфицированных клеток в случае исходного раствора hAd5- SARS-CoV-2 использовали иммуноокрашивание с помощью моноклонального антитела к коронавирусу и вторичного антитела.

[00341] Вестерн-блоттинг. Для подтверждения экспрессии белка с hAd5 (например, рекомбинантного вируса hAd5-SARS-CoV-2) клетки линии 293 (например, 293, Calu-3, Caco-2 или Vero) инфицировали посредством hAd5-SARS-CoV-2. После периода инкубации (например, 48 часов) при 37°C, 5% CO_2, клетки один раз промывали посредством PBS и собирали с применением 2x буфера NuPage. Образцы нагревали при 95°C в течение 10 минут, охлаждали и загружали на 4-12% гели NuPage. Белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану, блокировали обезжиренным молоком и зондировали с помощью первичных антител одного или более типов в TBST, каждый из которых обладал специфичностью к одному или более антигенам SARS-CoV-2. После инкубации в течение ночи мембраны 3 раза промывали посредством TBST и проявляли блоты с помощью конъюгированных с флуоресцентной меткой вторичных антител (молекулярных зондов). После одного часа инкубации со вторичным антителом мембраны три раза промывали в TBST и один раз в PBS, затем с помощью визуализатора фиксировали флуоресцентный сигнал.

[00342] Окраска внутриклеточных цитокинов. Через восемь суток после вакцинации у вакцинированных мышей производили забор селезенок. Селезенки измельчали путем пропускания через сетчатый фильтр с диаметром поры 100 мкм и доводили в RPMI посредством 10% FBS и HEPES. Приблизительно 10^6 клеток на лунку высевали в круглодонный 96-луночный планшет и стимулировали в течение 6 часов при 37°C, 5% CO_2 в

присутствии 10 мкг/мл брефельдина А и либо α-CD3 (клон 2C11), либо 10 мкг пептида в 90% DMSO. После стимуляции пептидом клетки один раз промывали посредством PBS и окрашивали на поверхностные маркеры. Затем клетки фиксировали, подвергали процедуре пермеабилизации и окрашивали на внутриклеточные маркеры (например, IFN-γ). Клетки анализировали методом проточной цитометрии.

[00343] ELISA. В 96-луночные полистироловые планшеты в течение ночи при 4°C наносили покрытие 1 мкг/мл антигена SARS-CoV-2 в буфере на основе карбоната натрия (pH 9,3). Планшеты трижды промывали посредством PBS с 0,02% Tween 20 и блокировали обезжиренным сухим молоком в течение одного часа при 37°C с PBS, 2% BSA и 0,02% Tween 20. Сыворотку, взятую у мышей, вакцинированных посредством hAd5 (например, hAd5-SARS-CoV-2), серийно разводили в PBS, затем инкубировали при 37°C. Планшеты четыре раза промывали посредством PBS с 0,02% Tween 20 и в течение одного часа инкубировали с меченым вторичным антителом. После промывания и инкубации при необходимости планшеты считывали с помощью микропланшетного ридера.

[00344] Вакцинация посредством рекомбинантного репликационно-дефектного аденовируса 5 типа. Мышей анестезировали кетамином/ксилазином (90 мг/кг: 10 мг/кг), а затем интраназально вакцинировали соответствующим объемом $1x10^7$ частиц hAd5-SARS-CoV-2, разведенных в PBS.

[00345] Вторичное заражение животных. SARS-CoV-2 разводили в стерильном PBS, pH 7,4, с получением подходящей конечной концентрации SARS-CoV-2 на мышь (например, у мышей, у которых экспрессировался вирусный рецептор) в конечном объеме 10-50 мкл. Вторичное заражение вирусом осуществляли путем интраназального введения через 21 сутки после вакцинации посредством hAd5-SARS-CoV-2. В ходе данной процедуры мышей анестезировали кетамином/ксилазином (90 мг/кг: 10 мг/кг). После вторичного заражения каждую мышь исследовали на предмет видимых травм и помещали обратно в клетку для восстановления.

[00346] Клиническое отслеживание. После вторичного заражения посредством SARS-CoV-2 животных ежесуточно осматривали в отношении клинических результатов. У каждого животного ежесуточно регистрировали изменения массы тела, симптомы вирусной инфекции SARS-CoV-2 и летальные исходы.

[00347] Пример 2. Композиции, содержащие AdE, для иммунизации против респираторной инфекции

[00348] В описываемых в данном примере исследованиях оценивали иммунный ответ после введения AdE для предупреждения и/или лечения респираторной инфекции (например, которая могла быть вызвана гриппом), в том числе результаты измерений уровней сывороточных антител с помощью анализа ингибирования гемагглютинации и уровней секреторного IgA в легочном лаваже. Клеточный иммунитет оценивали путем оценки с помощью анализа ELISpot в легочном лаваже количества клеток, высвобождающих IFN-γ и IL-4. Кроме того, специфичный к аденовирусу иммунитет оценивали по нейтрализации аденовируса с применением сыворотки вакцинированных мышей. В данном исследовании определяли способность пустого вектора на основе аденовируса (AdE) обеспечивать защиту у мышей от вторичных инфицирований посредством вируса гриппа A H1N1, H3N2, H5N1 и вируса гриппа B. Дополнительно, после вакцинации и вторичного заражения оценивали уровни цитокинов в легочном лаваже в попытке определить механизм защиты, обеспечиваемой вектором AdE.

[00349] **Материалы и методы**

[00350] В данном примере были использованы следующие сокращения: IL - интерлейкин; MCP – моноцитарный хемоаттрактантный белок; IFN - интерферон; TNF - фактор некроза опухоли, MIP - воспалительный белок макрофагов; GM-CSF - гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор; и RANTES - хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации.

[00351] Животные: шестинедельных самок BALB/c мышей приобретали у Charles River Laboratories. Мышей помещали в карантин на 72 часа перед их использованием и держали на рационе для грызунов Teklad Rodent Diet (Harlan Teklad) и водопроводной воде в Центре исследования лабораторных животных Университета штата Юта.

[00352] Вирус: грипп A/California/04/2009 (пандемический H1N1), штамм с обозначением 175190, получали от доктора Elena Govorkova из отделения инфекционных заболеваний Детской исследовательской больницы им Св. Иуды, Мемфис, Теннеси. Вирус адаптировали к репликации в легких BALB/c мышей с помощью 9 последовательных пассажей в мышиные легкие. Вирус очищали от бляшек в клетках Мадин-Дарби почек собак (MDCK) (Американская коллекция типовых культур, Манассас, Виргиния), а исходный раствор вирусов получали путем выращивания в содержащих эмбрионы куриных яйцах, а затем в клетках MDCK. Вирус гриппа A/Victoria/3/75 (H3N2) получали из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Виргиния). Через семь серийных пассажей в легких инфицированных животных

вирус стал смертельным для мышей. После адаптации под мышей готовили исходный раствор вирусов путем их выращивания в клетках MDCK. Грипп A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) получали из Центров по контролю за заболеваниями (Атланта, Джорджия). Разращивание вирусов и анализы выполняли на клетках MDCK. Исходный вирус пассировали один раз с получением пула для вторичного заражения. Вирус гриппа B/Sichuan/379/99 получали из Центров по контролю за заболеваниями (Атланта, Джорджия). Вирус дважды разращивали в клетках MDCK, а затем последовательно 10 раз пассировали на мышах. После адаптации под мышей готовили исходный раствор вирусов путем их выращивания в клетках MDCK.

[00353] Композиция, содержащая AdE: титр вируса в случае AdE составлял $6,4\times10^9$ инфекционных единиц (ifu)/мл ($3,2\times10^8$ ifu/0,05 мл). Вакцину единоразово вводили интраназальным путем в объеме 50 мкл (см. схему эксперимента).

[00354] Схема эксперимента: количества животных и исследуемые группы описаны в таблицах 1-3. Группы мышей интраназальным путем вакцинировали на День 0 или 20 исследования. Группы плацебо тем же путем получали 50 мкл физиологического стерильного солевого раствора (PSS). Для вторичного заражения вирусом гриппа мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией кетамина/ксилазина (50 мг/кг//5 мг/кг) перед интраназальным вторичным заражением посредством 90 мкл вируса гриппа A/CA/04/2009 (H1N1p), A/Victoria/3/1975 (H3N2), B/Sichuan/379/1999 или 75 мкл вируса гриппа A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Доза при вторичном заражении составляла приблизительно 3x LD50 CCID50 (инфекционные дозы в культуре клеток) вируса на мышь. На День 22 исследования всех мышей подвергали вторичному заражению вирусом. После вторичного заражения у всех мышей наблюдали потерю массы и летальные исходные в период до Дня 21 после вторичного заражения.

Таблица 11

Исследуемые группы, которые обследовали в отношении частоты летальных исходов и массы тела

Кол-во мышей	Группа №	Инфицированные: да или нет	Вакцина		Вторичное заражение		Обследования /тестирование
			Доза (IFU/мышь)	День/путь	Вирус	День	

10	1	Да	Нет (плацебо)	День 0, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	Определение выживаемости и массы
10	3	Да	Нет (плацебо)	День 0, интраназ.	I^A/Vic/3/1975 (H3N2)	День 22	
10	5	Да	Нет (плацебо)	День 0, интраназ.	I^A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	День 22	
10	7	Да	Нет (плацебо)	День 0, интраназ.	I^B/Sichuan/379/1999	День 22	
10	9	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 0, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	
10	11	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 0, интраназ.	I^A/Vic/3/1975 (H3N2)	День 22	
10	13	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 0, интраназ.	I^A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	День 22	
10	15	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 0, интраназ.	I^B/Sichuan/379/1999	День 22	
10	17	Да	Нет (плацебо)	День 20, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	
10	19	Да	Нет (плацебо)	День 20, интраназ.	I^A/Vic/3/1975 (H3N2)	День 22	
10	21	Да	Нет (плацебо)	День 20, интраназ.	I^A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	День 22	
10	23	Да	Нет (плацебо)	День 20, интраназ.	I^B/Sichuan/379/1999	День 22	
10	25	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 20, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	
10	27	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 20, интраназ.	I^A/Vic/3/1975 (H3N2)	День 22	

10	29	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 20, интраназ.	I^A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	День 22	
10	31	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 20, интраназ.	I^B/Sichuan/379/1999	День 22	
5	2	Нет	Нормальные контроли, за которыми наблюдали в отношении набора массы				

Таблица 12

Исследуемая группа, использованная для анализа цитокинов

Кол-во мышей	**Группа №**	**Инфицированные: да или нет**	**Вакцина**		**Вторичное заражение**		**Обследования/ тестирование**
			Доза (IFU/мышь)	**День/путь**	**Вирус**	**День**	
20	1a	Да	Нет (плацебо)	День 0, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	На День 3 и 6 после вакцинации умерщвляли 5 мышей для легочного лаважа.
20	5a	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 0, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	
20	9a	Да	Нет (плацебо)	День 20, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	
20	13a	Да	AdE ($3,2X10^8$)	День 20, интраназ.	I^A/CA/04/2009 (H1N1)	День 22	На День 3 и 6 после вторичного заражения умерщвляли 5 мышей для

							легочного лаважа.

Таблица 13

Отрицательные контроли для анализа цитокинов

Кол-во мышей	**Группа №**	**Инфици-рованные: да или нет**	**Вакцина**		**Обследования/тестирование**
			Дозировка (IFU/мышь)	**День/путь**	
6	4	Нет	Нет (плацебо)	День 0, интраназ.	На День 25 и 28 после вакцинации умерщвляли 3 мышей для легочного лаважа.
6	6	Нет	AdE ($3,2X10^8$)	День 0, интраназ.	

[00355] Группы мышей интраназальным путем вакцинировали на День 0 или 20 исследования. Группы плацебо тем же путем получали 50 мкл физиологического стерильного солевого раствора (PSS). Для вторичного заражения вирусом гриппа мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией кетамина/ксилазина (50 мг/кг//5 мг/кг) перед интраназальным вторичным заражением посредством 90 мкл вируса гриппа A/CA/04/2009 (H1N1p), A/Victoria/3/1975 (H3N2), B/Sichuan/379/1999 или 75 мкл вируса гриппа A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). Доза при вторичном заражении составляла приблизительно 3x LD50 CCID50 (инфекционные дозы в культуре клеток) вируса на мышь. На День 22 исследования всех мышей подвергали вторичному заражению вирусом. После вторичного заражения у всех мышей наблюдали потерю массы и летальные исходные в период до Дня 21 после вторичного заражения.

[00356] Статистический анализ: строили кривые выживаемости Каплана-Мейера и сравнивали их с помощью логарифмического рангового критерия (критерия Кокса-Мантеля) с последующим попарным сравнением с использованием критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона в Prism 5.0f (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, Калифорния). Среднюю массу тела анализировали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим анализом с использованием критерия множественного сравнения Тьюки с помощью Prism 5.0f.

[00357] Бронхоальвеолярный лаваж (BAL): процедуру лаважа начинали сразу после забора крови и завершали в пределах 5-10 минут после смерти каждого животного. Объем 0,75 мл

фосфатно-солевого буфера (PBS) медленно вводили в легкое через трахеальную трубку. Сразу после доставки жидкость медленно удаляли осторожным отсасыванием, а образцы хранили при -80. Процедуру повторяли итого трижды и объединяли лаважные жидкости от каждой мыши.

[00358] Определение титра вируса в легких: образцы BAL в течение 5 минут центрифугировали при 2000 × g. Различные 10-кратные разведения надосадочных жидкостей BAL анализировали в трех повторностях в отношении наличия инфекционного вируса в клетках MDCK, при этом титры вируса рассчитывали так, как описано ранее (1, 2). Различия в титрах вирусов оценивали с помощью ANOVA по полученным в результате логарифмического преобразования значениям из расчета равной дисперсии и нормального распределения. После ANOVA отдельные значения результатов обработки сравнивали с контролем с плацебо с использованием критерия попарного сравнения Тьюки с помощью Prism 5.0f.

[00359] Определение цитокинов/хемокинов в легких: полученный в результате каждого лаважа легких образец (200 мкл) тестировали в отношении цитокинов и хемокинов с помощью хемилюминесцентного анализа на основе ELISA в соответствии с инструкциями производителя (Quansys Biosciences Q-Plex™ Array, Логан, Юта). Мультиплексный ELISA-анализ Quansys представляет собой количественный тест, в котором 16 различных иммобилизованных антител были в определенном массиве нанесены на каждую лунку 96-луночного планшета. Надосадочную жидкость каждого образца тестировали в 2 разведениях в отношении следующего: IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, MCP-1, IFN-g, TNF-a, MIP-1a, GM-CSF и RANTES.

[00360] Титры цитокинов и хемокинов представлены в пг/мл жидкости легочного лаважа. Различия в титре оценивали с помощью ANOVA по значениям из расчета равной дисперсии и нормального распределения. Кроме того, средние значения для групп обработки оценивали с помощью Prism 5.0f посредством двухфакторного ANOVA в отношении результатов, учитывающих конкретные сутки после инфицирования.

[00361] Результаты и обсуждение

[00362] В данном исследовании определяли способность пустого вектора на основе аденовируса (AdE) обеспечивать защиту у мышей от вторичных инфицирований посредством вируса гриппа A H1N1, H3N2, H5N1 и вируса гриппа B. Дополнительно, после вакцинации и вторичного заражения вирусом гриппа A/CA/04/2009 (пандемическим H1N1) оценивали уровни цитокинов в легочном лаваже в попытке определить механизм защиты,

обеспечиваемой вектором AdE. Мышей интраназальным путем вакцинировали посредством $3,2\times10^8$ ifu/50 мкг AdE. Однократную вакцинацию производили за три недели до вторичного инфицирования. Кроме того, в данном исследовании оценивали противовирусные эффекты вектора AdE при введении за 2 суток до вторичного инфицирования. После инфицирования у всех мышей наблюдали потерю массы и летальные исходы в период до Дня 21 после вторичного инфицирования.

[00363] Было обнаружено, что данный вектор AdE обеспечивал 100% защиту от вторичного заражения вирусом гриппа A/CA/04/2009 (пандемическим H1N1) при введении за 20 суток до вторичного заражения и обеспечивал 80% защиту при введении за двое (2) суток до вторичного заражения. Данный вектор AdE обеспечивал 90% защиту от вируса гриппа A/Victoria/3/75 (H3N2) при введении за 20 суток до вторичного заражения. Однако защита, приобретаемая с помощью вектора AdE, который был введен за двое (2) суток до вторичного заражения, не была значимой. Вектор AdE, вводимый за 20 суток до вторичного заражения вирусом гриппа A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), не обеспечивал защиты от летального исхода, но весьма значимо увеличивал средний срок до гибели. Тем не менее, при введении вектора AdE за двое (2) суток до вторичного заражения защита от гриппа A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) не приобреталась. Вектор AdE также обеспечивал 100% защиту от вируса гриппа B/Sichuan/379/9 при введении за 20 суток до вторичного заражения. Кроме того, вектор AdE обеспечивал 90% защиту при введении за двое (2) суток до вторичного заражения вирусом гриппа B/Sichuan/379/9. Вектор AdE обеспечивал значимую защиту лишь от потери массы после вторичного заражения вирусом гриппа B/Sichuan/379/9. Оба раза введения AdE, на День 0 и День 20, обеспечивали защиту от потери массы после вторичного заражения. У групп мышей, получавших AdE за 20 суток до вторичного заражения, в каждые из двух суток наблюдали снижение на 1-2 log титра вируса гриппа A/CA/04/2009 (пандемического H1N1) по сравнению с контролями на плацебо.

[00364] В попытке выявить механизм иммунной защиты, приобретаемый в результате иммунизации вектором AdE, производили определение экспрессии цитокинов и хемокинов в легочном лаваже после инфицирования вирусом гриппа A/CA/04/2009 (пандемическим H1N1). Экспрессию IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17, MCP-1, IFN-γ, TNFα, MIP-1α, GM-CSF и RANTES измеряли на День 3 и 6 после вакцинации, на День 25 и 28 после вакцинации и на День 3 и 6 после вторичного заражения (что является эквивалентным Дням 25 и 28 после вакцинации). Значимые изменения в уровнях цитокинов и хемокинов наблюдали в случае IL-1α, IL-6, IL-12p70, MCP-1, IFN-γ и RANTES. После вторичного инфицирования наблюдали значимые снижения уровней IL-1α, IL-6 и IL-12p70 по сравнению

с контролями на плацебо. Значимых изменений не наблюдали в случае IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, TNF-α, MIP-1α и GM-CSF. Значимое снижение ($p<0,01$) экспрессии IL-1α наблюдали на День 3 после вторичного заражения при введении AdE за 20 суток до вторичного заражения. Значимое снижение ($p<0,01$) экспрессии IL-6 наблюдали в легочном лаваже после вакцинации посредством AdE и вторичного заражения (например, на День 6 после вторичного заражения при введении AdE за 20 суток до вторичного заражения). Значимое снижение ($p<0,01$) экспрессии IL-12p70 наблюдали в легочном лаваже после вакцинации посредством AdE и вторичного заражения на День 3 после вторичного заражения при введении AdE за 20 суток до вторичного заражения. Значимые ($p<0,01$) изменения экспрессии MCP-1 и IFN-γ в легочном лаваже наблюдали после вакцинации и после вторичного инфицирования. Уровни MCP-1 увеличивались на День 3, 6, 25 и 28 после вакцинации у всех групп, обработанных посредством AdE. Тем не менее, уровни MCP-1 снижались на День 6 после вторичного заражения при введении AdE за 20 суток до вторичного заражения. Уровни IFN-γ увеличивались на День 6 после вакцинации при введении AdE за двое (2) суток до вторичного заражения и оставались повышенными до Дней 25 и 28 ($p<0,001$) после вакцинации при введении AdE за 20 суток до вторичного заражения. Кроме того, уровни IFNγ увеличивались приблизительно в 10 раз на День 6 после вторичного заражения при введении AdE за двое (2) суток до вторичного заражения. Значимые изменения уровней RANTES наблюдали на День 3 ($p<0,0001$), 6 ($p<0,001$) и 25 ($p<0,01$) после вакцинации. Эти данные подытожены в **таблице 14**.

Таблица 14

Введение AdE	**Инфицированы?**	**Сбор легочного лаважа после AdE**	**Снижались**	**Повышались**
День 0	Нет	День 3		MCP-1 RANTES (CCL5)
День 0	Нет	День 6		MCP-1 IFN-γ RANTES (CCL5)
День 0	Нет	День 25		MCP-1

				IFN-γ RANTES (CCL5)
День 0	Нет	День 28		MCP-1 IFN-γ
Вторичное заражение на День 22 исследования				
День 0	Да	День 25 (День 3 после вторичного заражения)	IL-1α IL-12	
День 0	Да	День 28 после AdE (День 6 после вторичного заражения)	IL-6 MCP-1	
День 20	Да	День 5 (День 3 после вторичного заражения; эквивалентно Дню 25 исследования)		
День 20	Да	День 8 (День 6 после вторичного заражения; эквивалентно Дню 28 исследования)		IFN-γ

[00365] **Выводы**

[00366] В данном примере описано применение пустого вектора на основе аденовируса (AdE) в качестве вакцины против вторичных инфицирований вирусом гриппа A H1N1, H3N2, H5N1 и вируса гриппа B. Однократную вакцинацию производили либо за три (3) недели до вторичного инфицирования, либо за двое (2) суток до вторичного инфицирования. Следует отметить, что при введении AdE за 20 суток до вторичного заражения обеспечивалась защита от всех штаммов, использованных при вторичном заражении. Оказываемые на выживание

эффекты, наблюдаемые в отношении вируса H5N1, на самом деле касались не летального исхода, а скорее заключались в увеличении среднего срока до гибели. Кроме того, при введении за двое (2) суток до вторичного заражения вектор AdE обеспечивал защиту от вторичного заражения вирусом H1N1 и гриппа B. Защита, наблюдаемая через двое (2) суток после вакцинации, свидетельствовала о врожденном иммунном механизме. Тем не менее, нет никаких ожиданий, что врожденный иммунитет будет сохраняться дольше четырех (4) суток после инфицирования. Таким образом, тот наблюдаемый факт, что мыши могут иметь защиту от вторичного заражения вирусом уже через двое (2) суток, помимо трех (3) недель после вакцинации, позволяет предположить о наличии нескольких механизмов действия. Один из возможных механизмов, который был предположен на основании повышенных уровней MCP-1 и IFN-γ как после вакцинации, так и после вторичного заражения, заключается в том, что вакцинация посредством AdE приводит к увеличению MCP-1, который рекрутирует моноциты, нейтрофилы и/или лимфоциты, что затем стимулирует продуцирование IFN-γ.

[00367] Пример 3. Клиническое испытание AdE на людях для вакцинации против SARS-CoV-2

[00368] В данном примере описано применение интраназального (i.n.) введения вирусных частиц векторов AdE (т. е. репликационно-дефектного ΔE1E3 аденовируса 5 типа (Ad5)) без экзогенного не относящегося к Ad патогену антигена, закодированного в геноме Ad5) для обеспечения профилактической терапии против SARS-CoV-2. Для определения иммуногенной и/или защитной способности иммуногенной композиции, содержащей векторы AdE против SARS-CoV-2, в ходе данного испытания иммуногенную композицию с AdE, содержащую вирусные частицы (vp) AdE, вводили субъектам-людям и тестировали ее в отношении ее влияния на иммунный ответ против SARS-CoV-2. Для этого проводили рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование с увеличением дозы для оценки безопасности и иммуногенности иммуногенной композиции, содержащей AdE, на здоровых взрослых людях в возрасте от 18 до 49 лет. Субъекты обычно проходили скрининг за 28 суток до рандомизации (День 1).

[00369] Например, исследование могло включать две части: часть A, в которой оценивали безопасность, и часть B, в которой оценивали иммуногенность иммуногенной композиции, содержащей AdE. В части A приблизительно 120 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также предоставили письменное

информированное согласие, были включены в четыре последовательные когорты по 30 субъектов, каждая из которых определялась дозой AdE (1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} и 1×10^{11} vp). В каждой когорте (и сигнальной группе в когорте первой дозы) субъектов рандомизировали в соотношении 4:1:1 для приема одной интраназальной дозы иммуногенной композиции, содержащей AdE (День 1), или одной интраназальной дозы плацебо (физраствора) (День 1). Иммуногенную композицию, содержащую AdE, и плацебо вводили двойным слепым методом. Реактогенность устанавливали путем определения количества и процента субъектов с локальными явлениями, в том числе без ограничения с раздражением в носу, чиханием, заложенностью носа, кашлем, болью в горле, изменением обоняния, изменением вкусовых ощущений, изменением зрения, болью в глазах, болью, слабостью, появлением уплотнений, эритемой, регионарной лимфаденопатией, и системными явлениями (головной болью, усталостью, миалгией, тошнотой, рвотой, диареей, продолжительным кашлем, ознобом, лихорадкой) в течение 14 суток после вакцинации. Нежелательные явления (AE) определяли как количество и процент субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57; AE, требующих оказания медицинской помощи (MAAE), серьезных AE (SAE) и впервые возникшие хронических болезней (NCI) за период с Дня 1 по День 181 после введения иммуногенной композиции, содержащей AdE. Например, целенаправленные и основанные на симптомах медицинские осмотры, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 4, 8, 15, 22, 29 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8 и 57; а образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361. Первичной конечной точкой для оценки профиля безопасности в части A было количество и процент (95% доверительный интервал (CI)) субъектов с сообщенными в процессе опроса и спонтанно сообщенными AE зарегистрированными после вакцинации. Анализ безопасности проводили с использованием выборки для оценки безопасности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с локальными событиями и системными событиями суммировали по группам, как и в случае реактогенности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57 (в том числе с MAAE, NCI, SAE) суммировали по предпочтительному термину (PT) и группе для каждого класса системы органов (SOC) согласно Медицинскому словарю терминологии нежелательных явлений. Количество (процент) субъектов с MAAE, с NCI и с SAE за период с Дня 1 по День 181 суммировали аналогичным образом. Также суммировали количество (процент, 95% CI) субъектов с AE по степени тяжести и по связи с исследуемым продуктом (IP). Приведены перечни AE, MAAE, NCI и SAE.

[00370] В части B определяли иммуногенность у иммуногенной композиции, содержащей AdE. После введения субъектам иммуногенной композиции, содержащей AdE, посредством интраназального спрея в виде однократной дозы 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} и 1×10^{11} vp и в виде двух доз (с интервалом 3 недели между дозами) наиболее хорошо переносимых из данных доз измеряли иммунный ответ с помощью ELISA сыворотки с целью измерения уровня антител к антигену SARS-CoV-2 и определяли GMT, соотношение геометрических средних (GMR) (соотношение GMT после вакцинации и до вакцинации в пределах одной и той же группы приема дозы) и частоту положительного ответа на лечение ($\geq$ четырехкратное увеличение уровня IgG после дозы). Например, приблизительно 25 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также при условии письменного информированного согласия, рандомизировали в соотношении 4:1 для приема двух интраназальных доз иммуногенной композиции, содержащей AdE, в наиболее хорошо переносимой дозе из части A или плацебо с интервалом 21 сутки между приемами (День 1 и День 22). Иммуногенную композицию, содержащую AdE, и плацебо вводили двойным слепым методом. Интраназальные дозы иммуногенной композиции, содержащей AdE, и плацебо вводили субъектам в сидячем или полулежачем положении. В части B целенаправленный и основанный на симптомах медицинский осмотр, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8, 29 и 57; образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361, а мазки из носоглотки брали на День 8, 15, 29, 36, 43, 50, 57 и 91. Также впоследствии тестировали образцы из носоглотки, собранные в момент скрининга и на День 29 и День 57, для оценки иммунного ответа слизистых оболочек.

[00371] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клиническое испытание проводили с использованием пациентов, уже инфицированных посредством SARS-CoV-2, и определяли время до клинического улучшения и/или выздоровления (или в соответствии с некоторыми вариантами осуществления на когорте протестированных пациентов). Первичным критерием было время до клинического улучшения (TTCI) и/или время до клинического выздоровления (TTCR), которое определяли в течение периода до 28 суток после введения описываемой выше композиции, содержащей AdE. TTCI определяли как время (в сутках) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо) до снижения на две категории со статуса на момент рандомизации по шестизначной порядковой шкале клинического статуса, которая варьирует от 1 (выписан) до 6 (смертельный исход). Порядковая шкала с шестью

категориями выглядит следующим образом: 6. смертельный исход; 5. ICU, необходимость экстракорпоральной мембранной оксигенации (ECMO) и/или инвазивной искусственной вентиляции легких (IMV); 4. отделение интенсивной терапии (ICU)/госпитализация, необходимость неинвазивной искусственной вентиляции легких (NIV)/высокопоточной оксигенотерапии с использованием назальной канюли (HFNC); 3. госпитализация, необходимость дополнительного кислорода (но не NIV/HFNC); 2. госпитализация, без необходимости дополнительного кислорода; и 1. выписка из больницы или соответствие критериям выписки (критерии выписки определяли как клиническое выздоровление, т. е. отсутствие лихорадки, нормализация частоты дыхания, нормализация кислородной сатурации и облегчение кашля). Вторичные показатели TTCI включали общую летальность (исходный SpO2 во время скрининга, PaO2/FiO2 <300 мм рт. ст. или частота дыхания ≥24 вдохов в минуту без дополнительного кислорода); частоту респираторного прогрессирования (SPO2 ≤94% на воздухе в помещении или PaO2/FiO2 <300 мм рт. ст. и потребность в дополнительном кислороде или более продвинутой вентиляционной поддержке); время до прекращения лихорадки (у пациентов с лихорадкой при зачислении); время до облегчения кашля до степени легкий или отсутствующий (у пациентов с кашлем при зачислении, который был оценен как тяжелый или умеренный); время до облегчения одышки до степени легкая или отсутствующая (по шкале: тяжелая, средняя, легкая и отсутствующая, у пациентов с одышкой при зачислении, которая была оценена как тяжелая или умеренная); частоту потребности в дополнительном кислороде или неинвазивной вентиляции; время до отрицательного результата RT-PCR на SARS-CoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце нижних дыхательных путей и/или образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце из нижних дыхательных путей и/или образце из верхних дыхательных путей по оценке площади под кривой вирусной нагрузки (например, определяемой с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)); частоту потребности в искусственной вентиляции легких; и частоту серьезных нежелательных явлений. TTCI определяли как время (в часах) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо) до нормализации лихорадки, частоты дыхания и кислородной сатурации, а также до облегчения кашля, сохраняющегося не менее 72 часов. Первичные показатели TTCR включали критерии нормализации и облегчения: температура - ≤36,9°C в подмышечной впадине или ≤37,2°C в ротовой полости; частота дыхания - ≤24/мин на воздухе в помещении; кислородная сатурация - >94% на воздухе в помещении; и кашель - легкий или отсутствующий по шкале,

сообщаемой пациентом, которая имела следующие категории: тяжелый, средний, легкий, отсутствует. Вторичные показатели TTCR были такими же, как и перечисленные выше вторичные показатели TTCI.

[00372] При их анализе использовали стандартную схему клинических испытаний и стандартные статистические методы. Например, размер выборки для данного исследования подбирали таким, чтобы он был достаточным и разумным для первоначального обзора профиля безопасности и иммуногенности иммуногенной композиции, содержащей AdE, в дозах, которые должны хорошо переноситься, а не для статистической мощности (например, 120 субъектов, как описано выше). Данный размер выборки позволял провести первоначальную оценку реактогенности. Например, с учетом того, что в общей сложности иммуногенную композицию, содержащую AdE, получат 100 субъектов, исследование разрабатывали так, чтобы иметь 80% вероятность обнаружения по меньшей мере одного AE, которое встречалось с частотой 1,6%. Если ни одного SAE не наблюдали среди 100 субъектов, получавших иммуногенную композицию, содержащую AdE, аппроксимация к 1-факторной верхней границе 95% доверительного интервала (CI) частоты возникновения SAE составляла 3%. Иммунологические анализы проводили с использованием оцениваемых и протокольных (PP) совокупностей, при этом первичные выводы делали на основе PP-совокупности. Анализы на основе оцениваемой совокупности проводили и задействовали лишь в том случае, если в любой группе было исключено >1 субъекта из PP-совокупности. За исключением анализа частоты положительного ответа на лечение, который описан ниже, условной подстановки отсутствующих данных не производили. Перед анализом данные соответствующим образом преобразовывали. Исходный уровень определяли как образец, взятый до введения иммуногенной композиции, содержащей AdE, на День 1. Определяли основные переменные, представляющие интерес для оценки гуморального и клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 (например, клеточные ответы). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с использованием точного критерия Фишера также проводили сравнение частоты положительного ответа на лечение в каждой группе приема дозы иммуногенной композиции, содержащей AdE, с группой плацебо. Для определения влияния уровней сывороточных антител к Ad5 до введения дозы на иммуногенность иммунологической композиции, содержащей AdE, на День 29 (часть A) или День 50 (B) проводили анализы с помощью ANCOVA с исходным титром Ad5 в качестве ковариаты. Анализы иммуногенности в слизистой оболочке проводили с использованием оцениваемых совокупностей и PP-совокупностей. Условной подстановки для отсутствующих данных не производили.

Конечными анализируемыми точками были GMT и GMR в случае уровня антител IgA, измеряемого с помощью ELISA. Сводная статистика для непрерывных параметров (результаты лабораторных тестов на безопасность и показатели жизненно важных функций) представлена по группам следующим образом: до вакцинации, после вакцинации и изменение результатов оценки до вакцинации относительно результатов оценки после вакцинации. В таблице представлены количество и процент субъектов с лабораторными показателями безопасности после вакцинации или значениями показателей жизненно важных функций, зарегистрированными как недавно ухудшившиеся относительно нормальных (т. е. явление с повышением степени токсичности по сравнению с исходным значением и со степенью тяжести умеренная или более высокая) после вакцинации в ходе исследования. Представлены таблицы сдвигов, в которых в виде комбинационных таблиц для каждого субъекта по степени тяжести представлены лабораторные показатели безопасности до и после вакцинации. Представлены сводные данные о количестве и проценте субъектов с нормальной, не соответствующий норме, но клинически не значимой, и не соответствующий норме и клинически значимой интерпретацией результатов ECG. В случае выделения вектора на основе Ad5 данные суммировали по количеству и проценту положительных результатов по моменту времени вместе с медианным числом копий. Медианная продолжительность выделения Ad5, межквартильный размах, минимальная и максимальная продолжительность выделения Ad5 представлены для каждой группы приема иммуногенной композиции, содержащей AdE, и всех групп приема доз иммунологической композиции вместе взятых. Также для оценки влияния аденовирусной инфекции приведены результаты, полученные на вирусных культурах.

[00373] Из результатов данных исследований было видно, что композицию, содержащую AdE, можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляет собой иммуногенную композицию), и она характеризовалась приемлемым профилем безопасности. Предпочтительно, что данный иммунный ответ был статистически значимым и, еще более предпочтительно, что был защитным иммунным ответом (т. е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления из данных было видно, что композицию, содержащую AdE, можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00374] **Пример 4**

[00375] ***A. Получение SARS-CoV-2 в рекомбинантном аденовирусе человека 5 типа (hAd5- SARS-CoV-2)***

[00376] Имеющий делецию по E1/E3, репликационно-дефектный hAd5 необязательно использует лидерную последовательность тканевого активатора плазминогена (tPA), после которой идет оптимизированная по кодонам нуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере один или более белков SARS-CoV-2 (например, любую одну или более из SEQ ID NO: 2-11 и/или один или более ее фрагментов и/или производных). Экспрессионную кассету, содержащую промотор цитомегаловируса (CMV) и кодирующую SARS-CoV-2 последовательность, вставляли в участок E1 у hAd5. Данный вектор в данном документе называют “hAd5-SARS-CoV-2”.

[00377] Для исследования уровня экспрессии одного или более белков SARS-CoV-2 из вакцины на основе hAd5-SARS-CoV-2 экспрессию одного или более белков SARS-CoV-2 сравнивали относительно инфицированных посредством SARS-CoV-2 клеток Vero с помощью вестерн-блоттинга с специфичным к S-антигену кроличьим поликлональным антителом к SARS-CoV-2. Из результатов вестерн-блоттинга видно, что вакцина на основе hAd5-SARS-CoV-2 экспрессировала S-антиген у инфицированных клеток. Экспрессированный S-антиген также секвенировали для проверки нативной последовательности.

[00378] ***B. Иммуногенность вакцины на основе hAd5-SARS-CoV-2***

[00379] Для понимания иммуногенности вакцины на основе hAd5-SARS-CoV-2 восьминедельных мышей (например, дикого типа или трансгенных, при условии, что они экспрессируют рецептор SARS-CoV-2) интраназально (i.n.) иммунизировали достаточным количеством (например, 1×10^7) вирусных частиц hAd5-SARS-CoV-2. На восьмые сутки, т. е. пик Т-клеточного адаптивного иммунного ответа, умерщвляли подгруппу вакцинированных мышей и ответы с участием специфичных к антигену SARS-CoV-2 $CD8^+$ Т-клеток оценивали путем окрашивания внутриклеточных цитокинов и/или посредством ELISpot на IFN-γ. Т-клетки селезенки или PBMC стимулировали с помощью пулов пептидов, охватывающих антиген, и/или иммунодоминантного пептида SARS-CoV-2 и определяли частоту встречаемости Т-клеток, продуцирующих IFN-γ. Через двадцать одни сутки после вакцинации у мышей брали кровь для оценки ответа с выработкой сывороточных антител. Для определения ответов с выработкой специфичных к S-антигену SARS-CoV-2 иммуноглобулинов (IgG) использовали специфичный к SARS-CoV-2 ELISA. Однократная вакцинация посредством

hAd5-SARS-CoV-2 может вызвать специфичный к S-антигену SARS-CoV-2 ответ с выработкой IgG, например, с более высокой реципрокной средней конечной точкой по сравнению с не подвергавшимися воздействию животными с реципрокной средней конечной точкой титра ниже предела обнаружения. Для определения количества нейтрализующих антител проводили реакции нейтрализации с уменьшением фокусов.

[00380] ***C. Нейтрализация SARS-CoV-2***

[00381] Способность вакцины к нейтрализации вирусов определяли с применением сыворотки от иммунизированных мышей, как описано в разделе B данного примера, с помощью способа уменьшения количества бляшек или уменьшения количества инфицированных фокусов. Вирусы либо дикого типа, либо аттенуированные вирусы, либо VSV-псевдотипированные вирусы с S-антигеном SARS-CoV-2 смешивали с различными разведениями сыворотки от вакцинированных мышей и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с последующим инфицированием линии клеток Vero или другой подходящей линии клеток. Затем нейтрализацию вируса количественно оценивали как максимальное разведение антитела, способное уменьшать количество бляшек или инфекционных фокусов на заданное значение, например, на 50%.

[00382] ***D. Защитная способность иммуногенных композиций, содержащих hAd5-SARS-CoV-2***

[00383] Для определения защитной способности иммуногенной композиции против SARS-CoV-2 мышам или другим подходящим грызунам (например, трансгенным грызунам, экспрессирующим вирусный рецептор) i.n. вводили достаточное количество вирусных частиц hAd5-SARS-CoV-2 (например, 1×10^7). Через двадцать одни сутки животных подвергали вторичному заражению посредством SARS-CoV-2 вместе с контрольной группой, вакцинированной фосфатно-солевым буфером (PBS), и отслеживали выживаемость. После жесточайшего вторичного заражения все контрольные мыши, вакцинированные PBS, проявляли симптомы и/или умирали от инфекции SARS-CoV-2, тогда как большинство мышей, вакцинированных посредством hAd5-SARS-CoV-2, выживали. Клинические признаки заболевания оценивали в течение двенадцати суток, и у мышей, вакцинированных посредством hAd5-SARS-CoV-2, было обнаружено улучшение в сравнении с невакцинированными контрольными мышами. Такие результаты свидетельствовали о том, что вакцина на основе

hAd5-SARS-CoV-2 способна вызывать защитный ответ, ведущий к снижению тяжести заболевания у данного модельного животного.

[00384] ***E. Прочее***

[00385] Описанные выше тесты также можно проводить с использованием одного или более других векторов на основе rdAd к SARS-CoV-2 (например, AdE, AdD) путем замены hAd5-SARS-CoV-2 другим таким вектором (например, AdE, AdD), что будет понятно специалистам в данной области техники. Получение и интерпретацию результатов следует корректировать в соответствии с одним или более конкретными тестируемыми векторами на основе rdAd к SARS-CoV-2, что также будет понятно специалистам в данной области техники.

[00386] Пример 5. Клиническое испытание hAd5-SARS-CoV-2 на людях для вакцинации против SARS-CoV-2

[00387] Для выявления иммуногенной и/или защитной способности иммуногенной композиции с hAdv5-SARS-CoV-2, содержащей вирусные частицы (vp) hAd5-SARS-CoV-2 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, ее вводили субъектам-людям и тестировали в отношении ее влияния на иммунный ответ против SARS-CoV-2 у таких субъектов и в отношении ее влияния на время до клинического улучшения и/или выздоровления у пациентов (например, госпитализированных пациентов), инфицированных посредством SARS-CoV-2. Для этого проводили рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование с увеличением дозы для оценки безопасности и иммуногенности композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, на здоровых взрослых людях в возрасте от 18 до 49 лет. Субъекты обычно проходили скрининг за 28 суток до рандомизации (День 1).

[00388] Например, исследование могло включать две части: часть A, в которой оценивали безопасность, и часть B, в которой оценивали иммуногенность иммуногенной композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2. В части A приблизительно 120 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также предоставили письменное информированное согласие, были включены в четыре последовательные когорты по 30 субъектов, каждая из которых определялась дозой hAdv5-SARS-CoV-2 (1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} и 1×10^{11} vp). В каждой когорте (и сигнальной группе в когорте первой дозы) субъектов рандомизировали в соотношении 4:1:1 для приема одной интраназальной дозы иммуногенной композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2 (День 1),

или одной интраназальной дозы плацебо (физраствора) (День 1). Иммуногенную композицию, содержащую hAdv5-SARS-CoV-2, и плацебо вводили двойным слепым методом. Реактогенность устанавливали путем определения количества и процента субъектов с локальными явлениями, в том числе без ограничения с раздражением в носу, чиханием, заложенностью носа, кашлем, болью в горле, изменением обоняния, изменением вкусовых ощущений, изменением зрения, болью в глазах, болью, слабостью, появлением уплотнений, эритемой, регионарной лимфаденопатией, и системными явлениями (головной болью, усталостью, миалгией, тошнотой, рвотой, диареей, продолжительным кашлем, ознобом, лихорадкой) в течение 14 суток после вакцинации. Нежелательные явления (AE) определяли как количество и процент субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57; AE, требующих оказания медицинской помощи (MAAE), серьезных AE (SAE) и впервые возникшие хронических болезней (NCI) за период с Дня 1 по День 181 после введения иммуногенной композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2. Например, целенаправленные и основанные на симптомах медицинские осмотры, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 4, 8, 15, 22, 29 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8 и 57; а образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361 (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) сыворотки для измерения уровня антител к антигену SARS-CoV-2, средний геометрический титр (GMT) по сравнению с Днем 0 (исходный уровень)). Также определяли значения частоты положительного ответа на лечение так, как описано ниже (например, $\geq$ четырехкратное повышение уровня IgG после введения дозы). Первичной конечной точкой для оценки профиля безопасности в части A было количество и процент (95% доверительный интервал (CI)) субъектов с сообщенными в процессе опроса и спонтанно сообщенными AE зарегистрированными после вакцинации. Анализ безопасности проводили с использованием выборки для оценки безопасности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с локальными событиями и системными событиями суммировали по группам, как и в случае реактогенности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57 (в том числе с MAAE, NCI, SAE) суммировали по предпочтительному термину (PT) и группе для каждого класса системы органов (SOC) согласно Медицинскому словарю терминологии нежелательных явлений. Количество (процент) субъектов с MAAE, с NCI и с SAE за период с Дня 1 по День 181 суммировали аналогичным образом. Также суммировали количество (процент, 95% CI) субъектов с AE по

степени тяжести и по связи с исследуемым продуктом (IP). Приведены перечни AE, MAAE, NCI и SAE.

[00389] В части B определяли иммуногенность у иммуногенной композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2. После введения субъектам иммуногенной композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, посредством интраназального спрея в виде однократной дозы 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} и 1×10^{11} vp и в виде двух доз (с интервалом 3 недели между дозами) наиболее хорошо переносимых из данных доз измеряли иммунный ответ с помощью ELISA сыворотки с целью измерения уровня антител к антигену SARS-CoV-2 и определяли GMT, соотношение геометрических средних (GMR) (соотношение GMT после вакцинации и до вакцинации в пределах одной и той же группы приема дозы) и частоту положительного ответа на лечение ($\geq$четырехкратное увеличение уровня IgG после дозы). Например, приблизительно 25 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также при условии письменного информированного согласия, рандомизировали в соотношении 4:1 для приема двух интраназальных доз иммуногенной композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, в наиболее хорошо переносимой дозе из части A или плацебо с интервалом 21 сутки между приемами (День 1 и День 22). Иммуногенную композицию, содержащую hAdv5-SARS-CoV-2, и плацебо вводили двойным слепым методом. Интраназальные дозы иммуногенной композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, и плацебо вводили субъектам в сидячем положении. В части B целенаправленный и основанный на симптомах медицинский осмотр, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8, 29 и 57; образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361, а мазки из носоглотки брали на День 8, 15, 29, 36, 43, 50, 57 и 91. Также впоследствии тестировали образцы из носоглотки, собранные в момент скрининга и на День 29 и День 57, для оценки иммунного ответа слизистых оболочек.

[00390] Клиническое испытание проводили на пациентах, уже инфицированных посредством SARS-CoV-2, и определяли время до клинического улучшения и/или выздоровления (или в соответствии с некоторыми вариантами осуществления на когорте протестированных пациентов). Первичным критерием было время до клинического улучшения (TTCI) и/или время до клинического выздоровления (TTCR), которое определяли в течение периода до 28 суток после введения описываемой выше композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2. TTCI определяли как время (в сутках) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо)

до снижения на две категории со статуса на момент рандомизации по шестизначной порядковой шкале клинического статуса, которая варьирует от 1 (выписан) до 6 (смертельный исход). Порядковая шкала с шестью категориями выглядит следующим образом: 6. смертельный исход; 5. ICU, необходимость экстракорпоральной мембранной оксигенации (ECMO) и/или инвазивной искусственной вентиляции легких (IMV); 4. отделение интенсивной терапии (ICU)/госпитализация, необходимость неинвазивной искусственной вентиляции легких (NIV)/высокопоточной оксигенотерапии с использованием назальной канюли (HFNC); 3. госпитализация, необходимость дополнительного кислорода (но не NIV/HFNC); 2. госпитализация, без необходимости дополнительного кислорода; и 1. выписка из больницы или соответствие критериям выписки (критерии выписки определяли как клиническое выздоровление, т. е. отсутствие лихорадки, нормализация частоты дыхания, нормализация кислородной сатурации и облегчение кашля). Вторичные показатели TTCI включали общую летальность (исходный SpO2 во время скрининга, PaO2/FiO2 $<$300 мм рт. ст. или частота дыхания $\geq$24 вдохов в минуту без дополнительного кислорода); частоту респираторного прогрессирования (SPO2 $\leq$94% на воздухе в помещении или PaO2/FiO2 $<$300 мм рт. ст. и потребность в дополнительном кислороде или более продвинутой вентиляционной поддержке); время до прекращения лихорадки (у пациентов с лихорадкой при зачислении); время до облегчения кашля до степени легкий или отсутствующий (у пациентов с кашлем при зачислении, который был оценен как тяжелый или умеренный); время до облегчения одышки до степени легкая или отсутствующая (по шкале: тяжелая, средняя, легкая и отсутствующая, у пациентов с одышкой при зачислении, которая была оценена как тяжелая или умеренная); частоту потребности в дополнительном кислороде или неинвазивной вентиляции; время до отрицательного результата RT-PCR на 2019-nCoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце нижних дыхательных путей и/или образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце нижних дыхательных путей и/или образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки 2019-nCoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце нижних дыхательных путей и/или образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце из нижних дыхательных путей и/или образце из верхних дыхательных путей по оценке площади под кривой вирусной нагрузки (например, определяемой с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)); частоту потребности в искусственной вентиляции легких; и частоту серьезных нежелательных явлений. TTCI

определяли как время (в часах) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо) до нормализации лихорадки, частоты дыхания и кислородной сатурации, а также до облегчения кашля, сохраняющегося не менее 72 часов. Первичные показатели TTCR включали критерии нормализации и облегчения: температура - ≤36,9°C в подмышечной впадине или ≤37,2°C в ротовой полости; частота дыхания - ≤24/мин на воздухе в помещении; кислородная сатурация - >94% на воздухе в помещении; и кашель - легкий или отсутствующий по шкале, сообщаемой пациентом, которая имела следующие категории: тяжелый, средний, легкий, отсутствует. Вторичные показатели TTCR были такими же, как и перечисленные выше вторичные показатели TTCI.

[00391] При анализе полученных в ходе испытания данных использовали стандартную схему клинических испытаний и стандартные статистические методы. Например, размер выборки для данного исследования подбирали таким, чтобы он был достаточным и разумным для первоначального обзора профиля безопасности и иммуногенности композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, в дозах, которые должны хорошо переноситься, а не для статистической мощности (например, 120 субъектов, как описано выше). Данный размер выборки позволял провести первоначальную оценку реактогенности. Например, с учетом того, что в общей сложности композицию, содержащую hAdv5-SARS-CoV-2, получат 100 субъектов, исследование разрабатывали так, чтобы иметь 80% вероятность обнаружения по меньшей мере одного AE, которое встречалось с частотой 1,6%. Если ни одного SAE не наблюдали среди 100 субъектов, получавших иммунологическую композицию, содержащую hAdv5-SARS-CoV-2, аппроксимация к 1-факторной верхней границе 95% доверительного интервала (CI) частоты возникновения SAE составляла 3%. Иммунологические анализы проводили с использованием оцениваемых и протокольных (PP) совокупностей, при этом первичные выводы делали на основе PP-совокупности. Анализы на основе оцениваемой совокупности проводили и задействовали лишь в том случае, если в любой группе было исключено >1 субъекта из PP-совокупности. За исключением анализа частоты положительного ответа на лечение, который описан ниже, условной подстановки отсутствующих данных не производили. Перед анализом данные соответствующим образом преобразовывали. Исходный уровень определяли как образец, взятый до введения композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, на День 1. Основными переменными, представляющими интерес для оценки гуморального иммунного ответа на SARS-CoV-2, были титры IgG к антигену SARS-CoV-2. GMT определяли на исходном уровне и после вакцинации на День 8, 15, 22, 29, 57, 91 и 181 (часть A) и День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 91 и 181 (часть B) и суммировали по группе приема дозы. Результаты

сравнения между дозами композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, и плацебо оценивали с помощью ковариационного анализа (ANCOVA) с лечением в качестве фиксированного эффекта и полученным в результате логарифмического преобразования исходным уровнем в качестве ковариаты на полученный в результате логарифмического преобразования последующий после исходного уровень IgG к SARS-CoV-2 в качестве зависимой переменной. В результате проведения данных анализов получали средние значения, полученные методом наименьших квадратов (LS), LS-разницу типов лечения и значения 95% CI для разниц типов лечения на логарифмической шкале. Результаты преобразовывали обратно в исходную шкалу путем возведения в степень с получением геометрических LS-средних для типа лечения, точечных оценок соотношений геометрических LS-средних и 95% доверительного интервала для этих соотношений в каждые сутки исследования. “Пациента с положительным ответом на лечение” определяли как субъекта с 4-кратным повышением титра антител к антигену SARS-CoV-2 относительно исходного уровня на День 8, 15, 22, 29, 57, 91 и 181 (часть A) и День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 91 и 181 (часть B). Кратность изменения для определения статуса пациента с положительным ответом на лечение вычисляли с использованием значений после условной подстановки без преобразования +1, т. е. кратность изменения = текущее условное значение / исходное условное значение. Показатели частоты положительного ответа на лечение представлены в виде процентов на группу приема дозы и 95% точного доверительного интервала Клоппера-Пирсона для данного процентного значения. Представлены значения разницы значений 95% доверительного интервала для сравнения частоты положительного ответа на лечение у каждой группы приема дозы композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, с группой плацебо. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с использованием точного критерия Фишера также проводили сравнение частоты положительного ответа на лечение в каждой группе приема дозы композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, с группой плацебо. Для определения влияния уровней сывороточных антител к Ad5 до введения дозы на иммуногенность композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, на День 29 (часть A) или День 50 (B) проводили анализы с помощью ANCOVA с исходным титром Ad5 в качестве ковариаты. Анализы иммуногенности в слизистой оболочке проводили с использованием оцениваемых совокупностей и PP-совокупностей. Условной подстановки для отсутствующих данных не производили. Конечными анализируемыми точками были GMT и GMR в случае уровня антител IgA, измеряемого с помощью ELISA. Были использованы те же способы, что и для анализа гуморальной иммуногенности. Сводная статистика для непрерывных параметров (результаты лабораторных тестов на безопасность и

показатели жизненно важных функций) представлена по группам следующим образом: до вакцинации, после вакцинации и изменение результатов оценки до вакцинации относительно результатов оценки после вакцинации. В таблице представлены количество и процент субъектов с лабораторными показателями безопасности после вакцинации или значениями показателей жизненно важных функций, зарегистрированными как недавно ухудшившиеся относительно нормальных (т. е. явление с повышением степени токсичности по сравнению с исходным значением и со степенью тяжести умеренная или более высокая) после вакцинации в ходе исследования. Представлены таблицы сдвигов, в которых в виде комбинационных таблиц для каждого субъекта по степени тяжести представлены лабораторные показатели безопасности до и после вакцинации. Представлены сводные данные о количестве и проценте субъектов с нормальной, не соответствующий норме, но клинически не значимой, и не соответствующий норме и клинически значимой интерпретацией результатов ECG. В случае выделения вектора на основе RD-Ad5 данные суммировали по количеству и проценту положительных результатов по моменту времени вместе с медианным числом копий. Медианная продолжительность выделения Ad5, межквартильный размах, минимальная и максимальная продолжительность выделения Ad5 представлены для каждой группы приема композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, и всех групп приема доз композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2, вместе взятых. Также для оценки влияния аденовирусной инфекции приведены результаты, полученные на вирусных культурах.

[00392] Из результатов данных исследований видно, что композицию, содержащую hAdv5-SARS-CoV-2, можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (т. е. она представляет собой иммуногенную композицию), и она проявляет приемлемый профиль безопасности. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т. е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления из данных было видно, что композицию вакцины, содержащую hAdv5-SARS-CoV-2, можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00393] Пример 6. Клиническое испытание векторов AdD на людях для вакцинации против SARS-CoV-2

[00394] В данном примере описано применение интраназального (i.n.) введения векторов AdD (т. е. вирусных частиц репликационно-дефектного аденовируса 5 типа (Ad5) с ΔE1E3,

кодирующего антиген патогена, полученный из возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2, например, вируса гриппа, как например, NasoVAX, который представляет собой AdVector (Ad5), экспрессирующий антиген гемагглютинина вируса гриппа (HA), описанный, например, в документе с серийным № 62/830444, поданном 06 апреля 2019 года, который включен в данный документ посредством ссылки и раскрывает получение NasoVAX) для обеспечения профилактической терапии против SARS-CoV-2. В соответствии с такими вариантами осуществления вектор AdD индуцирует иммунный ответ, предпочтительно, врожденный иммунный ответ как против SARS-CoV-2, так и против патогена, ассоциированного с экспрессируемым экзогенным антигеном вектора AdD. Например, NasoVAX будет индуцировать иммунный ответ как против гриппа, так и против коронавируса, в том числе SARS-CoV-2. Таким образом, AdD представляет собой двойную вакцину, индуцирующую иммунный ответ против двух респираторных инфекционных агентов.

[00395] Для определения иммуногенной и/или защитной способности композиции, содержащей векторы AdD против SARS-CoV-2, в ходе данного испытания композицию с AdD, содержащую вирусные частицы (vp) AdD, вводили субъектам-людям и тестировали ее в отношении ее влияния на иммунный ответ против SARS-CoV-2. Для этого проводили рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование с увеличением дозы для оценки безопасности и иммуногенности иммунологической композиции, содержащей AdD, на здоровых взрослых людях в возрасте от 18 до 49 лет. Субъекты обычно проходили скрининг за 28 суток до рандомизации (День 1).

[00396] Например, исследование могло включать две части: часть A, в которой оценивали безопасность, и часть B, в которой оценивали иммуногенность композиции, содержащей AdD (например, NasoVax). В части A приблизительно 120 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также предоставили письменное информированное согласие, были включены в четыре последовательные когорты по 30 субъектов, каждая из которых определялась дозой AdD (1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10}, и 1×10^{11} vp), при этом каждому субъекту вводили однократную интраназальную дозу общим объемом 0,5 мл, равномерно распределенную между ноздрями в виде назального спрея (субъекты “плацебо“ получали 0,5 мл физраствора, который не включал AdD, при этом дозу равномерно распределяли между ноздрями в виде назального спрея). В каждой когорте (и сигнальной группе в когорте первой дозы) субъектов рандомизировали в соотношении 4:1:1 для приема одной интраназальной дозы композиции, содержащей AdD (День 1), или одной интраназальной дозы плацебо (физраствора) (День 1). Композицию, содержащую AdD, и

плацебо вводили двойным слепым методом. Реактогенность устанавливали путем определения количества и процента субъектов с локальными явлениями, в том числе без ограничения с раздражением в носу, чиханием, заложенностью носа, кашлем, болью в горле, изменением обоняния, изменением вкусовых ощущений, изменением зрения, болью в глазах, болью, слабостью, появлением уплотнений, эритемой, регионарной лимфаденопатией, и системными явлениями (головной болью, усталостью, миалгией, тошнотой, рвотой, диареей, продолжительным кашлем, ознобом, лихорадкой) в течение 14 суток после вакцинации. Нежелательные явления (AE) определяли как количество и процент субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57; AE, требующих оказания медицинской помощи (MAAE), серьезных AE (SAE) и впервые возникшие хронических болезней (NCI) за период с Дня 1 по День 181 после введения композиции, содержащей AdD. Например, целенаправленные и основанные на симптомах медицинские осмотры, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 4, 8, 15, 22, 29 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8 и 57; а образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361 (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) сыворотки для измерения уровня антител к антигену SARS-CoV-2 и/или антител к антигену AdD, средний геометрический титр (GMT) по сравнению с Днем 0 (исходный уровень)) и/или иммунных клеточных ответов с образованием антител к SARS-CoV-2 и/или антител к AdD (например, Т-клеточного ответа). Также определяли значения частоты положительного ответа на лечение так, как описано ниже (например, $\geq$ четырехкратное повышение уровня IgG после введения дозы). Первичной конечной точкой для оценки профиля безопасности в части A было количество и процент (95% доверительный интервал (CI)) субъектов с сообщенными в процессе опроса и спонтанно сообщенными AE зарегистрированными после вакцинации. Анализ безопасности проводили с использованием выборки для оценки безопасности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с локальными событиями и системными событиями суммировали по группам, как и в случае реактогенности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57 (в том числе с MAAE, NCI, SAE) суммировали по предпочтительному термину (PT) и группе для каждого класса системы органов (SOC) согласно Медицинскому словарю терминологии нежелательных явлений. Количество (процент) субъектов с MAAE, с NCI и с SAE за период с Дня 1 по День 181 суммировали аналогичным образом. Также суммировали количество (процент, 95% CI) субъектов с AE по степени тяжести и по связи с исследуемым продуктом (IP). Приведены перечни AE, MAAE, NCI и SAE.

[00397] В части B определяли иммуногенность у композиции, содержащей AdD. После введения субъектам композиции, содержащей AdD, посредством интраназального спрея в виде однократной дозы 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} и 1×10^{11} vp в 0,5 мл объеме, равномерно распределенном между ноздрями в виде назального спрея (и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления в виде двух доз (с интервалом 3 недели между дозами) наиболее хорошо переносимых из данных доз), измеряли иммунный ответ с помощью ELISA сыворотки с целью измерения уровня антител к антигену SARS-CoV-2 и/или антител к антигену AdD и определяли GMT, соотношение геометрических средних (GMR) (соотношение GMT после вакцинации и до вакцинации в пределах одной и той же группы приема дозы) и частоту положительного ответа на лечение ($\geq$ четырехкратное увеличение уровня IgG после дозы), а также иммунные клеточные ответы (например, Т-клеточные ответы). Например, приблизительно 25 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также при условии письменного информированного согласия, рандомизировали в соотношении 4:1 для приема двух интраназальных доз композиции, содержащей AdD, в наиболее хорошо переносимой дозе из части A или плацебо с интервалом 21 сутки между приемами (День 1 и День 22). Композицию, содержащую AdD, и плацебо вводили двойным слепым методом. Интраназальные дозы композиции, содержащей AdD, и плацебо вводили субъектам в сидячем или полулежачем положении. В части B целенаправленный и основанный на симптомах медицинский осмотр, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8, 29 и 57; образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361, а мазки из носоглотки брали на День 8, 15, 29, 36, 43, 50, 57 и 91. Также впоследствии тестировали образцы из носоглотки, собранные в момент скрининга и на День 29 и День 57, для оценки иммунного ответа слизистых оболочек.

[00398] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клиническое испытание проводили с использованием пациентов, уже инфицированных посредством SARS-CoV-2, и определяли время до клинического улучшения и/или выздоровления (или в соответствии с некоторыми вариантами осуществления на когорте протестированных пациентов). Первичным критерием было время до клинического улучшения (TTCI) и/или время до клинического выздоровления (TTCR), которое определяли в течение периода до 28 суток после введения описываемой выше композиции, содержащей AdD. TTCI определяли как время (в сутках) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо) до снижения на две категории со

статуса на момент рандомизации по шестизначной порядковой шкале клинического статуса, которая варьирует от 1 (выписан) до 6 (смертельный исход). Порядковая шкала с шестью категориями выглядит следующим образом: 6. смертельный исход; 5. ICU, необходимость экстракорпоральной мембранной оксигенации (ECMO) и/или инвазивной искусственной вентиляции легких (IMV); 4. отделение интенсивной терапии (ICU)/госпитализация, необходимость неинвазивной искусственной вентиляции легких (NIV)/высокопоточной оксигенотерапии с использованием назальной канюли (HFNC); 3. госпитализация, необходимость дополнительного кислорода (но не NIV/HFNC); 2. госпитализация, без необходимости дополнительного кислорода; и 1. выписка из больницы или соответствие критериям выписки (критерии выписки определяли как клиническое выздоровление, т. е. отсутствие лихорадки, нормализация частоты дыхания, нормализация кислородной сатурации и облегчение кашля). Вторичные показатели TTCI включали общую летальность (исходный SpO2 во время скрининга, PaO2/FiO2 $<$300 мм рт. ст. или частота дыхания $\geq$24 вдохов в минуту без дополнительного кислорода); частоту респираторного прогрессирования (SPO2 $\leq$94% на воздухе в помещении или PaO2/FiO2 <300 мм рт. ст. и потребность в дополнительном кислороде или более продвинутой вентиляционной поддержке); время до прекращения лихорадки (у пациентов с лихорадкой при зачислении); время до облегчения кашля до степени легкий или отсутствующий (у пациентов с кашлем при зачислении, который был оценен как тяжелый или умеренный); время до облегчения одышки до степени легкая или отсутствующая (по шкале: тяжелая, средняя, легкая и отсутствующая, у пациентов с одышкой при зачислении, которая была оценена как тяжелая или умеренная); частоту потребности в дополнительном кислороде или неинвазивной вентиляции; время до отрицательного результата RT-PCR на SARS-CoV-2 в образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в образце из верхних дыхательных путей по оценке площади под кривой вирусной нагрузки (например, определяемой с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)); частоту потребности в искусственной вентиляции легких; и частоту серьезных нежелательных явлений. TTCI определяли как время (в часах) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо) до нормализации лихорадки, частоты дыхания и кислородной сатурации, а также до облегчения кашля, сохраняющегося не менее 72 часов. Первичные показатели TTCR включали критерии нормализации и облегчения: температура - $\leq$36,9°C в подмышечной впадине или $\leq$37,2°C в ротовой полости; частота дыхания - $\leq$24/мин на воздухе в помещении; кислородная сатурация - >94% на воздухе в помещении; и кашель - легкий или

отсутствующий по шкале, сообщаемой пациентом, которая имела следующие категории: тяжелый, средний, легкий, отсутствует. Вторичные показатели TTCR были такими же, как и перечисленные выше вторичные показатели TTCI.

[00399] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клиническое испытание проводили приблизительно на 120 субъектах с положительным результатом тестирования на SARS-CoV-2 в возрасте старше 50 лет, которые были рандомизированы на группы плацебо и лечения. Группа плацебо получала 0,5 мл физраствора, не включающего какой-либо вектор AdD, который вводили в виде однократной интраназальной дозы, равномерно распределенной между ноздрями, в виде назального спрея. Группе лечения вводили 0,5 мл физраствора, включающего какой-нибудь вектор AdD (т. е. NasoVax), который вводили в виде однократной интраназальной дозы, равномерно распределенной между ноздрями, в виде назального спрея. Первичными конечными точками эффективности была доля субъектов, у которых развивались симптомы синдрома острой дыхательной недостаточности (ARDS) и максимальная тяжесть протекания COVID-19 (т. е. симптомы инфекции SARS-CoV-2) по объему форсированного выдоха (FEV-1) и рентгенологическим критериям. Вторичные конечные точки включали выделение вируса, количество суток на искусственной вентиляции легких и продолжительность пребывания в больнице.

[00400] При их анализе использовали стандартную схему клинических испытаний и стандартные статистические методы. Например, размер выборки для данного исследования подбирали таким, чтобы он был достаточным и разумным для первоначального обзора профиля безопасности и иммуногенности композиции, содержащей AdD, в дозах, которые должны хорошо переноситься, а не для статистической мощности (например, 120 субъектов, как описано выше). Данный размер выборки позволял провести первоначальную оценку реактогенности. Например, с учетом того, что в общей сложности композицию, содержащую AdD, получат 100 субъектов, исследование разрабатывали так, чтобы иметь 80% вероятность обнаружения по меньшей мере одного AE, которое встречалось с частотой 1,6%. Если ни одного SAE не наблюдали среди 100 субъектов, получавших композицию hAdv5-D (на основе AdD), аппроксимация к 1-факторной верхней границе 95% доверительного интервала (CI) частоты возникновения SAE составляла 3%. Иммунологические анализы проводили с использованием оцениваемых и протокольных (PP) совокупностей, при этом первичные выводы делали на основе PP-совокупности. Анализы на основе оцениваемой совокупности проводили и задействовали лишь в том случае, если в любой группе было исключено >1 субъекта из PP-совокупности. За исключением анализа частоты положительного ответа на

лечение, который описан ниже, условной подстановки отсутствующих данных не производили. Перед анализом данные соответствующим образом преобразовывали. Исходный уровень определяли как образец, взятый до введения композиции, содержащей AdD, на День 1. Определяли основные переменные, представляющие интерес для оценки гуморального и клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 (например, титры IgG к антигену SARS-CoV-2 и/или к антигену AdD, Т-клеточные ответы). GMT определяли на исходном уровне и после вакцинации на День 8, 15, 22, 29, 57, 91 и 181 (часть A) и День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 91 и 181 (часть B) и суммировали по группе приема дозы. Результаты сравнения между дозами композиции, содержащей AdD, и плацебо оценивали с помощью ковариационного анализа (ANCOVA) с лечением в качестве фиксированного эффекта и полученным в результате логарифмического преобразования исходным уровнем в качестве ковариаты, например, на полученный в результате логарифмического преобразования последующий после исходного уровень IgG к SARS-CoV-2 в качестве зависимой переменной. В результате проведения данных анализов получали средние значения, полученные методом наименьших квадратов (LS), LS-разницу типов лечения и значения 95% CI для разниц типов лечения на логарифмической шкале. Результаты преобразовывали обратно в исходную шкалу путем возведения в степень с получением геометрических LS-средних для типа лечения, точечных оценок соотношений геометрических LS-средних и 95% доверительного интервала для этих соотношений в каждые сутки исследования. “Пациента с положительным ответом на лечение” определяли как субъекта с 4-кратным повышением титра антител к антигену SARS-CoV-2 и/или к антигену AdD относительно исходного уровня на День 8, 15, 22, 29, 57, 91 и 181 (часть A) и День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 91 и 181 (часть B). Кратность изменения для определения статуса пациента с положительным ответом на лечение вычисляли с использованием значений после условной подстановки без преобразования +1, т. е. кратность изменения = текущее условное значение / исходное условное значение. Показатели частоты положительного ответа на лечение представлены в виде процентов на группу приема дозы и 95% точного доверительного интервала Клоппера-Пирсона для данного процентного значения. Представлены значения разницы значений 95% доверительного интервала для сравнения частоты положительного ответа на лечение у каждой группы приема дозы композиции, содержащей AdD, с группой плацебо. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с использованием точного критерия Фишера также проводили сравнение частоты положительного ответа на лечение в каждой группе приема дозы композиции, содержащей AdD, с группой плацебо. Для определения влияния уровней сывороточных

антител к Ad5 до введения дозы на иммуногенность композиции, содержащей AdD, на День 29 (часть A) или День 50 (B) проводили анализы с помощью ANCOVA с исходным титром Ad5 в качестве ковариаты. Анализы иммуногенности в слизистой оболочке проводили с использованием оцениваемых совокупностей и PP-совокупностей. Условной подстановки для отсутствующих данных не производили. Конечными анализируемыми точками были GMT и GMR в случае уровня антител IgA, измеряемого с помощью ELISA. Были использованы те же способы, что и для анализа гуморальной иммуногенности. Сводная статистика для непрерывных параметров (результаты лабораторных тестов на безопасность и показатели жизненно важных функций) представлена по группам следующим образом: до вакцинации, после вакцинации и изменение результатов оценки до вакцинации относительно результатов оценки после вакцинации. В таблице представлены количество и процент субъектов с лабораторными показателями безопасности после вакцинации или значениями показателей жизненно важных функций, зарегистрированными как недавно ухудшившиеся относительно нормальных (т. е. явление с повышением степени токсичности по сравнению с исходным значением и со степенью тяжести умеренная или более высокая) после вакцинации в ходе исследования. Представлены таблицы сдвигов, в которых в виде комбинационных таблиц для каждого субъекта по степени тяжести представлены лабораторные показатели безопасности до и после вакцинации. Представлены сводные данные о количестве и проценте субъектов с нормальной, не соответствующий норме, но клинически не значимой, и не соответствующий норме и клинически значимой интерпретацией результатов ECG. В случае выделения вектора на основе Ad5 данные суммировали по количеству и проценту положительных результатов по моменту времени вместе с медианным числом копий. Медианная продолжительность выделения Ad5, межквартильный размах, минимальная и максимальная продолжительность выделения Ad5 представлены для каждой группы приема композиции, содержащей AdD, и всех групп приема доз иммунологической композиции вместе взятых. Также для оценки влияния аденовирусной инфекции приведены результаты, полученные на вирусных культурах.

[00401] Из результатов данных исследований было видно, что композицию, содержащую AdD, можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляет собой иммуногенную композицию), и она характеризовалась приемлемым профилем безопасности. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т. е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами

осуществления из данных было видно, что композицию с AdD можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00402] Пример 7. Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование NasoVAX при предупреждении клинического ухудшения у пациентов с ранним началом COVID-19

[00403] В данном примере NasoVAX применяли в качестве терапии на ранних фазах инфекции или в качестве сопутствующей терапии с противовирусными средствами прямого действия. Что касается лечения COVID-19, в ходе доклинических исследований на модельных мышах было продемонстрировано, что NasoVAX (и AdE) обеспечивает защиту от летального вторичного заражения респираторным вирусом, эффект, который проявлялся всего через 2 суток и длился 3 или более недель. См. патент США № 9175310. В приведенном выше примере 2 применение AdE (без экспрессии трансгена) было связано со снижением уровня IL-6, IL-1α и IL-12. К ним относятся цитокины, которые, как было продемонстрировано, опосредуют интерстициальное воспаление легких при COVID-19. Защиту, приобретаемую благодаря NasoVAX и AdE в доклинических исследованиях на модельных мышах, можно приписать вектору на основе аденовируса, поскольку вектор оказывал соизмеримые эффекты в присутствии или в отсутствие трансгена, экспрессирующего антиген гемагглютинина (HA) гриппа. Защитные эффекты NasoVAX можно рассматривать как биологический ответ, который снижает интенсивность врожденного иммунитета, что ослабляет чрезмерный и патогенный иммунный ответ на респираторный патоген. Это будет аналогичным применению ингибиторов IL-6 под названием кевзара (сарилумаб) и актемра (тоцилизумаб) для снижения интенсивности воспаления легких, связанного с COVID-19. В соответствии с вариантами осуществления вектор на основе аденовируса (с экспрессией трансгена респираторного патогена или без нее) при интраназальном введении облегчает симптомы заболевания COVID-19.

[00404] Преимущество подхода с использованием векторов заключается в том, что в отличие от других средств, которые можно применять для снижения интенсивности связанного с COVID-19 воспаления легких (например, кевзары (сарилумаба) и актемры (тоцилизумаба)), NasoVAX вводят интраназально, оставляя свободными порты для IV (внутривенного) доступа свободными для других лекарственных препаратов; не ограничивается единственным цитокином; отсутствует гематологический профиль побочных эффектов (например, нейтропении); и имеет место увеличенная продолжительность действия, что было бы полезно на очень ранних стадиях процесса заболевания для снижения последующего повреждения с

участием цитокинов. Более того, как показано в представленном ниже примере 9, при интраназальном введении иммуногенная композиция, доставляемая в векторе на основе аденовируса, обходит аденовирусный иммунитет у субъекта (например, у субъектов, которые являются серопозитивными в отношении такого вектора на основе вируса, т. е. Ad5), что позволяет повторно вводить дозу и/или проводить процедуру на субъектах, серопозитивных в отношении аденовируса.

[00405] Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления NasoVAX можно применять в качестве терапевтического средства для ранних фаз инфекции или в качестве сопутствующей терапии для COVID-19, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления в комбинации с противовирусными средствами прямого действия (например, хлорохин, азитромицин). В какой-то момент лекарственное вещество может быть преобразовано в продукт, в котором вводят только вектор (например, без трансгена, как в AdE).

[00406] NasoVAX получают путем выделения бактериальной колонии, несущей большую рекомбинантную плазмиду аденовируса, которая содержит оптимизированную по кодонам кДНК человека, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа A/California/04/2009 (pAdcoCA09.HA). Рекомбинантный вектор AdcoCA09.HA был выделен из клеток PER.C6 в суспензии после крупномасштабной трансфекции плазмидой pAdcoCA09.HA приблизительно 4×10^9 клеток за одну операцию с применением технологии электропорации в проточной кювете (Model STX-100, Maxcyte Inc. Гейтерсберг, Мэриленд). Во время сбора вектора инфицированные клетки и ростовые среды, содержащие какой-либо высвобожденный вектор, подвергали трем циклам замораживания-оттаивания с последующим выделением и очисткой вектора с помощью изопикнического центрифугирования в CsCl и диализа против буфера для получения конечного продукта. Очищенный вектор амплифицировали в клетках PER.C6, высвобожденных из осадка инфицированных клеток с помощью трех циклов замораживания-оттаивания, получая лизат инфицированных клеток, который осветляли центрифугированием и стерилизовали фильтрацией в качестве смеси для приготовления главного вирусного посевного материала (Pre-Master Virus Seed). Pre-MVS NasoVAX был выпущен после тестирования. Производство AdcoCA09.HA предусматривало стадию наращивания вирусной биомассы, на которой вектор pre-MVS амплифицировали согласно стандартам cGMP, увеличивая количество доступного посевного материала для инфицирования за производственный цикл. Продуктом данной промежуточной стадии наращивания биомассы был AdcoCA09.HA MVS. Получение AdcoCA09.HA MVS начиналось с наращивания векторной биомассы из pre-MVS с cGMP с последующим получением, продуцированием и

исследованием характеристик MVS. Производство лекарственной субстанции предусматривало инфицирование посредством AdcoCA09.HA клеток PER.C6 в суспензии с последующим концентрированием вектора в клеточном осадке, высвобождением вектора из клеточного осадка, осветлением лизата и очисткой вектора с применением двух последовательных смол для анионообменной хроматографии. Элюат продукта подвергали диафильтрации против буфера для составления, при необходимости концентрировали и фильтровали до стерильного состояния с получением бестарной лекарственной субстанции (BDS). Конечный лекарственный продукт (FDP) получали из BDS после разведения до соответствующей концентрации буфером для составления и фильтрации до стерильного состояния перед заполнением в конечную емкость. Тестируемый продукт, который необходимо было протестировать в данном примере, был NasoVAX, поставляемый (например, 1×10^9, 10^{10} и/или 10^{11} vp) в одноразовых стеклянных шприцах, содержащих 500 мкл стерильной замороженной суспензии в буфере A195 (10 мМ Tris, 10 мМ гистидина, 5% (масса/объем) сахарозы, 75 мМ NaCl, 1 мМ $MgCl_2$, 0,02% (масса/объем) полисорбата-80, 0,1 мМ EDTA, 0,5% (объем/объем) этанола, pH 7,4). Данные шприцы (BD, Accuspray™) предназначены для введения 250 мкл интраназального спрея в каждую ноздрю. В качестве альтернативы, NasoVAX поставляют в 2 мл стеклянных флаконах, при этом перед интраназальным введением дозу переносят в туберкулиновый шприц и прикрепляют к аэроионизатору LMA MAD300 (Teleflex, Израиль). Образцы для оценки стабильности упаковывали в ту же лекарственную форму и емкость (BD Accuspray™), что и тестируемый продукт, и тестировали с помощью анализов, которые позволяют оценить стабильность, в том числе физическую стабильность вирусных частиц (тест на вирусные частицы, HPLC), инфекционность вируса (инфекционный титр, флуоресцентный анализ бляшкообразующих единиц (FFU) аденовируса), функциональность (экспрессию трансгена) вектора на основе аденовируса (активность), физическую стабильность состава (внешний вид и pH) и стерильность.

[00407] В данном примере описано клиническое испытание, включавшее приблизительно 120 пациентов с ранним началом COVID-19, которые были рандомизированы в соотношении 1:1 на NasoVAX (доза 1×10^{11} vp) или плацебо и стратифицированы по возрасту. Каждый пациент принимал участие в исследовании в течение периода приблизительно до 6 недель (2-недельный период лечения и последующий телефонный звонок через 1 месяц). Пациентов, включенных в данное исследование, отбирали с использованием следующих неограничивающих критериев: наличие и готовность предоставить информированное согласие; мужчины и женщины в возрасте 35 лет и старше; раннее начало COVID-19, которое определяли как температуру в

ротовой полости ≥38,0° Цельсия, появление симптомов в пределах 48 часов и подтверждение COVID-19 с помощью ПЦР-диагностики в пределах 24 часов с момента рандомизации; сатурируемый O_2 (SaO_2) ≥96,0% в состоянии покоя в течение 5 минут при двух последовательных измерениях; женщины детородного возраста (женщины, которые не являются бесплодными навсегда [документально подтвержденная гистерэктомия, двусторонняя перевязка маточных труб, сальпингэктомия или овариэктомия] или женщины в постменопаузе [12 месяцев без менструаций без альтернативной медицинской причины]), наличие отрицательного теста мочи на беременность в момент скрининга и готовность практиковать высокоэффективный способ контрацепции, который предусматривает без ограничения воздержание, секс только с лицами того же пола, моногамные отношения с партнером в постменопаузе, моногамные отношения с прошедшим вазэктомию партнером, вазэктомию, использование лицензированных гормональных методов, внутриматочной спирали или последовательное использование барьерного метода (например, презерватива, диафрагмы) со спермицидом в течение 28 суток после последней дозы исследуемого лекарственного препарата; мужчины, у которых есть сексуальные партнеры с детородным потенциалом, должны были готовы практиковать высокоэффективный способ контрацепции, как определено выше, в течение 45 суток после приема последней дозы исследуемого лекарственного препарата; и способность и желание соблюдать все аспекты исследования в течение всего периода исследования. Критерии исключения включали: беременные или кормящие женщины; умеренная или сильная одышка в состоянии покоя; результаты физикального обследования, указывающие на быстрое прогрессирование заболевания, необходимость в немедленной госпитализации, обструктивные заболевания дыхательных путей, в том числе хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) и астма, или другие респираторные заболевания, которые могут обостриться независимо от тех, которые обусловлены COVID-19; патологические состояния носа, которые могут повлиять на возможность применения интраназального лекарственного препарата, такие как хронический ринит, дефект носовой перегородки, расщелина неба, носовые полипы или операции на носу, за исключением косметической ринопластики; применение хлорохина и гидроксихлорохина и других разрабатываемых средств от COVID-19 за последние 30 суток; наличие в анамнезе патологических состояний, связанных с иммунодефицитом, или курсов лечения, о которых известно, что они влияют на иммунную систему, в том числе без ограничения пероральных или внутривенных кортикостероидов, алкилирующих лекарственных средств, антиметаболитов, цитотоксических лекарственных средств, лучевой терапии,

иммуномодулирующих биопрепаратов, в пределах 30 суток до скрининга; а также любое медицинское, психиатрическое или социальное патологическое состояние, профессиональная или другая ответственность, которые, по мнению разработчика, могут мешать или служить противопоказанием для соблюдения протокола, оценка безопасности (в том числе реактогенность) или способности пациента дать информированное согласие.

[00408] Пациентов рандомизировали в соотношении 1:1 на NasoVAX или плацебо, которые вводили в виде однократной интраназальной дозы объемом 0,5 мл (0,25 мл в каждую ноздрю) в пределах 24 часов после постановки диагноза COVID-19. Первые 20 участников исследования (приблизительно 10 принимали NasoVAX и 10 принимали плацебо) составляли сигнальную когорту пациентов в возрасте от 35 до 49 лет. Пациентам выдавали одноразовые оксиметры, используемые на кончике пальца, и цифровые термометры, и они возвращались домой на время испытания. SaO_2, температуру в полости рта и частоту дыхания отслеживали дистанционно в состоянии покоя в течение 2 минут два раза в сутки в течение 14 суток с использованием пульсоксиметрии мобильного телефона/смартфона и веб-дневников для регистрации температуры в полости рта, симптомов и сопутствующих лекарственных препаратов, а также ежедневного звонка по телефону для документирования клинического статуса и нежелательных явлений (AE). Пациентов обзванивали приблизительно каждые 7±2 суток после последних суток удаленного отслеживания для документирования конечного результата и нежелательных явлений. Документировали SAE, продолжительность пребывания в больнице и в ICU и летальные исходы у госпитализированных пациентов. В ходе исследований личных посещений не было.

[00409] Что касается эффективности, основная цель данного исследования заключалась в оценке эффективности NasoVAX в предупреждении клинического ухудшения состояния пациентов с ранним началом COVID-19; вторичные цели заключались в оценке эффективности NasoVAX в снижении частоты госпитализации в ICU и использования искусственной вентилляции легких у пациентов с ранним началом COVID-19 и тяжести COVID-19 у пациентов с ранним началом COVID-19, которым необходима госпитализация. Первичной конечной точкой была доля пациентов с клиническим ухудшением состояния, определяемая как снижение среднего SaO_2 на 4% до уровня 94% или менее по данным мобильной пульсоксиметрии при любом измерении во время последующего наблюдения на дому или госпитализации. У амбулаторных пациентов вторичные конечные точки эффективности включали тяжесть протекания COVID-19, оцениваемую по максимальному снижению SaO_2 и частоте самостоятельной вентиляции по данным амбулаторной пульсоксиметрии во время

наблюдения на дому, а также долю пациентов, которым необходима искусственная вентиляция легких. У госпитализированных пациентов вторичные конечные точки эффективности включали количество суток без вентиляции легких, определяемые как одна точка (сутки) на каждые сутки между приемом дозы исследуемого препарата в День 1 и Днем 30 (относительно первой дозы исследуемого лекарственного средства), в которой пациент как оставался живым, так и не нуждался в искусственной вентиляции легких, а также соотношение парциального давления кислорода в артериальной крови к процентному содержанию вдыхаемого кислорода (соотношение P/F).

[00410] Что касается безопасности, основная цель заключалась в оценке безопасности и переносимости NasoVAX для предупреждения клинического ухудшения состояния у пациентов с ранним началом COVID-19. Сюда относились частота и тяжесть нежелательных явлений (AE), летальный исход, продолжительность пребывания в больнице и продолжительность пребывания в ICU. Конечные точки безопасности классифицировали раздельно на AE, зарегистрированные дома, и на AE, зарегистрированные во время госпитализации для оказания медицинской помощи.

[00411] Статистические методы включали допущения мощности и размера выборки, что у 10% пациентов, получавших NasoVAX, разовьется клиническое ухудшение состояния по сравнению с 29%, получавшими плацебо, 60 пациентов на группу лечения обеспечивали 77% мощность при одностороннем уровне значимости 0,05 для достижения статистической значимости для первичной переменной эффективности. К определениям совокупности относились следующие: “группа для анализа безопасности”: все пациенты, принимавшие исследуемый лекарственный препарат; “начавшие получать лечение” (ITT): все рандомизированные пациенты, которые получали любое количество исследуемого лекарственного препарата, имели результаты измерения SaO_2 на исходном уровне и результаты по меньшей мере одного измерения SaO_2 после исходного уровня. Субъектов анализирррваои в соответствии с лечением, которое они получали; и “протокольные” (PP): все рандомизированные пациенты, которые получали любое количество исследуемого лекарственного препарата в соответствии с правильным назначением лечения и которые дважды в сутки получали результаты измерений SaO_2 до Дня 14 или госпитализации. Исходный уровень определяли как данные, наиболее близкие к рандомизации, до введения каких-либо доз исследуемого лекарственного препарата. Все результаты анализов и сводную статистику представляли по группам лечения (NasoVAX, плацебо). Описательная статистика, в том числе числа и проценты для дискретных переменных, а также числа, средние значения,

стандартные отклонения, медианные значения, минимумы и максимумы для непрерывных переменных, представлены по типу лечения. Пациентов рандомизировали 1:1 в группу NasoVAX или группу плацебо и стратифицировали по возрастной группе (35-49 лет в сравнении с 50 годами и старше). Для обеспечения распределения 1:1 NasoVax и плацебо (по 10 пациентов из 20 пациентов) в сигнальной когорте рандомизированных пациентов в этой группе не стратифицировали. Для анализа эффективности использовали описательную статистику для оценки различий в демографических и исходных характеристиках. Для первичного анализа доли пациентов с клиническим ухудшением состояния, определяемым как снижение среднего SaO_2 на 4% до уровня 94% или менее по данным мобильной пульсоксиметрии в любой момент измерения во время последующего наблюдения на дому или госпитализации, сравнивали между группой NasoVAX и группой плацебо с помощью критерия Кохрана-Мантеля-Гензеля с односторонним уровнем значимости 0,05%. Такой же подход применяли к вторичным или поисковым конечным точкам, которые имели категориальный характер. Субъекты, которые преждевременно прекращали участие в исследовании или у которых отсутствовали некоторые данные, для данной конечной точки считались не давшими положительный ответ на лечение. Анализы чувствительности проводили для оценки влияния места на ответ на исследуемый лекарственный препарат. Линейную и логистическую регрессию использовали для изучения влияния на ответ таких исходных факторов, как возраст, пол, лекарственные препараты и сопутствующие медицинские заболевания. Количественные данные по безопасности сводили воедино с помощью описательной статистики и гистограмм. Все сводки представлены по веткам лечения. Случаи AE кодировали с использованием Медицинского словаря терминологии нежелательных явлений (MedDRA®), сопутствующие лекарственные препараты кодировали с помощью Словаря по лекарственным средствам от Всемирной организации здравоохранения (WHO). Результаты изменений тяжести COVID-19 относительно исходного уровня, которые оценивали по максимальному снижению SaO_2 и частоте самостоятельной вентиляции, полученной при амбулаторной пульсоксиметрии во время наблюдения на дому, анализировали с использованием смешанной модели для повторных измерений (MMRM). Модель предусматривала фиксированные эффекты лечения, фактора стратификации, номер недели и эффект сопряженности между посещением и типом лечения, а также непрерывную ковариату исходного уровня. Модель предусматривала использование неструктурированной матрицы ковариаций у пациента и способ оценки ограниченного максимального правдоподобия (ReML). Количество суток без искусственной вентиляции легких анализировали с использованием t-критерия или критерия Манна-Уитни

для непрерывных данных. Строили модель Каплана-Мейера для сравнения изменений SaO_2 среди групп лечения с течением времени. Никаких корректировок по множественности для вторичных или поисковых конечных точек не производили.

[00412] Из результатов данных исследований было видно, что NasoVAX можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляет собой иммуногенную композицию), и она характеризовалась приемлемым профилем безопасности. Из данных также было видно, что NasoVAX была эффективной в снижении показателей частоты поступления в ICU и искусственной вентиляции легких у пациентов с ранним началом COVID-19 и тяжестью COVID-19 у пациентов с ранним началом COVID-19, которые нуждаются в госпитализации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после введения NasoVAX субъектам может происходить снижение экспрессии воспалительных цитокинов, таких как IL-1α, IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, MCP-1, фактор некроза опухолей-альфа (TNF-α), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и/или RANTES (CCL5) (см., например, пример 2), и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления его можно применять для диагностики COVID-19 и/или прогнозирования выздоровления от него, а также можно применять для коррекции протоколов лечения (например, методов лечения, отличных от применения NasoVAX) соответствующим образом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления повышение уровней MCP1 и/или RANTES вскоре после введения NasoVAX можно применять для прогнозирования (например, в качестве маркера) выздоровления от COVID-19 и облегчения симптомов. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т. е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления из данных было видно, что NasoVAX можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00413] **Пример 8. Стабильность NasoVAX при комнатной температуре**

[00414] В данном примере описана долгосрочная стабильность NasoVAX в жидком составе при комнатной температуре. Долгосрочная стабильность при комнатной температуре является желательной характеристикой вакцин, которая может быть использована в ситуациях, когда могут быть недоступны охлаждение или другие средства стабилизации состава. Это было бы важно в ситуациях эпидемии или пандемии, когда вакцины необходимо доставлять в

отдаленные районы, где может отсутствовать оборудование для поддержания более низкой температуры составов, или доставлять непосредственно конечным пользователям, например, в случае индивидуальной самоизоляции дома или в карантинной зоне. Как можно видеть из представленных ниже **таблиц 9** и **10**, составы с низкой дозой (доза 2×10^9 vp/мл) и высокой дозой (доза 2×10^{11} vp/мл) получали и хранили при комнатной температуре в стеклянных флаконах в течение одного, три и шесть месяцев. Жизнеспособность векторов NasoVAX определяли с помощью флуоресцентного анализа бляшкообразующих единиц (FFU) аденовируса. Вкратце: анализ FFU проводили путем инфицирования монослоев клеток подходящим разведением NasoVAX и инкубирования в течение 24-48 часов. Затем клетки промывали, осматривали, фиксировали (например, ледяным 90% метанолом в течение четырех минут) и еще раз промывали. Затем в различных разведениях добавляли антитело к Ad5 (антитело отсутствовало в контрольных образцах) с последующим добавлением средства для обнаружения (например, NCL-Adeno (Novocastra, Ньюкасл, Великобритания)) в соответствующих условиях (например, на десять минут при комнатной температуре при встряхивании). Затем клетки промывали и определяли общее количество инфекционных частиц (например, с помощью цифрового метода определения светорассеяния (DLS)). Как видно из **таблиц 15** и **16**, составы NasoVAX с низкой и высокой дозой были стабильны в течение по меньшей мере трех месяцев при комнатной температуре.

[00415] Из результатов настоящего исследования видно, что композиция вакцины, доставляемая в векторе на основе аденовируса (например, NasoVAX), была стабильной в течение около 3 месяцев при температуре окружающей среды, как например, при комнатной температуре (например, 15-30°C, предпочтительно 20-25°C). В соответствии с вариантами осуществления такую композицию вакцины, доставляемую в векторе на основе аденовируса, можно хранить или транспортировать без потребности в замораживании или специфичных условиях хранения. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящая интраназальная вакцина, доставляемая в векторе на основе аденовируса, способна индуцировать иммунный ответ против инфицирования вирусом SARS-CoV-2 (пандемического штамма коронавируса) и/или ослаблять симптомы заболевания COVID-19, и ее можно транспортировать непосредственно к потребителю для интраназального введения.

Таблица 15

Данные по стабильности для NasoVAX (доза 2×10^9 vp/мл)

Анализ	**Момент времени стабильности**			
	T=0 мес.	**T=1 мес.**	**T=3 мес.**	**T=6 мес.**
Внешний вид	Бесцветная жидкость; полупрозрачная; видимые твердые частицы не наблюдаются	Полупрозрачная бесцветная жидкость; видимые твердые частицы не наблюдаются	Бесцветная жидкость; прозрачная и бесцветная; видимые твердые частицы не наблюдаются	Бесцветная жидкость; прозрачная; видимые твердые частицы не наблюдаются
pH	7,5	7,5	7,7	7,5
vp методом HPLC	$1,2\times10^9$ vp/мл	$1,1\times10^9$ vp/мл	$0,9\times10^9$ vp/мл	$1,2\times10^9$ vp/мл
Флуоресцентный анализ бляшкообразующих единиц (FFU) аденовируса	$1,1\times10^8$ FFU/мл	$2,3\times10^8$ FFU/мл	$0,7\times10^8$ FFU/мл	$0,1\times10^8$ FFU/мл
% инфекционных частиц	9%	21%	8%	0,4%
Агрегация по DLS	66,7 нм	139,7 нм (23% PD)	91,9 нм (14% PD)	107,5 нм (8% PD)

Таблица 16

Данные по стабильности для NasoVAX (доза 2×10^{11} vp/мл)

Анализ	Момент времени стабильности			
	T=0 мес.	**T=1 мес.**	**T=3 мес.**	**T=6 мес.**
Внешний вид	Бесцветная жидкость; полупрозрачная; видимые твердые частицы не наблюдаются	Бесцветная жидкость; полупрозрачная; видимые твердые частицы не наблюдаются	Бесцветная жидкость; полупрозрачная; видимые твердые частицы не наблюдаются	Бесцветная жидкость; полупрозрачная; видимые твердые частицы не наблюдаются
pH	7,6	7,5	7,5	7,6
vp методом HPLC	$1,3\times10^{11}$ vp/мл	$1,0\times10^{11}$ vp/мл	$0,4\times10^{11}$ vp/мл	$1,2\times10^{11}$ vp/мл
Флуоресцентный анализ бляшкообразующих единиц (FFU) аденовируса	$0,9\times10^{10}$ FFU/мл	$0,9\times10^{10}$ FFU/мл	$0,5\times10^{10}$ FFU/мл	$0,1\times10^{10}$ FFU/мл
% инфекционных частиц	7%	9%	12%	0,5%
Агрегация по DLS	122 нм	118,2 нм (19% PD)	116,9 нм (13% PD)	115,5 нм (14% PD)

[00416] **Пример 9. Выделение NasoVAX и антитела к вектору NasoVAX**

[00417] NasoVAX уже оценивали в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании фазы 2a с целью оценки безопасности и иммуногенности NasoVAX (моновалентного Adco.CA.HA) на здоровых взрослых в возрасте от 18 до 49 лет. Субъектов рандомизировали и давали им однократную дозу 1×10^{9}, 1×10^{10} и 1×10^{11} вирусных частиц (vp) или плацебо в форме солевого раствора, все дозы имели объем 0,5 мл, который приблизительно разделяли на 0,25 мл назального спрея в каждую ноздрю. Протокол был описан в заявке на выдачу патента США № 62/830442, поданной 06 апреля 2019 года.

[00418] Вторичной целью данного исследования было оценить иммунный ответ против вектора на основе аденовируса (Ad5) у субъектов, которые были серопозитивными по Ad5 (по сравнению с субъектами, которые были серонегативными) на момент введения NasoVAX.

Через четыре, восемь и 15 суток после введения дозы у каждого субъекта производили забор образцов мазков из носоглотки и определяли концентрацию вектора на основе Ad5, выделяемого каждым из субъектов, путем количественной оценки с помощью анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Как видно на **фиг. 25**, в зависимости от дозы выделение вектора NasoVAX не было обнаружено до Дня 8 после введения дозы и не было обнаружено на День 15. Не был обнаружен и репликационно-компетентный вирус.

[00419] На **фиг. 25** также проиллюстрировано GMR антител к компоненту в форме вектора на основе Ad5 NasoVAX после введения однократной интраназальной дозы 10^9 vp, 10^{10} vp или 10^{11} vp NasoVAX. Как на ней видно, введение наиболее высокой дозы (10^{11} vp) неожиданно приводило лишь к около 2,3-кратной индукции выработки антител к вектору на основе Ad5 у субъектов в сравнении с контролем. Это было важной находкой, поскольку она свидетельствовала о том, что интраназальный путь введения можно применять для повторного введения доз NasoVAX или, возможно, других иммуногенных композиций, доставляемых в векторе на основе аденовируса, в том числе векторов на основе Ad5.

[00420] На **фиг. 26** показано влияние ранее существовавшего иммунитета к Ad5 на серостатус Ad5 после введения субъектам однократной интраназальной дозы (10^{11} vp) NasoVAX. Как на ней можно видеть, ранее существовавший иммунитет к Ad5 (“серопозитивный по Ad5” (при этом медианный титр в 22 раза выше нижнего предела количественного определения (“LLOQ”)) оказывал незначительное влияние на гуморальный иммунитет (HAI), микронейтрализацию (MN), иммунитет слизистых оболочек (IgA) или клеточный (ELISpot) иммунитет к Ad5 после введения интраназальной дозы NasoVAX. Это еще один важный результат, поскольку он указывает на то, что NasoVAX можно вводить интраназально даже субъекту с уже существующим иммунитетом к Ad5. В соответствии с вариантами осуществления настоящую интраназальную вакцину, доставляемую в векторе на основе аденовируса, можно вводить повторно (например, в виде сезонной вакцины, которую вводят около один раз каждые 11-14 месяцев) без индукции существенного иммунного ответа против самого вектора на основе вируса.

[00421] **Пример 10. Клиническое испытания на людях комбинации векторов на основе rdAd к SARS-CoV-2 в качестве вакцины против SARS-CoV-2**

[00422] В данном примере описано интраназальное (i.n.) введение комбинации векторов на основе rdAd против SARS-CoV-2 (например, “комбинированной композиции против SARS-

CoV-2") для обеспечения профилактической терапии против SARS-CoV-2. Для установления иммуногенной и/или защитной способности такой одной или более иммуногенных композиций сначала человеку вводили композицию, содержащую AdE, а семь суток спустя вводили композицию, содержащую hAd5-SARS-CoV-2, после чего производили тестирование влияния данной комбинации на иммунный ответ против SARS-CoV-2 у человека(людей). Последовательное введение композиции, содержащей AdE, а затем композиции, содержащей hAd5-SARS-CoV-2, в данном документе называют "комбинированной композицией против SARS-CoV-2". Для этого проводили рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование с увеличением дозы для оценки безопасности и иммуногенности комбинированной композиции против SARS-CoV-2 на здоровых взрослых людях в возрасте от 18 до 49 лет. Субъекты обычно проходили скрининг за 28 суток до рандомизации (День 1).

[00423] Например, исследование могло включать две части: часть A, в которой оценивали безопасность, и часть B, в которой оценивали иммуногенность комбинированной композиции против SARS-CoV-2. В части A приблизительно 120 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также предоставили письменное информированное согласие, были включены в четыре последовательные когорты по 30 субъектов, каждая из которых определялась дозами комбинированной композиции против SARS-CoV-2 (1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10} и 1×10^{11} vp в каждой дозе). В каждой когорте (и сигнальной группе в когорте первой дозы) субъектов рандомизировали в соотношении 4:1:1 для приема одной интраназальной дозы комбинированной композиции против SARS-CoV-2 (композиции, содержащей AdE, на День 1 с последующим приемом композиции, содержащей hAd5-SARS-CoV-2, на День 7) или интраназальных доз плацебо (физраствора) (на День 1 и День 7). Комбинированную композицию против SARS-CoV-2 и плацебо вводили двойным слепым методом. Реактогенность устанавливали путем определения количества и процента субъектов с локальными явлениями, в том числе без ограничения с раздражением в носу, чиханием, заложенностью носа, кашлем, болью в горле, изменением обоняния, изменением вкусовых ощущений, изменением зрения, болью в глазах, болью, слабостью, появлением уплотнений, эритемой, регионарной лимфаденопатией, и системными явлениями (головной болью, усталостью, миалгией, тошнотой, рвотой, диареей, продолжительным кашлем, ознобом, лихорадкой) в течение 14 суток после вакцинации. Нежелательные явления (AE) определяли как количество и процент субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57; AE, требующих оказания медицинской помощи (MAAE), серьезных AE (SAE) и впервые возникшие

хронических болезней (NCI) за период с Дня 1 по День 181 после введения комбинированной композиции против SARS-CoV-2 или плацебо. Например, целенаправленные и основанные на симптомах медицинские осмотры, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 4, 8, 15, 22, 29 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8 и 57; а образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361 (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) сыворотки для измерения уровня антител к антигену SARS-CoV-2, средний геометрический титр (GMT) по сравнению с Днем 0 (исходный уровень)) и/или иммунных клеточных ответов с образованием антител к SARS-CoV-2 (например, Т-клеточного ответа). Также определяли значения частоты положительного ответа на лечение так, как описано ниже (например, ≥ четырехкратное повышение уровня IgG после введения дозы). Первичной конечной точкой для оценки профиля безопасности в части A было количество и процент (95% доверительный интервал (CI)) субъектов с сообщенными в процессе опроса и спонтанно сообщенными AE зарегистрированными после вакцинации. Анализ безопасности проводили с использованием выборки для оценки безопасности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с локальными событиями и системными событиями суммировали по группам, как и в случае реактогенности. Количество (процент, 95% CI) субъектов с AE за период с Дня 1 по День 57 (в том числе с MAAE, NCI, SAE) суммировали по предпочтительному термину (PT) и группе для каждого класса системы органов (SOC) согласно Медицинскому словарю терминологии нежелательных явлений. Количество (процент) субъектов с MAAE, с NCI и с SAE за период с Дня 1 по День 181 суммировали аналогичным образом. Также суммировали количество (процент, 95% CI) субъектов с AE по степени тяжести и по связи с исследуемым продуктом (IP). Приведены перечни AE, MAAE, NCI и SAE.

[00424] В части B определяли иммуногенность у комбинированной композиции против SARS-CoV-2. После введения субъектам комбинированной композиции против SARS-CoV-2 посредством интраназального спрея в виде однократной дозы 1×10^{8}, 1×10^{9}, 1×10^{10} и 1×10^{11} vp (т. е. комбинированной композиции против SARS-CoV-2 (композиции, содержащей AdE, на День 1 с последующим введением композиции, содержащей hAd5-SARS-CoV-2, на День 7) наиболее хорошо переносимых из данных доз измеряли иммунный ответ с помощью ELISA сыворотки с целью измерения уровня антител к антигену SARS-CoV-2 и GMT, соотношение геометрических средних (GMR) (соотношение GMT после вакцинации и до вакцинации в пределах одной и той же группы приема дозы) и частоту положительного ответа на лечение (≥

четырехкратное увеличение уровня IgG после дозы), а также клеточные иммунные ответы (например, Т-клеточные ответы). Например, приблизительно 25 субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения, а также при условии письменного информированного согласия, рандомизировали в соотношении 4:1 для приема двух интраназальных доз комбинированной композиции против SARS-CoV-2 в наиболее хорошо переносимой дозе из части A или плацебо с интервалом 21 сутки между приемами (День 1 и День 22). Комбинированную композицию против SARS-CoV-2 и плацебо вводили двойным слепым методом. Интраназальные дозы комбинированной иммуногенной композиции против SARS-CoV-2 и плацебо вводили субъектам в сидячем или полулежачем положении. В части B целенаправленный и основанный на симптомах медицинский осмотр, в том числе определение показателей жизненно важных функций, проводили на День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 и 57; электрокардиограмму проводили на День 57; лабораторные тесты на безопасность проводили на День 8, 29 и 57; образцы сыворотки забирали для тестирования иммуногенности на День 8, 15, 22, 29, 57, 91, 181 и 361, а мазки из носоглотки брали на День 8, 15, 29, 36, 43, 50, 57 и 91. Также впоследствии тестировали образцы из носоглотки, собранные в момент скрининга и на День 29 и День 57, для оценки иммунного ответа слизистых оболочек.

[00425] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клиническое испытание проводили с использованием пациентов, уже инфицированных посредством SARS-CoV-2, и определяли время до клинического улучшения и/или выздоровления (или в соответствии с некоторыми вариантами осуществления на когорте протестированных пациентов). Первичным критерием было время до клинического улучшения (TTCI) и/или время до клинического выздоровления (TTCR), которое определяли в течение периода до 28 суток после введения описываемой выше комбинированной композиции против SARS-CoV-2. TTCI определяли как время (в сутках) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо) до снижения на две категории со статуса на момент рандомизации по шестизначной порядковой шкале клинического статуса, которая варьирует от 1 (выписан) до 6 (смертельный исход). Порядковая шкала с шестью категориями выглядит следующим образом: 6. смертельный исход; 5. ICU, необходимость экстракорпоральной мембранной оксигенации (ECMO) и/или инвазивной искусственной вентиляции легких (IMV); 4. отделение интенсивной терапии (ICU)/госпитализация, необходимость неинвазивной искусственной вентиляции легких (NIV)/высокопоточной оксигенотерапии с использованием назальной канюли (HFNC); 3. госпитализация, необходимость дополнительного кислорода (но не NIV/HFNC); 2.

госпитализация, без необходимости дополнительного кислорода; и 1. выписка из больницы или соответствие критериям выписки (критерии выписки определяли как клиническое выздоровление, т. е. отсутствие лихорадки, нормализация частоты дыхания, нормализация кислородной сатурации и облегчение кашля). Вторичные показатели TTCI включали общую летальность (исходный SpO2 во время скрининга, PaO_2/FiO_2 <300 мм рт. ст. или частота дыхания ≥24 вдохов в минуту без дополнительного кислорода); частоту респираторного прогрессирования (SPO2 ≤94% на воздухе в помещении или PaO2/FiO2 <300 мм рт. ст. и потребность в дополнительном кислороде или более продвинутой вентиляционной поддержке); время до прекращения лихорадки (у пациентов с лихорадкой при зачислении); время до облегчения кашля до степени легкий или отсутствующий (у пациентов с кашлем при зачислении, который был оценен как тяжелый или умеренный); время до облегчения одышки до степени легкая или отсутствующая (по шкале: тяжелая, средняя, легкая и отсутствующая, у пациентов с одышкой при зачислении, которая была оценена как тяжелая или умеренная); частоту потребности в дополнительном кислороде или неинвазивной вентиляции; время до отрицательного результата RT-PCR на 2019-nCoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце нижних дыхательных путей и/или образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце нижних дыхательных путей и/или образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки 2019-nCoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце нижних дыхательных путей и/или образце верхних дыхательных путей; изменение (снижение) вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в мазке из горла, мокроте, образце из нижних дыхательных путей и/или образце из верхних дыхательных путей по оценке площади под кривой вирусной нагрузки (например, определяемой с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)); частоту потребности в искусственной вентиляции легких; и частоту серьезных нежелательных явлений. TTCI определяли как время (в часах) от начала исследуемого лечения (действующего или плацебо) до нормализации лихорадки, частоты дыхания и кислородной сатурации, а также до облегчения кашля, сохраняющегося не менее 72 часов. Первичные показатели TTCR включали критерии нормализации и облегчения: температура - ≤36,9°C в подмышечной впадине или ≤37,2°C в ротовой полости; частота дыхания - ≤24/мин на воздухе в помещении; кислородная сатурация - >94% на воздухе в помещении; и кашель - легкий или отсутствующий по шкале, сообщаемой пациентом, которая имела следующие категории: тяжелый, средний, легкий,

отсутствует. Вторичные показатели TTCR были такими же, как и перечисленные выше вторичные показатели TTCI.

[00426] При их анализе использовали стандартную схему клинических испытаний и стандартные статистические методы. Например, размер выборки для данного исследования подбирали таким, чтобы он был достаточным и разумным для первоначального обзора профиля безопасности и иммуногенности комбинированной композиции против SARS-CoV-2 в дозах, которые должны хорошо переноситься, а не для статистической мощности (например, 120 субъектов, как описано выше). Данный размер выборки позволял провести первоначальную оценку реактогенности. Например, с учетом того, что в общей сложности комбинированную композицию против SARS-CoV-2 получат 100 субъектов, исследование разрабатывали так, чтобы иметь 80% вероятность обнаружения по меньшей мере одного AE, которое встречалось с частотой 1,6%. Если ни одного SAE не наблюдали среди 100 субъектов, получавших композицию, содержащую hAdv5-SARS-CoV-2, аппроксимация к 1-факторной верхней границе 95% доверительного интервала (CI) частоты возникновения SAE составляла 3%. Иммунологические анализы проводили с использованием оцениваемых и протокольных (PP) совокупностей, при этом первичные выводы делали на основе PP-совокупности. Анализы на основе оцениваемой совокупности проводили и задействовали лишь в том случае, если в любой группе было исключено >1 субъекта из PP-совокупности. За исключением анализа частоты положительного ответа на лечение, который описан ниже, условной подстановки отсутствующих данных не производили. Перед анализом данные соответствующим образом преобразовывали. Исходный уровень определяли как образец, собранный перед введением комбинированной композиции против SARS-CoV-2 на День 1 (в случае композиции, содержащей AdE) и День 7 (в случае композиции, содержащей hAdv5-SARS-CoV-2). Определяли основные переменные, представляющие интерес для оценки гуморального и клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 (например, титры IgG к антигену SARS-CoV-2, Т-клеточные ответы). GMT определяли на исходном уровне и после вакцинации на День 8, 15, 22, 29, 57, 91 и 181 (часть A) и День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 91 и 181 (часть B) и суммировали по группе приема дозы. Результаты сравнения между дозами комбинированной композиции против SARS-CoV-2 и плацебо оценивали с помощью ковариационного анализа (ANCOVA) с лечением в качестве фиксированного эффекта и полученным в результате логарифмического преобразования исходным уровнем в качестве ковариаты, например, полученный в результате логарифмического преобразования последующий после исходного уровень IgG к SARS-CoV-2 в качестве зависимой переменной. В результате проведения данных анализов получали

средние значения, полученные методом наименьших квадратов (LS), LS-разницу типов лечения и значения 95% CI для разниц типов лечения на логарифмической шкале. Результаты преобразовывали обратно в исходную шкалу путем возведения в степень с получением геометрических LS-средних для типа лечения, точечных оценок соотношений геометрических LS-средних и 95% доверительного интервала для этих соотношений в каждые сутки исследования. "Пациента с положительным ответом на лечение" определяли как субъекта с 4-кратным повышением титра антител к антигену SARS-CoV-2 относительно исходного уровня на День 8, 15, 22, 29, 57, 91 и 181 (часть A) и День 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 91 и 181 (часть B). Кратность изменения для определения статуса пациента с положительным ответом на лечение вычисляли с использованием значений после условной подстановки без преобразования +1, т. е. кратность изменения = текущее условное значение / исходное условное значение. Показатели частоты положительного ответа на лечение представлены в виде процентов на группу приема дозы и 95% точного доверительного интервала Клоппера-Пирсона для данного процентного значения. Представлены значения разницы значений 95% доверительного интервала для сравнения частоты положительного ответа на лечение у каждой группы приема дозы комбинированной композиции против SARS-CoV2 с группой плацебо. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления с использованием точного критерия Фишера также проводили сравнение частоты положительного ответа на лечение в каждой группе приема дозы комбинированной композиции против SARS-CoV-2 с группой плацебо. Для определения влияния уровней сывороточных антител Ad5 до введения дозы на иммуногенность комбинированной композиции против SARS-CoV-2 на День 29 (часть A) или День 50 (B) проводили анализы с помощью ANCOVA с исходным титром Ad5 в качестве ковариаты. Анализы иммуногенности в слизистой оболочке проводили с использованием оцениваемых совокупностей и PP-совокупностей. Условной подстановки для отсутствующих данных не производили. Конечными анализируемыми точками были GMT и GMR в случае уровня антител IgA, измеряемого с помощью ELISA. Были использованы те же способы, что и для анализа гуморальной иммуногенности. Сводная статистика для непрерывных параметров (результаты лабораторных тестов на безопасность и показатели жизненно важных функций) представлена по группам следующим образом: до вакцинации, после вакцинации и изменение результатов оценки до вакцинации относительно результатов оценки после вакцинации. В таблице представлены количество и процент субъектов с лабораторными показателями безопасности после вакцинации или значениями показателей жизненно важных функций, зарегистрированными как недавно ухудшившиеся относительно нормальных (т. е. явление с

повышением степени токсичности по сравнению с исходным значением и со степенью тяжести умеренная или более высокая) после вакцинации в ходе исследования. Представлены таблицы сдвигов, в которых в виде комбинационных таблиц для каждого субъекта по степени тяжести представлены лабораторные показатели безопасности до и после вакцинации. Представлены сводные данные о количестве и проценте субъектов с нормальной, не соответствующий норме, но клинически не значимой, и не соответствующий норме и клинически значимой интерпретацией результатов ECG. В случае выделения вектора на основе Ad5 данные суммировали по количеству и проценту положительных результатов по моменту времени вместе с медианным числом копий. Медианная продолжительность выделения Ad5, межквартильный размах, минимальная и максимальная продолжительность выделения Ad5 представлены для каждой группы приема комбинированной композиции против SARS-CoV-2 и всех групп приема доз иммуногенной композиции вместе взятых. Также для оценки влияния аденовирусной инфекции приведены результаты, полученные на вирусных культурах.

[00427] Из результатов данных исследований видно, что комбинированную композицию против SARS-CoV-2 можно применять для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (т. е. она представляет собой иммуногенную композицию) и с приемлемым профилем безопасности. Предпочтительно, этот иммунный ответ является статистически значимым и, еще более предпочтительно, защитным иммунным ответом (т. е. она представляет собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления из данных было видно, что комбинированную композицию против SARS-CoV-2 можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00428] Пример 11. Клиническое испытание на людях вакцины против SARS-CoV-2 с помощью ингибирования цитокинов

[00429] Как показано в примере 2, было продемонстрировано, что введение AdE мышам снижало экспрессию определенных цитокинов, которые, как известно, вовлечены в развитие и симптомы инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами, такими как вирус гриппа. Например, было продемонстрировано, что у неинфицированных мышей (вирусом гриппа) через 25 суток после введения AdE проявлялось повышение экспрессии моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP-1 (CCL2)), интерферона гамма (IFN-γ) и RANTES (CCL5). Через 28 суток после введения AdE, такие неинфицированные мыши демонстрировали

повышенную экспрессию MCP-1 и IFN-γ, а также снижение экспрессии IL-12. Мышей подвергали вторичному заражению вирусом гриппа на День 3 после введения AdE, было обнаружено, что мыши демонстрировали пониженную экспрессию IL-1α, IL-6, IL-12, MCP-1, фактора некроза опухолей альфа (TNF-α), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и RANTES. На День шесть (6) после введения AdE инфицированные мыши демонстрировали пониженную экспрессию IL-5, IL-6, IL-12, IL-17, MCP-1 и GM-CSF и повышенную экспрессию воспалительного белка макрофагов 1 альфа (MIP-1α (CCL3)) и RANTES (CCL5). Эти результаты соответствуют развитию "цитокинового шторма" во время инфекции SARS-CoV-2. Следовательно, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления для предупреждения и/или лечения инфекции SARS-CoV-2, например, посредством ингибирования развития или подавления цитокинового шторма, иммуногенную композицию против SARS-CoV-2 вводят человеку с одним или более противоцитокиновыми реактивами) (например, одним или более реактивами против IL-1α, одним или более реактивами против IL5, одним или более реактивами против IL-6, одним или более реактивами против IL-12, одним или более реактивами против IL-17, одним или более реактивами против MCP-1, одним или более реактивами против TNF-α, одним или более реактивами против GM-CSF и/или одним или более реактивами против RANTES. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов не будут включать в себя один или более реактивов против MIPα и/или один или более реактивов против RANTES. Иллюстративные противоцитокиновые реактивы, которые можно применять, как описано в данном документе, могут включать в себя, например, любой из представленных в **таблице 10**.

[00430] Такие противоцитокиновые реактивы вводили с иммуногенной композицией против SARS-CoV-2 в один и тот же момент времени (т. е. одновременно) или, по существу, в один и тот же момент времени посредством подходящего пути, соответствующего каждому средству (например, интраназальное введение иммуногенной композиции против SARS-CoV-2 и подкожная инъекция для противоцитокинового(противоцитокиновых) реактива(реактивов)) в эффективных количествах. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов вводили совместно с композицией против SARS-CoV-2 и в соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более противоцитокиновых реактивов впоследствии вводили в виде отдельных активных средств. По результатам данных исследований было видно, что комбинация композиции(композиций)

против SARS-CoV-2 и одного или более противоцитокиновых реактивов была полезной для индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2 у людей (например, она представляла собой иммуногенную композицию) с приемлемым профилем безопасности и с облегчением симптомов, связанных с вредными воздействиями цитокинов, которые испытывают некоторые пациенты (например, вышеупомянутый цитокиновый шторм). Предпочтительно, чтобы иммунный ответ был статистически значимым и, еще более предпочтительно, чтобы он представлял собой защитный и/или лечебный иммунный ответ (т. е. она представляла собой вакцину против SARS-CoV-2). В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления из представленных данных видно, что комбинацию композиции(композиций) против SARS-CoV-2 и одного или более противоцитокиновых реактивов можно применять для лечения субъектов, инфицированных SARS-CoV-2 (например, госпитализированных пациентов).

[00431] **Пример 12. Стратегии введения доз при исследовании на животных**

[00432] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или более векторов к SARS-CoV-2 и/или комбинацию(комбинации) векторов к SARS-CoV-2 (т. е. “вакцины против SARS-CoV-2”) вводили животным в различных дозах для оценки результатов их доклинической проверки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определяли механизмы индуцируемой вакциной защиты у животных. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определяли механизмы индуцируемой вакциной защиты у животных с ранее существовавшим иммунитетом к более распространенным циркулирующим коронавирусам (как и в случае большинства людей). Данные исследования предусматривали: (i) оценку индуцируемого вакциной против SARS-CoV-2 воспаления легких; (ii) определение титров Ab к вакцине против SARS-CoV-2 с изотипом и широтой реактивности до Дня 28; (iii) определение нейтрализационных титров антител (Ab) к SARS-CoV-2 до Дня 28 после введения; и (iv) выявление оптимального графика приема доз/введения вакцины против SARS-CoV-2.

[00433] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммунитет животных можно исследовать с помощью методик проточной цитометрии, описанных у Yu, et al. (PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0150606 March 3, 2016), которые, как было показано, пригодны для точного количественного определения одиннадцати различных типов иммунных клеток, в том числе Т-клеток, В-клеток, натуральных киллеров (NK), нейтрофилов, эозинофилов, воспалительных моноцитов, резидентных моноцитов, макрофагов (например,

тканеспецифичных макрофагов, резидентных/внутритканевых макрофагов, альвеолярных макрофагов, микроглии), тучных клеток, базофилов и/или плазмацитоидных DC, и/или для проведения подробного фенотипирования конкретных типов клеток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, например, для отделения NK-клеток и моноцитов от зрелых миелоидных клеток можно использовать сравнение экспрессии SSC и MHC II класса; и/или для того, чтобы отличить макрофагов от дендритных клеток, можно использовать сравнение экспрессии CD64 и CD24, равно как и экспрессию CD11c и MHC второго класса (хотя первое может быть более точным). Также можно исследовать и другие маркеры, как известно из уровня техники (например, любой один или более из CD11b, CD14, CD24, CD68, CD103, CD169, CD206, CX_3CR1, CCR2, F4/80, IA-IE, Ly6C и/или MerTK). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления определяли титры специфичных к SARS-2-CoV-2 антител в дыхательных путях легких и сыворотке крови (например, с помощью наборов микроносителей); измеряли инфильтрат воспалительных клеток в легкие (например, с помощью проточной цитометрии); определяли нейтрализационные титры антител к SARS-CoV-2 (например, с помощью анализов микронейтрализации SARS-2); оценивали местные и системные уровни цитокинов; определяли количество и функциональные свойства специфичных к SARS-2 B-клеток (например, субпопуляций), T-клеток (например, с помощью ICCS или ELISPOT цитокинов) и плазмоцитов (например, с помощью ELISPOT антител) с ранних моментов времени (7-14 сутки) до моментов времени выработки иммунной памяти (1-4 месяца) после вакцинации у не подвергавшихся воздействию мышей и у мышей с ранее существовавшим иммунитетом к родственным эндемическим коронавирусам. Также можно применять и другие типы анализов, которые известны в данной области техники, или другие типы анализов, которые, как будет в ином случае понятно специалистам в данной области техники, могут быть применимы в таких случаях.

[00434] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления механизмы индуцируемой вакциной защиты животных определяли путем изучения животных, которым вводили вакцину против SARS-CoV-2 в соответствии со схемой введения, представленной в **таблице 17**.

Таблица 17

Эксперименты 1 и 2 (вакцина-кандидат №1 и №2)*					
Вакцина	**Кол-во, линия**	**7 суток (n=10)**	**14 суток (n=10)**	**21 суток (n=10)**	**28 суток (n=10)**

	(C57BL/6 или CD1)				
Высокая доза Однокр. введен.**	30	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]	Не проводили	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]
Средняя доза Однокр. введен.	30	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] Сыворотка[c,d]	Не проводили	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]
Низкая доза Однокр. введен.	30	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]	Не проводили	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]
Высокая доза Двукр. введен. (День 0 и День 14)	20	• Не проводили	• Не проводили	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] Сыворотка[c,d]	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]
Холостой контроль	10	• BAL[a] • Тканевый фенотип[b] • Сыворотка[c,d]	• NA	NA	• NA

*Вакцина-кандидат №1: вектор с S1 (**SEQ ID NO: 13**); вакцина-кандидат №2: вектор с RBD (**SEQ ID NO: 15**)

введен. ”обозначает“ введение

[a]Ab в BAL (бронхоальвеолярном лаваже) по результатам анализа с помощью наборов микроносителей

[b]Субпопуляции Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и клеток миелоидного направления дифференцировки в крови, селезенке, медиастинальном лимфатическом узле, легочной ткани, BAL (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, воспалительные моноциты, резидентные моноциты, альвеолярные макрофаги, резидентные/внутритканевые макрофаги, CD11b- DC и CD11b+ DC) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777539/pdf/pone.0150606.pdf

[c]Специфичная к COVID, специфичная к домену и перекрестная реактивность сывороточных Ab к эндемическим коронавирусам по результатам анализа с помощью наборов микроносителей (включают изотип и подизотипы)
[d]Анализы на нейтрализующие антитела в сыворотке или уменьшение количества вирусов (выбор наиболее подходящих моментов времени и вакцины-кандидата на основе результатов анализов связывания из собранных образцов сыворотки)

[00435] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, как например, для оценки B-клеточных и T-клеточных ответов на вакцины-кандидаты для определения наилучшей схемы приема доз и введения, использовали режим приема доз, показанный **в таблице 17**. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления животные получали вакцину против SARS-CoV-2 (или две разные вакцины против SARS-CoV-2, как показано в **таблице 17**) согласно оптимальному режиму приема доз и введения, определенному по схеме, представленной в **таблице 18**. Данные собирали в четыре момента времени (например, n=7/группа/момент времени/функциональный анализ, моменты времени в промежутке от Дня 0 до Дня 120). Индуцируемое вакциной против SARS-CoV-2 воспаление легких и ответы с выработкой Ab измеряли на День 28, титры Ab к SARS-CoV-2 с изотипом и широтой реактивности определяли до Дня 120, титры нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 определяли до Дня 120, T-клеточные ответы, индуцированные SARS-CoV-2, определяли до Дня 28 и индуцируемые вакциной против SARS-CoV-2 ответы с участием ASC и B-клеток памяти определяли до Дня 120.

Таблица 18

Результаты анализов функциональных и антигенспецифичных свойств вакцин против SARS-CoV-2 после вакцинации					
Оптимальная вакцина/доза/ время	**Кол-во, линия**	**7-14 суток (n=20)**	**14-28 суток (n=20)**	**60 суток (n=10)**	**120 суток (n=10)**
Вакцина против SARS-CoV-2 № 1 (оптимальный прием доз)	60 (инбред-ные)	• BAL[f,g,h] • Ткани[i,j,k] • Сыворотка[l]	• BAL[f,g,h] • Ткани[i,j,k] • Сыворотка[l, m]	• BAL[g] • Ткани[i,k] • Сыворотка[l, m]	• BAL[g] • Ткани[i,k] • Сыворотка[l, m]
Вакцина против SARS-	60	• BAL[f,g,h]	• BAL[f,g,h]	• BAL[g]	• BAL[g]

CoV-2 № 2 (оптимальный прием доз)	(инбред-ные)	• Ткани[i,j,k] • Сыворотка[l]	• Ткани[i,j,k] • Сыворотка[l, m]	• Ткани[i,k] • Сыворотка[l, m]	• Ткани[i,k] • Сыворотка[l, m]
Холостой контроль	20 (инбред-ные)	• BAL[f,g,h] • Ткани[i,j,k] • Сыворотка[l]	NA	NA	NA

[f]Цитокины/Ab в надосадочной жидкости BAL (например, 5 цитокинов из данного перечня: IL-6, IL-10, TNF-α, IL-5, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, MIP-1a и MIP-2)
[g]Клетки BAL по результатам ELISPOT (SARS2-специфичные IgA, M и G).
[h]Клетки BAL: вторичный Т-клеточный иммунный ответ с выработкой IFNg по результатам ICCS (повторная CD4 и CD8 стимуляция против CD3 и/или EL4 клеток, экспрессирующих S-белок SARS2)
[i]Легочная ткань, медиастинальный лимфатический узел, селезенка, костный мозг (BM) по результатам ELISPOT (SARS2-специфичные IgA, M и G)
[j]Легочная ткань, медиастинальный лимфатический узел, селезенка: антиген-специфичный вторичный Т-клеточный иммунный ответ с выработкой IFNγ по результатам ICCS (повторная CD4 и CD8 стимуляция против CD3 и/или EL4 клеток, экспрессирующих S-белок SARS2)
[k]BAL, легкое, медиастинальный лимфатический узел, селезенка: проточная цитометрия SARS2-специфичных B-клеточных иммунных ответов
[l]Повторы анализов сывороточных Ab, в случае необходимости
[m]Анализы титра нейтрализующих антител в сыворотке или снижения количества вирусов, в случае необходимости

[00436] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления представленный далее протокол использовали независимо от того, оказывает ли ранее существовавший иммунитет к эндемическому β-коронавирусу влияние на вызываемые вакциной ответы на SARS2. В данном эксперименте (таблица 3) оценивали влияние уже существующих B-клеток памяти к коронавирусному спайк-белку эндемических β-коронавирусов. Инбредных мышей (BALB/c или B6) вакцинировали рекомбинантным спайк-белком OC43 или HKU1 с применением двух разных адъювантов (CFA или алюма) для выработки ответа с участием B-клеток памяти на спайк-белок эндемичных коронавирусов (т. е. “мышей с памятью”). Затем иммунизированным мышам и контрольным, не подвергавшимся воздействию мышам давали оптимальную(оптимальные) вакцину(вакцины) против SARS-CoV-2. У мышей с памятью оценивали воспаление легких, ответы с выработкой Ab к SARS-CoV-2 и B-клеточные ответы, т. е. количество Ab к SARS-CoV-2. Дополнительные сведения касательно схемы введения представлены в **таблице 19**.

Таблица 19

Эксп. №4 – уже существовавший иммунитет к S-белкам родственных коронавирусов - влияние на вакцинацию спайк-белком SARS2					
Вакцинация №1 День 0 и 14	**Вакцинация №2, День 60**	**Кол-во, линия**	**7 суток после вакц.2 (n=10)**	**14 суток (n=10)**	**28 суток (n=10)**
Рекомбинантный S-белок HKU1 или OC43 в адъюванте 1	отсут.	30 (инбредные)	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• Сыворотка[s,t]
Рекомбинантный S-белок HKU1 или OC43 в адъюванте 2	отсут.	30 (инбредные)	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• Сыворотка[s,t]
Рекомбинантный S-белок HKU1 или OC43 в адъюванте 1	Ad5 с SARS2, наилучший	30 (инбредные)	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• Сыворотка[s,t]
Рекомбинантный S-белок HKU1 или OC43 в адъюванте 2	Ad5 с SARS2, наилучший	30 (инбредные)	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] Сыворотка[s]	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• Сыворотка[s,t]
Холостой контроль	Ad5 с SARS2, наилучший	30 (инбредные)	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	• BAL[n,o] • Ткань[p,q,r] • Сыворотка[s]	Сыворотка[s,t]

[n]Цитокины в BAL по результатам Luminex (IL-6, IL-10, TNF-α, IL-5, IFN-α, IFN-β и IFN-γ)
[o]Ab в BAL по результатам анализа с помощью наборов микроносителей
[p]Субпопуляции Т-клеток, В-клеток, NK-клеток и клеток миелоидного направления дифференцировки в крови, селезенке, медиастинальном лимфатическом узле, легочной ткани, BAL (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, воспалительные моноциты, резидентные моноциты, альвеолярные макрофаги, резидентные/внутритканевые макрофаги, CD11b- DC и CD11b+ DC) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777539/pdf/pone.0150606.pdf

[q]BAL, легкое, медиастинальный лимфатический узел, селезенка: проточная цитометрия SARS2-специфичных B-клеточных иммунных ответов
[r]Клонирование рецепторов SARS2-специфичных B-клеток и исследование ширины и глубины реактивности (и аффинности/авидности)
[s]Специфичная к COVID, специфичная к домену и перекрестная реактивность сывороточных Ab к эндемическим коронавирусам по результатам анализа с помощью наборов микроносителей (включают изотип и подизотипы)
[t]Анализы титра нейтрализующих антител в сыворотке или снижения количества вирусов (сначала с псевдотипированным вирусом, а затем с основным SARS2)

[00437] **Пример 13A. Получение векторов на основе аденовируса (с S1 и RBD) для доклинического тестирования**

[00438] Вакцины-кандидаты, использованные в примерах 13A-18, получали с применением платформы на основе репликационно-дефектного аденовируса 5 типа с делецией E1 и E3 (Tang et al 2009) с целью экспрессии оптимизированного по кодонам для экспрессии у человека гена для домена S1 (остатки 16-685) или домена RBD (остатки 302-543) спайк-белка SARS-CoV-2 (номер доступа QHD43416.1). Доставляемые в векторе на основе Ad5 трансгены S1 и RBD включали в себя лидерную последовательность тканевого активатора плазминогена человека, и их экспрессировали под управлением немедленно-раннего промотора/энхансера цитомегаловируса, **SEQ ID NO: 13** и **SEQ ID NO: 15** соответственно. Исходные посевные материалы получали в результате крупномасштабной трансфекции рекомбинантной векторной плазмидой E1-комплементарных клеток PER.C6 с использованием масштабируемой системы трансфекции (Maxcyte STX-100). Трансфекцию клеток выполняли путем статической электропорации с использованием процедуры процессинга и сборки CL1.1 (Li LH, Shivakumar R, Feller S, Allen C, Weiss JM, Dzekunov S, Singh V, Holaday J, Fratantoni J, Liu LN. Highly efficient, large volume flow electroporation. Technol Cancer Res Treat. 2002 Oct;1(5):341-50.). После дополнительного наращивания биомассы инфицированные клетки собирали спустя 70 часов после инфицирования и высвобождали вирус из осажденных клеток при помощи циклов замораживания-оттаивания. Полученный клеточный лизат осветляли путем центрифугирования, затем фильтровали с предельным диаметром 0,22 мкм. Векторы с RBD и с S1 на основе Ad5 очищали в градиенте CsCl, подвергали диализу против буфера для составления (A195), содержащего 10 мМ Tris с pH 7,4, 75 мМ NaCl, 1 мМ $MgCl_2$, 10 мМ гистидина, 5% (масса/объем) сахарозы, 0,02% полисорбата-80 (масса/объем), 0,1 мМ EDTA и 0,5% (объем/объем) этанола, а затем замораживали и хранили при -65°C. Для подтверждения того, что трансгены S1 и RBD экспрессировались и были интактными с точки зрения антигенных свойств, клетки PerC6 инфицировали вектором с S1 или векторами с RBD перед

внутриклеточным окрашиванием с помощью двух разных нейтрализующих моноклональных антител к S1 SARS-CoV-2 (SinoBiologicals, кат. № 40591-MM43) и к RBD SARS-CoV-2 (SinoBiologicals, кат. № 40592-MM57) и анализа с помощью проточной цитометрии (**фиг. 93**).

[00439] **Пример 13B. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен RDB, у C57BL/6 мышей**

[00440] Вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен RBD из спайк-антигена SARS-CoV-2 (**SEQ ID NO: 15**), вводили интраназально C57BL/6 мышам для оценки индукции системного иммунитета и иммунитета слизистых оболочек против SARS-CoV-2. C57BL/6 мышам производили одно или два интраназальных введения вектора на основе Ad5 в трех разных дозах в объеме 50 мкл, как указано в таблице 18. Высокая доза составляла 6,7E+09 ifu/мл (3,35E+08 ifu в 50 мкл), средняя доза составляла 1,2E+09 ifu/мл (6E+07 ifu в 50 мкл), а низкая доза составляла 1,2E+08 ifu/мл. (6E+06 ifu в 50 мкл) в буфере A195. Контрольной группе производили интраназальное введение 50 мкл только буфера A195. На День 7, День 14, День 21 или День 28 после введения вакцины у 10 животных на группу производили забор сыворотки, бронхоальвеолярных лаважей (BAL) и тканей, в том числе легких, медиастинальных лимфатических узлов и селезенок, в соответствии с представленной ниже таблицей. Иммунологические данные включали результаты измерения ответов с выработкой IgG, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в сыворотке и BAL, IgA, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в BAL, нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке и результаты подсчета иммунных клеток в легких, лимфатических узлах, образцах BAL и селезенках в различные моменты времени. Данные параметры подытожены в **таблице 20**.

Таблица 20

Вакцина/ контроль	**Интраназальная доза**	**Количество животных на группу**	**Иммунизация**	**Сбор образцов (10 животных на момент времени)**
Ad5 c RBD	3,35E+08 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 28
Ad5 c RBD	6E+07 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 28
Ad5 c RBD	6E+06 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 28

Ad5 с RBD	3,35E+08 ifu в 50 мкл	20	День 0 и 14	День 21, 28
Буфер A195	50 мкл	10	День 0	День 7

[00441] Количественное определение IgG и IgA к спайк-домену SARS-CoV-2 проводили в образцах сыворотки или BAL, полученных от иммунизированных животных, с применением набора микроносителей для цитометрии, конъюгированных с рекомбинантным спайк-белком с эктодоменом SARS-CoV-2. Для получения рекомбинантного S-белка с эктодоменом SARS-CoV-2 создавали две оптимизированных по кодонам конструкции с линейным порядком кодирования последовательностей: лидерная последовательность человеческого IgG, эктодомен S-белка SARS-CoV-2 (аминокислоты 14-1211), линкер GGSG, последовательность фолдона фибритина T4, линкер GS и, наконец, авидиновая метка, т. е. AviTag (конструкция 1), или гистидиновая метка, т. е. 6X-HisTag (конструкция 2). Каждая конструкция была сконструирована с двумя наборами мутаций для стабилизации белка в конформации до слияния. К данным мутациям относились замена RRAR>SGAG (остатки 682-685, как описано у Walls et al 2020) в сайте расщепления S1/S2 и введение двух остатков пролина; K983P, V984P, как описано у Walls et al 2020 и Wrapp et al 2020. Тримеры с Avi/His-метками получали путем совместной трансфекции плазмидными конструкциями 1 и 2 (в соотношении 1:2) клеток линии FreeStyle 293-F. Клетки выращивали в течение трех суток и посредством центрифугирования отделяли надосадочную жидкость (среду). Рекомбинантные S-тримеры очищали из среды с помощью FPLC с применением колонки HisTrap HP Column (GE) и элюировали посредством 250 мМ имидазола. После замены либо на 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0, либо на 50 мМ бицин, pH 8,3, очищенные тримеры спайк-эктодомена биотинилировали путем добавления биотин-протеинлигазы (Avidity, Орора, Колорадо). Биотинилированные тримеры спайк-эктодомена посредством буферного обмена переносили в PBS, подвергали стерилизации фильтрацией, разделяли на аликвоты, затем хранили при -80ºC до последующего использования. После аффинной очистки His-меченного белка и ферментативного биотинилирования полученные рекомбинантные тримеры SARS-CoV-2 оставляли пассивно абсорбироваться на функционализированных стрептавидином флуоресцентных микрочастицах (Spherotech 3,6 мкм, кат. № CPAK-3567-4K, пик 4). 500 мкг биотинилированного SARS2-CoV-2 инкубировали с 2x1e7 функционализированных стрептавидином флуоресцентных микрочастиц в 400 мкл PBS с 1% BSA. После связывания микроносители, конъюгированные со спайк-доменом SARS-CoV-2, дважды промывали в 1 мл 1% BSA, PBS, 0,05% NaN3 перед окончательным

ресуспендированием до концентрации 1×10^8 микроносителей/мл. Связанные с SARS-CoV-2 микроносители хранили при 4°C. Содержание рекомбинантного спайк-домена SARS2-CoV-2 на микроносителях оценивали путем окрашивания 1×10^5 микроносителей рекомбинантным антителом CR3022 к спайк-домену SARS в нескольких разведениях в диапазоне от 1 мкг до 2 нг/мл и визуализировали с помощью вторичного антитела к IgG человека. Стандарты IgG и IgA получали путем ковалентного связывания специфичных к изотипу поликлональных антител с флуоресцентными частицами. Вкратце: 0,2 мг козьих поликлональных антител к мышиным IgG (Southern Biotech, кат. № 1013-01), к мышиным IgM (кат. № 1022-01) и к мышиным IgA (кат. № 1040-01) в PBS смешивали с 5x1e7 флуоресцентных микрочастиц, каждая из которых имела уникальную интенсивность флуоресценции в каналах дальнего красного спектра (Spherotech 3,6 мкм, кат. № CPAK-3567-4K, пики 1-3), ресуспендировали в 0,1 М буфере MES, pH 5,0. Добавляли равный объем EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида), 10 мг/мл, в 0,1 М буфере MES (2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты), pH 5,0, и смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Микроносители дважды промывали путем осаждения после центрифугирования и последующего ресуспендирования в PBS. После промывания микроносители ресуспендировали в 1% BSA, PBS с 0,005% NaN_3 в качестве консерванта. Образцы BAL, разведенные 1/4-8, или образцы сыворотки разводили до 1/1000-5000 в 50 мкл PBS и переносили в 96-луночные полистироловые планшеты с u-образным дном вместе с 50 мкл стандартов, состоящих из мышиных IgG, IgM или IgA в диапазоне концентраций от 1 мкг/мл до 2 нг/мл в 0,75x разведениях (Southern Biotech, IgM: кат. № 0106-01, IgG: кат. № 0107-01, IgA, кат. № 0106-01). К разведенным образцам добавляли 5 мкл суспензии, содержащей 5x1e5 каждого из микроносителей со спайк-доменом SARS-CoV-2, антителами к IgM, к IgA и к IgG. Суспензии перемешивали пипетированием и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Микроносители промывали добавлением 200 мкл PBS и центрифугированием при 3000 g в течение 5 минут при комнатной температуре. Частицы CBA ресуспендировали во вторичном окрашивающем растворе, состоящем из поликлонального антитела 488 к IgG (Southern Biotech, кат. № 1010-30) и конъюгированного с PE козьего поликлонального антитела либо к IgM (Southern Biotech кат. № 1020-09), либо к IgA. (Southern Biotech, кат. № 1040-09), разведенного 1/400 в 1% BSA в PBS. Суспензию инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре. Микроносители промывали добавлением 200 мкл PBS и осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 5 минут при комнатной температуре. Частицы ресуспендировали в 75 мкл PBS и сразу анализировали на проточном цитометре BD Cytoflex в

режиме планшета при скорости отбора образцов 100 мкл в минуту. Забор образцов останавливали после сбора 75 мкл. После сбора полученные файлы FCS анализировали в FlowJo (Treestar). Вкратце: микроносители идентифицировали путем гейтирования синглетных 3,6 мкм частиц по логарифмической шкале параметров прямого и бокового рассеяния. Гейты флуоресценции в канале APC-Cy7 использовали для сегрегации частиц по типу микроносителя. В каналах PE и 488 рассчитывали среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции. Строили кривые мощности наилучшего соответствия для микроносителей, захватывающих Ig, с использованием известной концентрации стандартов на планшете для каждого отдельного планшета. Данную формулу применяли к MFI частиц со спайк-доменом SARS-COV-2 для всех образцов соответствующего анализа, преобразовывая MFI в нг/мл или мкг/мл. Данные рассчитанные значения корректировали с учетом фактора разведения.

[00442] Для количественной оценки титра нейтрализующих антител против изолята USA-WA1/2020 вируса SARS-CoV-2 использовали реакцию нейтрализации с уменьшением фокусов (FNRT). Клетки Vero E6 выращивали на 96-луночных планшетах до состояния конфлюентности. В день фазы инфицирования анализа производили серийные разведения (1:20-1:2560) антисыворотки, объединяли и инкубировали с равным объемом исходного раствора вирусов в указанном разведении в течение 30 минут при RT, так чтобы конечные разведения антисыворотки находились в диапазоне (1:40-1:5120). Исходный раствор вирусов разводили из концентрированного рабочего исходного раствора для получения приблизительно 30 вирусных фокальных единиц на лунку. После инкубации в лунки (100 мкл) добавляли смеси сыворотка:вирус и оставляли для протекания инфицирования на 1 час на клетках Vero при 35°C. По завершении 1-часовой инкубации вязкий слой среды MEM Игла с 4% FBS и антибиотиками и 1,2% Avicell добавляли к смеси сыворотка:вирус на монослоях клеток таким образом, чтобы конечный объем составлял 200 мкл на лунку. Оставляли для протекания инфицирования на 24 часа. На следующий день содержимое каждого планшета фиксировали, погружая весь планшет и его содержимое в 10% формалин/PBS на 24 часа. Обнаружение уменьшения количества вирусных фокусов проводили на фиксированных 96-луночных планшетах. Вкратце: планшеты промывали посредством H_2O и вносили в лунки смесь метанол:перекись водорода на 30 минут при встряхивании для гашения активности эндогенной пероксидазы. После гашения планшеты промывали посредством H_2O для удаления метанола и в лунки добавляли 5% Blotto в качестве блокирующего раствора на 1 час. Для обнаружения первичных антител к 5% Blotto добавляли антитело к спайк-домену/RBD SARS-

CoV-2 (кроличье поликлональное антитело, SinoBiologicals, кат. № 40592-T62) и инкубировали на монослоях в течение ночи. Планшеты 5 раз промывали посредством PBS и дополнительно инкубировали с вторичным конъюгированным с пероксидазой хрена антителом козы к IgG кролика (Boster Biological Technology Co., № BA1054-0.5) в 5% Blotto в течение 1 часа. Планшеты один раз промывали посредством 0,05% Tween в 1× PBS с последующими 5 промываниями в 1× PBS. Для обнаружения пероксидазной активности использовали набор для обнаружения Impact DAB (Vector Labs, № SK-4105) в соответствии с инструкциями производителя. Коричневые фокусы подсчитывали вручную с отсканированного изображения каждой лунки, регистрировали и определяли уменьшение количества фокусов по сравнению с эквивалентными контрольными сыворотками от не подвергавшихся воздействию мышей. Также с помощью аппроксимации кривой 4PL рассчитывали титры $FRNT_{50}$.

[00443] Анализ клеток в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) методом проточной цитометрии проводили следующим образом. Присутствующие в BAL клетки получали путем центрифугирования жидкостей BAL при 700 × g в течение 5 минут при 4°C. Клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера для лизиса эритроцитов [буфер ACK (10 мМ $KHCO_3$, pH 7,2-7,4, 150 мМ NH_4Cl и 0,1 мМ EDTA)]. Спустя 1 минуту добавляли 2 мл среды для окрашивания (PBS + 2% фетальной бычьей сыворотки) с 2 мМ EDTA. Данную среду называли SME. Затем образец фильтровали, пропуская его через фильтрующую мембрану Nitex® Nylon с диаметром пор 70 мкм в чистую 15-мл коническую пробирку. После центрифугирования при 700 × g в течение 5 минут при 4°C клетки ресуспендировали в 225 мкл SME. Затем 25 мкл каждого образца переносили в 96-луночный планшет для подсчета клеток методом проточной цитометрии с использованием 10-мкм микросфер Fluoresbrite Carboxylate YG. Остальные клетки переносили в отдельный 96-луночный планшет с V-образным дном для окрашивания антителами для анализа методом проточной цитометрии. Образцы клеток из BAL инкубировали в течение 10 минут при 4°C в темноте с блокирующим реагентом Fc-Block (разведение 1:1000), а затем окрашивали следующей панелью для окрашивания BAL: автофлуоресценция (пустой канал FITC), Ly6G-PE (клон 1A8; разведение 1:200), CD64-PerCP-Cy5.5 (клон X54-5/7.1; разведение 1:150), CD8a-APC (клон 53-6.7; разведение 1:200), CD11c-PE-Cy7 (клон N418; разведение 1:200), CD19-APC-Fire750 (клон 6D5; разведение 1:200), CD4-eFluor450 (клон GK1.5; разведение 1:200) и Aqua LIVE/DEAD (разведение 1:1000). После инкубации со смесью антител (общий объем 50 мкл) в течение 20 минут при 4°C в темноте клетки промывали посредством 200 мкл SME. Затем клетки ресуспендировали в 200 мкл 10% формалина перед анализом на FACSCanto II в пределах 2 суток.

[00444] Анализ медиастинального лимфатического узла методом проточной цитометрии проводили следующим образом. Собирали медиастинальные лимфатические узлы (mLN) и помещали их в отдельные лунки 24-луночного планшета, содержащего 1 мл среды для окрашивания (PBS + 2% фетальной бычьей сыворотки) с добавлением 2 мМ EDTA. Данную среду называли SME. mLN осторожно измельчали и раздавливали, протирая между двумя предметными стеклами микроскопа, затем промывали посредством 1 мл SME перед переносом в 15-мл коническую пробирку. Объем доводили до 10 мл с помощью SME. Затем суспензию клеток фильтровали, пропуская ее через фильтрующую мембрану Nitex® Nylon с диаметром пор 70 мкм в чистую 15-мл коническую пробирку перед промывкой фильтрующей мембраны дополнительными 2 мл SME. После центрифугирования на 1800 об./мин при 4°C в течение 5 минут клетки ресуспендировали в 1 мл SME. 50 мкл каждого образца переносили в 96-луночный планшет для подсчета клеток методом проточной цитометрии с использованием 10-мкм микросфер Fluoresbrite Carboxylate YG. 200-250 мкл каждого образца переносили в 3 отдельных 96-луночных планшета с V-образным дном для окрашивания антителами для анализа методом проточной цитометрии. Ткань mLN окрашивали с помощью 3 различных панелей для проточной цитометрии. Образцы mLN инкубировали в течение 10 минут при 4°C в темноте с блокирующим реагентом Fc-Block (разведение 1:1000), промывали посредством 200 мкл SME, а затем окрашивали 3 представленными далее панелями. Миелоидная панель состояла из B220/CD45R-FITC (клон RA3-6B2; разведение 1:200), Ly6G-PE (клон 1A8; разведение 1:200), CD64-PerCP-Cy5.5 (клон X54-5/7.1; разведение 1:150), CD11b-APC (клон M1/70; разведение 1:200), CD11c-PE-Cy7 (клон N418; разведение 1:300), Ly6C-APC-Cy7 (клон AL-21; разведение 1:200), MHCII-PB (клон M5/114.15.4; разведение 1:600), CD3-BV510 (клон 17A2; разведение 1:200), CD19-BV510 (клон HIB19; разведение 1:200) и Aqua LIVE/DEAD (разведение 1:1000). В случае данного окрашивания миелоидной панелью клетки инкубировали со смесью антител (общий объем 50 мкл) в течение 20 минут при 4°C в темноте. Затем клетки промывали посредством 200 мкл SME и ресуспендировали в 200 мкл 10% формалина (фиксатор) перед анализом на FACSCanto II в пределах 2 суток. Т-клеточная панель состояла из CXCR5/CD185-FITC (клон J252D4; разведение 1:50), PD1/CD279-PE (клон J43; разведение 1:200), CD8a-PerCP-Cy5.5 (клон 53-6.7; разведение 1:200), CD25-PE-Cy7 (клон PC61; разведение 1:300), CD4-AF647 (клон GK1.5; разведение 1:200), CD3-APC-eFluor780 (клон 17A2; разведение 1:200), NK1.1-eFlour450 (клон PK136; разведение 1:200) и Aqua LIVE/DEAD (разведение 1:1000). В случае окрашивания Т-клеточной панелью клетки инкубировали только с антителом к CXCR5-FITC (общий объем 30 мкл; разведение 1:50) в

течение 30 минут при 4°C в темноте, а затем промывали посредством 200 мкл SME. Затем клетки инкубировали с остальной смесью антител (общий объем 50 мкл) в течение 15 минут при 4°C в темноте, а затем промывали посредством 200 мкл SME. Клетки ресуспендировали в 200 мкл 10% формалина (фиксатор) перед анализом на FACSCanto II в пределах 2 суток. B-клеточная панель состояла из CD95/FAS-FITC (клон Jo2; разведение 1:200), SPIKE (Covid-19)-PE (разведение 1:50), 7-AAD (разведение 1:1000), F4/80-PerCP-Cy5.5 (клон BM8; разведение 1:200), CD3-PerCP-Cy5.5 (клон 17A2; разведение 1:200), SPIKE (Covid-19)-APC (разведение 1:50) CD38-PE-Cy7 (клон 90; разведение 1:400), CD19-APC-Fire750 (клон 6D5; разведение 1:200), CD138-BV421 (клон 281-2; разведение 1:200) и IgD-BV510 (клон 11-26c.2a; разведение 1:500). В случае окрашивания B-клеточной панелью клетки инкубировали со смесью антител (общий объем 50 мкл) в течение 20 минут при 4°C в темноте, а затем промывали посредством 200 мкл SME. Клетки ресуспендировали в 200 мкл SME (без фиксатора) и немедленно анализировали на FACSCanto II.

[00445] Анализ легочных тканей методом проточной цитометрии проводили следующим образом. Иссеченные легкие нарезали на очень маленькие кусочки с помощью ножниц перед добавлением коллагеназы/ДНКазы. После инкубации при 37°C в течение 30 минут гомогенаты легких разводили посредством 1 мл SME. Расщепленные ткани осторожно измельчали и раздавливали, используя плоский конец поршня шприца, на сетчатом фильтре перед промывкой посредством 10-15 мл SME. После центрифугирования на 1800 об./мин и при 4°C в течение 5 минут осадки ресуспендировали в 3 мл буфера для лизиса эритроцитов [буфер ACK (10 мМ $KHCO_3$, pH 7,2-7,4, 150 мМ NH_4Cl и 0,1 мМ EDTA)]. После инкубации при комнатной температуре в течение 5 минут образцы разводили 1:2 путем добавления 3 мл SME для инактивации буфера для лизиса. Отфильтровывали клетки путем пропускания каждого лизата через фильтрующую мембрану Nitex® Nylon в чистую 50-мл коническую пробирку. После промывания дополнительными 5-10 мл SME клетки центрифугировали перед ресуспендированием осадка клеток в 1 мл SME. 50 мкл каждого образца помещали в 96-луночный планшет для подсчета клеток методом проточной цитометрии с использованием 10-мкм микросфер Fluoresbrite Carboxylate YG. 200 мкл каждого образца помещали в 3 отдельных 96-луночных планшета с V-образным дном для окрашивания антителами для анализа методом проточной цитометрии. Образцы инкубировали в течение 10 минут при 4°C в темноте с блокирующим реагентом Fc-Block (разведение 1:1000), а затем промывали посредством 200 мкл SME перед окрашиванием теми же 3 панелями, которые были использованы для лимфатических узлов.

[00446] Анализ спленоцитов методом проточной цитометрии проводили следующим образом. Селезенку переносили в фильтр для клеток с размером поры 70 мкм, установленный на 50-мл конической пробирке, и осторожно измельчали и раздавливали, используя плоский конец поршня шприца, перед промывкой фильтра посредством 10-15 мл SME. После центрифугирования на 1800 об./мин и при 4°C в течение 5 минут осадки ресуспендировали в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов [буфер ACK (10 мМ $KHCO_3$, pH 7,2-7,4, 150 мМ NH_4Cl и 0,1 мМ EDTA)]. После инкубации при комнатной температуре в течение 5 минут к каждому лизату добавляли 20 мл SME для разведения буфера ACK. Затем отфильтровывали клетки путем пропускания их через фильтрующую мембрану Nitex® Nylon с размером пор 70 мкм. Отфильтрованные клетки промывали дополнительными 5 мл SME. После центрифугирования осадки клеток ресуспендировали в 20 мл SME. 50 мкл каждого образца помещали в 96-луночный планшет для подсчета клеток методом проточной цитометрии с использованием 10-мкм микросфер Fluoresbrite Carboxylate YG. 200 мкл каждого образца помещали в 3 отдельных 96-луночных планшета с V-образным дном для окрашивания антителами для анализа методом проточной цитометрии. Образцы инкубировали в течение 10 минут при 4°C в темноте с блокирующим реагентом Fc-Block (разведение 1:1000), а затем промывали посредством 200 мкл SME перед окрашиванием теми же 3 панелями, которые были использованы для лимфатических узлов.

[00447] После однократного интраназального введения было продемонстрировано, что вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен RBD спайк-белка (**SEQ ID NO: 15**), стимулировал выработку антител IgG в сыворотке крови, что указывало на индукцию системных ответов, а также стимулировал выработку антител IgG и IgA в бронхоальвеолярных лаважах, что указывало на индукцию ответов слизистых оболочек, как видно на **фиг. 71A-71C**. Дозозависимый ответ наблюдали по различным маркерам антител, при этом высокая доза вакцины приводила к наивысшим ответам, а низкая доза приводила к незначительному иммунному ответу, тогда как средняя доза вызывала промежуточный ответ. Следует отметить, что на День 14 и День 28 при введении однократной высокой дозы вакцины спайк-специфичный ответ с выработкой IgG в сыворотке достигал очень высокого уровня, превышающего 1 миллиграмм на мл, что составляло приблизительно 5% от общего сывороточного IgG. После интраназального бустирования на День 14 тем же вектором выработка IgA в BAL значимо увеличивалась по сравнению с ответом, индуцированным однократной дозой вакцины для индукции ответа с выработкой IgG на День 21 и День 28, при этом влияние на ответы с выработкой IgG было ограниченным.

[00448] У всех десяти протестированных животных (100%) из группы, получавшей однократное введение высокой дозы вакцины, наблюдали наличие нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, что измеряли с помощью реакции нейтрализации с уменьшением фокусов (FRNT) (**фиг. 72A-72J**), при этом лишь у трех из пяти животных (60%) наблюдали значимый нейтрализующий ответ в группе, получившей однократное введение средней дозы вакцины (**фиг. 73A-73E**).

[00449] Интраназальное введение вакцины индуцировало рекрутинг и/или пролиферацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета в различных иммунных компартментах. На **фиг. 74A-74L**, **75A-75E**, **76A-76J** и **77A-L** представлены изменения количества иммунных клеток соответственно в легком, BAL, медиастинальных лимфатических узлах и селезенке после однократного интраназального введения высокой дозы вакцины. Важно отметить, что повышение количества CD19 клеток, B-клеток памяти, B-клеток из зародышевого центра (GC) и/или фолликулярных T-хелперов (hf), наблюдаемое в легких, BAL и лимфатических узлах и, в меньшей степени, в селезенке, свидетельствовало о способности вакцины стимулировать длительно сохраняющийся гуморальный ответ с образованием антител и ответ слизистых оболочек с образованием антител. Кроме того, повышение количества макрофагов, дендритных клеток, CD4+ и/или CD8+ T-клеток, наблюдаемое в легких, BAL и лимфатических узлах и, в меньшей степени, в селезенке, свидетельствовало о способности вакцины стимулировать врожденные и клеточные иммунные ответы слизистых оболочек, а также системные врожденные и клеточные иммунные ответы, которые, согласно ожиданиям, будут давать полезный эффект в контексте инфекции SARS-CoV-2. Результаты, полученные с более низкими дозами вакцины, не были представлены, поскольку они демонстрировали аналогичную тенденцию, но на более низком уровне.

[00450] **Пример 14. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен S1, у C57BL/6 мышей**

[00451] Вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен S1 из спайк-антигена SARS-CoV-2 (**SEQ ID NO: 13**), вводили интраназально C57BL/6 мышам для оценки индукции системного иммунитета и иммунитета слизистых оболочек против SARS-CoV-2. C57BL/6 мышам производили одно или два интраназальных введения вектора на основе Ad5 в трех разных дозах в объеме 50 мкл, как указано в **таблице 19**. Высокая доза составляла 1,2E+09 ifu/мл (6E+08 ifu в 50 мкл), средняя доза составляла 1,2E+09 ifu/мл (6E+07 ifu в 50 мкл), а низкая доза составляла 1,2E+08 ifu/мл. (6E+06 ifu в 50 мкл) в буфере A195.

Контрольной группе производили интраназальное введение 50 мкл только буфера A195. На День 7, День 14, День 21 или День 28 после введения вакцины у 10 животных на группу производили забор сыворотки, бронхоальвеолярных лаважей (BAL) и тканей, в том числе легких, медиастинальных лимфатических узлов и селезенок, в соответствии с представленной ниже таблицей. Иммунологические данные включали результаты измерения ответов с выработкой IgG, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в сыворотке и BAL, IgA, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в BAL, нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке и результаты подсчета иммунных клеток в легких, лимфатических узлах, образцах BAL и селезенках в различные моменты времени. Данные параметры подытожены в **таблице 21**.

Таблица 21

Вакцина/контроль	**Интраназальная доза**	**Количество животных на группу**	**Иммунизация**	**Сбор образцов (10 животных на момент времени)**
Ad5 с S1	6E+08 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 28
Ad5 с S1	6E+07 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 28
Ad5 с S1	6E+06 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 28
Ad5 с S1	6E+08 ifu в 50 мкл	20	День 0 и 14	День 21, 28
Буфер A195	50 мкл	10	День 0	День 7

[00452] Способы количественной оценки IgG и IgA к спайк-домену SARS-CoV-2 в образцах сыворотки или BAL, реакции нейтрализации с уменьшением фокусов, а также анализ методом проточной цитометрии клеток бронхоальвеолярного лаважа (BAL), медиастинальных лимфатических узлов, легочных тканей и спленоцитов описаны в примере 13B.

[00453] После однократного интраназального введения было продемонстрировано, что вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен S1 спайк-белка (**SEQ ID NO: 13**), стимулировал выработку антител IgG в сыворотке крови, что указывало на индукцию системных ответов, а также стимулировал выработку антител IgG и IgA в бронхоальвеолярных лаважах, что указывало на индукцию ответов слизистых оболочек, как видно на **фиг. 78A-78C**. Дозозависимый ответ наблюдали по различным маркерам антител, при этом высокая доза

вакцины приводила к наивысшим ответам, а низкая доза приводила к незначительному иммунному ответу, тогда как средняя доза вызывала промежуточный ответ. В целом, ответы с выработкой IgG в сыворотке и BAL были ниже с вектором с S1 по сравнению с результатами, полученными с вектором с RBD, которые представлены в примере 13B. После интраназального бустирования на День 14 тем же вектором выработка IgA в BAL значимо увеличивалась по сравнению с ответом, индуцированным однократной дозой вакцины для индукции ответа с выработкой IgG на День 21 и День 28, при этом влияние на ответы с выработкой IgG было ограниченным.

[00454] У трех из пяти протестированных животных из группы, получавшей однократное введение высокой дозы вакцины, наблюдали значимую индукцию выработки нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, что измеряли с помощью реакции нейтрализации с уменьшением фокусов (FRNT) (**фиг. 79A-79E**). В группе, получавшей однократную среднюю дозу, у двух из пяти животных (**фиг. 80B** и **D**) наблюдали низкий нейтрализующий ответ (**фиг. 80A-80E**).

[00455] Интраназальное введение вакцины индуцировало рекрутинг и/или пролиферацию клеток врожденного и адаптивного иммунитета в различных иммунных компартментах. На **фиг. 81A-81L**, **82A-82E**, **83A-83J** и **84A-L** представлены изменения количества иммунных клеток соответственно в легком, BAL, медиастинальных лимфатических узлах и селезенке после однократного интраназального введения высокой дозы вакцины. Важно отметить, что повышение количества CD19 клеток, B-клеток памяти, B-клеток из зародышевого центра (GC) и/или фолликулярных T-хелперов (hf), наблюдаемое в легких, BAL и лимфатических узлах и, в меньшей степени, в селезенке, свидетельствовало о способности вакцины стимулировать длительно сохраняющийся гуморальный ответ с образованием антител и ответ слизистых оболочек с образованием антител. Кроме того, повышение количества макрофагов, дендритных клеток, CD4+ и/или CD8+ T-клеток, наблюдаемое в легких, BAL и лимфатических узлах и, в меньшей степени, в селезенке, свидетельствовало о способности вакцины стимулировать врожденные и клеточные иммунные ответы слизистых оболочек, а также системные врожденные и клеточные иммунные ответы, которые, согласно ожиданиям, будут давать полезный эффект в контексте инфекции SARS-CoV-2. Результаты, полученные с более низкими дозами вакцины, не были представлены, поскольку они демонстрировали аналогичную тенденцию, но на более низком уровне.

[00456] Пример 15. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен RBD, у CD-1 мышей

[00457] Вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен RBD из спайк-антигена SARS-CoV-2 (**SEQ ID NO: 15**), вводили интраназально CD-1 мышам для оценки индукции системного иммунитета и иммунитета слизистых оболочек против SARS-CoV-2. CD-1 мышам производили одно или два интраназальных введения вектора на основе Ad5 в трех разных дозах в объеме 50 мкл. Высокая доза составляла 6,7E+09 ifu/мл (3,35E+08 ifu в 50 мкл), средняя доза составляла 1,2E+09 ifu/мл (6E+07 ifu в 50 мкл), а низкая доза составляла 1,2E+08 ifu/мл. (6E+06 ifu в 50 мкл) в буфере A195. Контрольной группе производили интраназальное введение 50 мкл только буфера A195. На День 7, День 14 и/или День 21 после введения вакцины у 10 животных на группу производили забор сыворотки и бронхоальвеолярных лаважей (BAL) в соответствии с **таблицей 22**. Иммунологические данные включали результаты измерения ответов с выработкой IgG, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в сыворотке и BAL, IgA, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в BAL и нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке. Данные параметры подытожены в **таблице 22**.

Таблица 22

Вакцина/ контроль	**Интраназальная доза**	**Количество животных на группу**	**Иммунизация**	**Сбор образцов (10 животных на момент времени)**
Ad5 с RBD	3,35E+08 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 21
Ad5 с RBD	6E+07 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 21
Ad5 с RBD	6E+06 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 21
Ad5 с RBD	3,35E+08 ifu в 50 мкл	20	День 0 и 14	День 21
Буфер A195	50 мкл	10	День 0	День 7

[00458] Способы количественной оценки IgG и IgA к спайк-домену SARS-CoV-2 в образцах сыворотки или BAL и реакции нейтрализации с уменьшением фокусов описаны в примере 13B.

[00459] После однократного интраназального введения было продемонстрировано, что вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен RBD или S1 спайк-белка (**SEQ ID NO: 15**), стимулировал выработку антител IgG в сыворотке крови, что указывало на индукцию системных ответов, а также стимулировал выработку антител IgG и IgA в

бронхоальвеолярных лаважах, что указывало на индукцию ответов слизистых оболочек, как видно на **фиг. 85A-85C**. Дозозависимый ответ наблюдали по различным маркерам антител, при этом высокая доза вакцины приводила к наивысшим ответам, а низкая доза приводила к незначительному иммунному ответу, тогда как средняя доза вызывала промежуточный ответ. После интраназального бустирования на День 14 тем же вектором влияние на ответы с выработкой IgG и IgA было ограниченным по сравнению с однократным введением той же дозы.

[00460] У восьми из 10 протестированных животных (**фиг. 92A, 92C-92E** и **92G-92J**) из группы, получавшей однократное введение высокой дозы вакцины, наблюдали значимую индукцию выработки нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, что измеряли с помощью реакции нейтрализации с уменьшением фокусов (FRNT) (**фиг. 92A-92J**).

[00461] **Пример 16. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен S1, у CD-1 мышей**

[00462] Вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен S1 из спайк-антигена SARS-CoV-2 (**SEQ ID NO: 13**), вводили интраназально CD-1 мышам для оценки индукции системного иммунитета и иммунитета слизистых оболочек против SARS-CoV-2. CD-1 мышам производили однократное интраназальное введение вектора на основе Ad5 в трех разных дозах в объеме 50 мкл. Высокая доза составляла 6,7E+09 ifu/мл (3,35E+08 ifu в 50 мкл), средняя доза составляла 1,2E+09 ifu/мл (6E+07 ifu в 50 мкл), а низкая доза составляла 1,2E+08 ifu/мл. (6E+06 ifu в 50 мкл) в буфере A195. Контрольной группе производили интраназальное введение 50 мкл только буфера A195. На День 7, День 14 и День 21 после введения вакцины у 10 животных на группу производили забор сыворотки и бронхоальвеолярных лаважей (BAL) в соответствии с **таблицей 23**. Иммунологические данные включали результаты измерения ответов с выработкой IgG, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в сыворотке и BAL, IgA, специфичных к спайк-антигену SARS-CoV-2, в BAL, нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке. Данные параметры подытожены в **таблице 23**.

Таблица 23

Вакцина/ контроль	**Интраназальная доза**	**Количество животных на группу**	**Иммунизация**	**Сбор образцов (10 животных на момент времени)**
Ad5 c S1	3,35E+08 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 21
Ad5 c S1	6E+07 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 21
Ad5 c S1	6E+06 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 21
Буфер A195	50 мкл	10	День 0	День 7

[00463] Способы количественной оценки IgG и IgA к спайк-домену SARS-CoV-2 в образцах сыворотки или BAL и реакции нейтрализации с уменьшением фокусов описаны в примере 13B.
[00464] После однократного интраназального введения было продемонстрировано, что вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен S1 спайк-белка (**SEQ ID NO: 13**), стимулировал выработку антител IgG в сыворотке крови, что указывало на индукцию системных ответов, а также стимулировал выработку антител IgG и IgA в бронхоальвеолярных лаважах, что указывало на индукцию ответов слизистых оболочек, как видно на **фиг. 86A-86C**. Дозозависимый ответ наблюдали по различным маркерам антител, при этом высокая доза вакцины приводила к наивысшим ответам, а низкая доза и средняя доза приводили к незначительному иммунному ответу.

[00465] **Пример 17. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен RBD, у CD-1 мышей**

[00466] Вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен RBD из спайк-антигена SARS-CoV-2 (**SEQ ID NO: 15**), вводили интраназально CD-1 мышам для оценки индукции системного Т-клеточного иммунитета и Т-клеточного иммунитета слизистых оболочек против SARS-CoV-2. CD-1 мышам производили однократное интраназальное введение вектора на основе Ad5 в количестве 6,7E+09 ifu/мл (3,35E+08 ifu в 50 мкл) в буфере A195. Контрольной группе производили интраназальное введение 50 мкл только буфера A195. На День 10, День 14 и День 28 после введения вакцины забирали легкие и селезенки у 10 мышей в группе вакцины и 3 мышей из контрольной группы в соответствии с **таблицей 24**. Иммунологические показания включали результаты измерения ответов с участием CD4+ и CD8+ Т-клеток в легких и селезенках по результатам проточной цитометрии, результаты

измерения Т-клеточного ответа в легких и селезенках по результатам ELISpot-анализа с IFN-гамма, а также результаты измерения Т-клеточных цитокинов после *in vitro* повторной стимуляции посредством пептидов, производных от RBD.

Таблица 24

Вакцина/ контроль	**Интраназальная доза**	**Количество животных на группу**	**Иммунизация**	**Сбор образцов (10 животных на момент времени)**
Ad5 с RBD	3,35E+08 ifu в 50 мкл	30	День 0	День 7, 14, 28
Буфер A195	50 мкл	9	День 0	День 7, 14, 28

[00467] Анализ RBD-специфичных Т-клеточных ответов по результатам ELISpot с IFN-гамма в селезенках и легких выполняли следующим образом. Селезенки переносили в фильтр для клеток с размером поры 70 мкм, установленный на 50-мл конической пробирке, и осторожно измельчали и раздавливали, используя плоский конец поршня шприца, перед промывкой фильтра посредством 10-15 мл SME. После центрифугирования на 1800 об./мин и при 4°C в течение 5 минут осадки ресуспендировали в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов [буфер ACK (10 мМ $KHCO_3$, pH 7,2-7,4, 150 мМ NH_4Cl и 0,1 мМ EDTA)]. После инкубации при комнатной температуре в течение 5 минут к каждому лизату добавляли 20 мл SME для разведения буфера ACK. Затем отфильтровывали клетки путем пропускания через фильтрующую мембрану Nitex® Nylon с размером пор 70 мкм. Отфильтрованные клетки промывали дополнительными 5 мл SME. После центрифугирования осадки клеток ресуспендировали в 20 мл SME. 50 мкл каждого образца помещали в 96-луночный планшет для подсчета клеток методом проточной цитометрии с использованием 10-мкм микросфер Fluoresbrite Carboxylate YG.

[00468] Иссеченные легкие нарезали на очень маленькие кусочки с помощью ножниц перед добавлением коллагеназы/ДНКазы. После инкубации при 37°C в течение 30 минут гомогенаты легких разводили посредством 1 мл SME. Расщепленные ткани осторожно измельчали и раздавливали, используя плоский конец поршня шприца, на сетчатом фильтре перед промывкой посредством 10-15 мл SME. После центрифугирования на 1800 об./мин и при 4°C в течение 5 минут осадки ресуспендировали в 3 мл буфера для лизиса эритроцитов [буфер ACK (10 мМ $KHCO_3$, pH 7,2-7,4, 150 мМ NH_4Cl и 0,1 мМ EDTA)]. После инкубации при комнатной температуре в течение 5 минут образцы разводили 1:2 путем добавления 3 мл SME для

инактивации буфера для лизиса. Отфильтровывали клетки путем пропускания через фильтрующую мембрану Nitex® Nylon в чистую 50-мл коническую пробирку. После промывания дополнительными 5-10 мл SME клетки центрифугировали перед ресуспендированием осадка клеток в 1 мл SME. 50 мкл каждого образца помещали в 96-луночный планшет для подсчета клеток методом проточной цитометрии с использованием 10-мкм микросфер Fluoresbrite Carboxylate YG.

[00469] Для анализа Т-клеточных ответов компанией JPT (JPT Peptide technologies, Берлин, Германия) был разработан и синтезирован пул из 53 пептидов, полученных в результате пептидного сканирования по RBD спайк-гликопротеина из SARS-CoV-2 (319-541). Пептиды были разработаны с длиной 15 аминокислот и частичным совпадением по 11 аминокислотам. Перед использованием содержимое каждого флакона, содержащего 15 нмоль (приблизительно 25 мкг) каждого пептида на флакон, ресуспендировали в 50 мкл DMSO перед разведением в полной культуральной среде.

[00470] Суспензии клеток селезенки и легких (150000 клеток/лунка) помещали в отдельные лунки планшетов для ELIspot (Millipore-Sigma), в которые предварительно нанесли покрытие антител к IFN-γ (AN18 (5 мкг/мл)). Клетки стимулировали описанным выше пулом пептидов RBD в количестве от 0,5 до 2,0 мкг/пептид/мл. После 24-часовой стимуляции планшеты окрашивали биотинилированным антителом к IFN-γ (R4-6A2) с последующими стадиями промывки и инкубации со стрептавидином-ALP. Секретированный IFN-γ был обнаружен после инкубации с субстратом NBT/NCPI в течение 7-10 мин. Количество клеток, образующих пятно IFN-γ, подсчитывали вручную с цифровых изображений каждой лунки. Статистический анализ осуществляли в GraphPad Prism с использованием критерия Манна-Уитни.

[00471] Анализ ответов с участием CD4+ и CD8+ Т-клеток в легочных тканях и селезенках с помощью проточной цитометрии выполняли следующим образом. Суспензии отдельных клеток селезенки и легких стимулировали пулом пептидов RBD в течение 5 часов в присутствии брефельдина А (5 часов, концентрация 12,5 мкг/мл). Затем клетки инкубировали на льду с комбинацией антител, меченных флуоресцентным красителем, в том числе с антителом в CD4-V500 (клон GK1.5; разведение 1:200), антителом к CD8α-APC-Fire750 (клон 53-6,7; разведение 1:200), антителом к CD11a/CD18-Pacific Blue (H155-78; разведение 1:200), антителом к CD103-PE (M290; разведение 1:200), антителом к CD69-FITC (H1-2F3; разведение 1:200), антителом к Ly6G-PerCP-Cy5.5 (клон 1A8; разведение 1:200), антителом к CD64-PerCP-Cy5.5 (клон X54-5/7.1; разведение 1:200), антителом B220/CD45R-PerCP (клон RA3-6B2;

разведение 1:200) и Red LIVE/DEAD (разведение 1:1000). После окрашивания поверхности клетки пермеабилизировали с использованием набора BD Biosciences Cytofix/Cytoperm и окрашивали антителом к IFN-γ-PE-Cy7 (XMG1.2; разведение 1:200) и антителом к TNF-α-APC (MP6-XT22; разведение 1:200). После инкубации с антителами клетки промывали и ресуспендировали перед анализом на FACSCanto II в пределах 12 часов. Статистический анализ осуществляли в GraphPad Prism с использованием критерия Манна-Уитни.

[00472] Уровни белка IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A и TNFα в надосадочных жидкостях культур количественно оценивали с помощью набора специфической к мышиным белкам панели для множества аналитов Milliplex® MT17MAG-47K (Millipore; Sigma) и инструментальной платформы MagPix® с соответствующим программным обеспечением xPONENT® (Luminex Corporation). Показания анализировали с помощью стандартной версии программного обеспечения Milliplex® Analyst от EMD Millipore. Статистический анализ осуществляли в GraphPad Prism с использованием критерия Манна-Уитни.

[00473] После однократного интраназального введения было продемонстрировано, что вектор на основе репликационно-дефектного Ad5, экспрессирующий домен RBD спайк-белка (**SEQ ID NO: 15**), индуцировал значимое появление IFN-гамма-продуцирующих Т-клеток в легком и селезенке, как показано на **фиг. 88 A-D**. Высокая частота IFN-γ продуцирующих RBD-специфичных Т-клеток была обнаружена в легких на День 10 и День 14 после вакцинации, достигая среднего ответа 915 и 706 точек на миллион введенных клеток соответственно. См. **фиг. 88**. IFN-γ-продуцирующие RBD-специфичные Т-клетки также с помощью ELISpot были обнаружены в селезенке, хотя и с меньшей частотой по сравнению с легкими. Это позволяло предположить, что функциональные эффекторные Т-клетки, примированные в ответ на доставленные через слизистые оболочки антигены, могут мигрировать в периферические лимфоидные ткани. Кроме того, значительные уровни RBD-специфичных CD4+ и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих маркеры ранней активации хоуминга CD11a, IFN-гамма и/или TNF-альфа, также были обнаружены в легких (**фиг. 89 A-D**) и селезенке (**фиг. 90 A-D**). Экспрессия интегрина CD11a, которая активна только в недавно активированных Т-клетках и необходима для оптимальной сосудистой адгезии в ткани и удержания в дыхательных путях (Thatte J, Dabak V, Williams MB, Braciale TJ, Ley K. LFA-1 is required for retention of effector CD8 T cells in mouse lungs. Blood. 2003 Jun 15;101(12):4916-22.), подтверждала гипотезу, что данные клетки были недавно рекрутированы в легкое. Были обнаружены более высокие уровни Т-клеточных ответов в легком, и в них преобладали CD8+ Т-клетки. Интраназальный вектор с RBD также

индуцировал появление в легких высокого уровня резидентных для ткани CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти (TRM) (**фиг. 91 А и В**).

[00474] Для оценки того, могут ли Т-клетки, индуцированные вакциной, представлять собой резидентные Т-клетки памяти (Trm), экспрессию маркеров Trm CD103 и CD6 (Takamura S. Persistence in Temporary Lung Niches: A Survival Strategy of Lung-Resident Memory CD8+ T Cells. Viral Immunol. 2017 Jul/Aug;30(6):438-450. doi: 10.1089/vim.2017.0016.) оценивали на $CD4^+$ и $CD8^+$ клетках легких. Сопоставимо с интраназальным путем введения наблюдали индукцию легочных RDB-специфичных $CD4^+$ и $CD8^+$ Trm, экспрессирующих IFN-γ, TNF-α или оба цитокина (**фиг. 95**).

[00475] Из данных было видно, что интраназальное введение вакцины на основе вектора с RBD индуцировало Т-клетки, способные продуцировать цитокины IFN-γ и TNF-α, которые связаны со смещенным клеточным ответом с участием Th-1. Кроме того, наблюдали, что вакцина вызывала формирование высокой встречаемости антиген-специфичных $CD8^+$ Т-клеток, что обычно коррелирует с IFN-регулируемым Т-клеточным ответом, который важен для борьбы с вирусной инфекцией. Для дополнительной оценки потенциала продуцирования цитокинов Т-клетками от вакцинированных мышей производили повторную стимуляцию Т-клеток селезенки пептидами RBD в течение 48 часов, а затем использовали массивы микроносителей к цитокинам для измерения уровней цитокинов в надосадочной жидкости. Как и ожидалось, наблюдали индукцию выработки IFN-γ и TNF-α Т-клетками. Более того, было обнаружено, что Т-клетки от вакцинированных животных продуцировали умеренные уровни IL-10 по сравнению с Т-клетками от мышей, обработанных контрольной средой. Важно отметить, что уровни интерлейкина (IL)-4, IL-5, IL-13 и IL-17a в надосадочной жидкости, полученной от повторно простимулированных клеток от вакцинированных мышей, были эквивалентны уровням, наблюдаемым в культурах, содержащих простимулированные пептидом клетки от животных, обработанных контрольной средой (**фиг. 96**).

[00476] <u>Пример 18. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен RBD, у C57BL/6 мышей вызывало стойкие ответы с образованием антител</u>

[00477] Иммуногенность интраназального вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, кодирующего остатки 302-543 домена RBD (SEQ ID NO: 15) от SARS-Cov-2, оценивали на инбредных C57BL/6 мышах путем измерения ответов с выработкой специфичных к спайк-домену сывороточных IgG с течением времени. В День 0 до вакцинации и в Дни 15, 30, 63 и 120 после вакцинации (например, около через 2 недели, около через 1 месяц, около через 2

месяца и около через 4 месяца) производили забор сыворотки крови после однократной интраназальной вакцинации, как описано в **таблице 25**. Способы количественной оценки в сыворотке крови IgG к спайк-домену SARS-CoV-2 описан в примере 13B.

Таблица 25

Вакцина / контрольная среда	**Интраназальная доза**	**Количество животных на группу**	**Иммунизация**	**Сбор образцов**
AdtPAWHSRBD	3,78E+08 ifu в 30 мкл	20 C57BL/6	День 0	День 0 (до вакцинации), 15, 30, 63 и 120

[00478] Результаты представлены на **фиг. 97**, где пунктирной линией указан 30× исходный уровень. После обнаружения ответа с выработкой спайк-специфичных IgG, обнаруженного у всех 20 вакцинированных животных на День 15, ответы оставались стабильными до Дня 120 без статистической разницы в разные моменты времени после вакцинации согласно критерию знаковых рангов Уилкоксона для совпадающих пар. В данном примере продемонстрировано отсутствие значимого спада в сыворотке измеряемого уровня IgG к спайк-домену между Днем 30 и Днем 120 после вакцинации. В соответствии с вариантами осуществления в данном документе представлена вакцина или вектор с RBD, которые при введении в виде однократной интраназальной дозы млекопитающему индуцируют ответ с образованием антител к спайк-белку, который продолжается в течение по меньшей мере 4 месяцев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном документе представлена вакцина или вектор с RBD, которые при введении в виде однократной интраназальной дозы млекопитающему индуцируют иммунный ответ с образованием антител к спайк-белку, который продолжается (при отсутствии спада по результатам измерения около через 4 месяца) в течение по меньшей мере около 5 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 7 месяцев, по меньшей мере около 8 месяцев, по меньшей мере около 9 месяцев, по меньшей мере около 10 месяцев, по меньшей мере около 11 месяцев или по меньшей мере около 12 месяцев (один год).

[00479] Пример 19. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен RBD, у CD1 мышей вызывало появление долгоживующих антителосекретирующих клеток в костном мозге и легких

[00480] Иммуногенность интраназального вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, кодирующего остатки 302-543 домена RBD (**SEQ ID NO: 15**) от SARS-Cov-2, оценивали у аутбредных CD-1 мышей путем измерения в костном мозге (BM) и легком RBD-специфичных плазматических клеток (антителосекретирующих клеток; ASC), которые продуцируют спайк-специфичные IgG и IgA. На День 69 после вакцинации производили забор образцов костного мозга и легких после однократной интраназальной вакцинации, как описано в **таблице 26**.

Таблица 26

Вакцина / контрольная среда	**Интраназальная доза**	**Количество животных на группу**	**Иммунизация**	**Сбор образцов**
Вектор с RBD	3,78E+08 ifu в 30 мкл	5 CD-1	День 0	День 69

[00481] Обнаружение в костном мозге (BM) и легких RBD-специфичных ASC, которые продуцировали спайк-специфичные IgG и IgA, с помощью ELISPOT вкратце производили следующим образом. Из клеток костного мозга (2 большеберцовых кости + 2 бедренных кости/мышь) и легких, взятых у вакцинированных мышей, готовили суспензии отдельных клеток. Клетки серийно разводили в двух повторностях в полной среде и инкубировали в течение 5 часов при 37°C в планшетах для ELISPOT с целлюлозным фильтром MultiScreen (Millipore), в которые предварительно нанесли покрытие очищенного рекомбинантного белка RBD (Sino Biological). RBD-специфичные антитела, секретируемые плазматическими клетками, присутствующими в этих тканях, обнаруживали с применением конъюгированных с AP козьих Ab к IgG мыши (Jackson ImmunoResearch) или конъюгированных с AP козьих антител к IgA мыши (Jackson ImmunoResearch). Результаты ELISPOT визуализировали и подсчитывали с помощью анализатора S6 Ultra-V Analyzer (Cellular Technology Limited).

[00482] Результаты представлены на **фиг. 98**. RBD-специфичные ASC выявляли в костном мозгу у вакцинированных мышей на День 69. Поскольку эти ASC расположены в нише, которая, в частности, поддерживает долгосрочное выживание ASC, был сделан прогноз, что системные титры RBD-специфичных антител, образование которых было индуцировано

вектором с RBD, будут очень продолжительными. Более того, интраназальная вакцинация также приводила к формированию устойчивой популяции ASC в легких, которая включала IgA-продуцирующие ASC, которые могут обеспечивать защиту слизистых оболочек в месте будущего инфицирования. Известно, что инфекция респираторными вирусами также может вызывать появление долгоживущих ASC в легких, и что эти клетки важны для ранней защиты от повторного заражения. Следовательно, можно сделать разумное предположение, что присутствие этих индуцированных интраназальной вакциной ASC может также обеспечивать местную защиту для вакцинированных животных. В соответствии с вариантами осуществления в данном документе представлены композиции (например, вектор с RBD) и способы индукции формирования резидентных антителосекретирующих клеток памяти в костном мозге и легких. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в данном документе представлена вакцина или вектор с RBD, которые при введении в виде однократной интраназальной дозы млекопитающему индуцируют формирование резидентных антителосекретирующих клеток памяти в костном мозге и легких, которые секретируют как IgG, так и IgA к спайк-белку.

[00483] Пример 20. Интраназальное введение вектора на основе Ad5, экспрессирующего домен RBD, у C57BL/6 мышей вызывало развитие долгоживущей, RBD-специфической B-клеточной памяти

[00484] Иммуногенность интраназального вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, кодирующего остатки 302-543 домена RBD (**SEQ ID NO: 15**) от SARS-Cov-2, оценивали у инбредных C57BL/6 мышей путем измерения долгоживущей RBD-специфической B-клеточной памяти в медиастинальных лимфатических узлах и RBD-специфичных плазматических клеток (антителосекретирующих клеток; ASC) в костном мозге (BM). На День 168 после вакцинации (например, через 24 недели или 6 месяцев) производили забор образцов медиастинальных лимфатических узлов и костного мозга после однократной интраназальной вакцинации, как описано в **таблице 27**. В качестве отрицательных контролей использовали не подвергавшихся воздействию C57BL/6 мышей (n=5).

Таблица 27

Вакцина / контрольная среда	Интраназальная доза	Количество животных на группу	Иммунизация	Сбор образцов
Вектор с RBD	3,78E+08 ifu в 30 мкл	5 C57BL/6	День 0	День 168

[00485] Для анализа методом проточной цитометрии RBD-специфической В-клеточной памяти панель В-клеточных антител состояла из CD95/FAS-FITC (клон Jo2; разведение 1:200), SARS-CoV-2 RBD-PE (разведение 1:200), SARS-CoV-2 RBD-APC (разведение 1:200), 7-AAD (разведение 1:1000), CD3-PerCP-Cy5.5 (клон 17A2; разведение 1:200), CD38-PE-Cy7 (клон 90; разведение 1:400), CD19-APC-Fire750 (клон 6D5; разведение 1:200), CD138-BV421 (клон 281-2; разведение 1:200) и IgD-BV510 (клон 11-26c.2a; разведение 1:500). Клетки инкубировали со смесью антител (общий объем 50 мкл) в течение 20 минут при 4°C в темноте, а затем промывали посредством 200 мкл SME. Клетки ресуспендировали в 200 мкл SME (без фиксатора) и немедленно анализировали на FACSCanto II.

[00486] Результаты для RBD-специфичных В-клеток памяти представлены на фиг. 99. На фиг. 99B показано более высокое абсолютное количество RBD-специфичных В-клеток памяти, присутствующих в медиастинальных лимфатических узлах у вакцинированных животных, по сравнению с не подвергавшимися воздействию животными. Обнаружение присутствия антиген-специфичных В-клеток памяти через 168 суток после однократного интраназального введения вектора с RBD дает убедительное доказательство о долгоживущей природе RBD-специфичных В-клеток, формирование которых было индуцировано интраназальной вакциной. RBD-специфичные В-клетки памяти, присутствующие в медиастинальных лимфатических узлах, будут хорошо подходить для быстрого ответа на такую респираторную инфекцию, как SARS-CoV-2.

[00487] Измерение ASC в костном мозге проводили тем же способом, что и в примере 19. Результаты представлены на фиг. 100. Долгоживущие RBD-специфичные ASC, продуцировавшие антитела IgG и IgA, были обнаружены в костном мозге у большинства животных через 168 суток после однократного интраназального введения вектора с RBD.

[00488] ***Обсуждение*** **- интраназальная вакцинация однократной дозой вектора на основе аденовируса с S1 и RBD вызывала у мышей развитие быстрого и продолжительного системного иммунитета и иммунитета слизистых оболочек против SARS-CoV-2**

[00489] Иммуногенность векторов с S1 и RBD после однократного введения вектора на основе репликационно-дефектного Ad5, кодирующего домен S1 (остатки 16-685) (**SEQ ID NO: 13**) или домен RBD (остатки 302-543) (**SEQ ID NO: 15**) от штамма Wuhan-1 вируса SARS-CoV-2 (номер доступа QHD43416.1), инбредным C57BL/6 и аутбредным CD-1 мышам оценивали путем измерения индукции уровней спайк-специфичных антител в сыворотке и жидкостях бронхоальвеолярного лаважа (BAL). Каждую вакцину оценивали на трех (3) различных уровнях доз (высоком, среднем или низком), как описано выше. После однократного введения вакцины в День 0 между Днями 7-28 (C57BL/6) или Днями 7-21 (CD-1) производили забор образцов сыворотки и бронхоальвеолярного лаважа (BAL). Антитела IgG и IgA, специфичные к спайк-домену SARS-CoV-2, измеряли в образцах сыворотки или BAL с применением набора микроносителей для цитометрии спайк-домена. Функциональность данных антител, выработка которых была вызвана вакциной, измеряли в анализах нейтрализации живого вируса. Помимо индукции стойких ответов с образованием нейтрализующих антител и выработки IgA против SARS-CoV-2 в слизистых оболочках RBD стимулировал системные клеточные иммунные ответы и клеточные иммунные ответы слизистых оболочек, характеризующиеся цитокиновым профилем по типу Т-хелперов 1 (Th1), посредством индукции развития цитокин-продуцирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, в том числе резидентных для легких Т-клеток памяти (Trm).

[00490] Системные ответы с образованием спайк-специфичных антител IgG были обнаружены у обеих линий мышей, получавших однократное интраназальное введение вакцины на основе либо вектора с S1, либо вектора с RBD. Фиг. 78 и 85. При средней и высокой дозе вакцины вектор с RBD индуцировал умеренно больший ответ с образованием сывороточных спайк-специфичных IgG по сравнению с вектором с S1 – эффект, который был более выражен у C57BL/6 мышей по сравнению с CD-1 мышами. Более того, интраназальное введение вектора либо с S1, либо с RBD приводило к быстрому повышению уровня спайк-специфичных IgG в BAL в обеих линиях мышей. Также была продемонстрирована индукция образования IgA после однократного интраназального введения S1 или RBD. Также было продемонстрировано, что системные ответы с образованием спайк-специфичных антител IgG, индуцированные вектором с RBD (кодирующим **SEQ ID NO: 15**) после интраназального введения, были продолжительными без признаков спада с течением времени в течение до 120 суток после вакцинации, как показано в примере 18. См. фиг. 97. Более того, интраназальная вакцинация также приводила к формированию в легочной среде устойчивой популяции RBD-специфических ASC и долгоживущих B-клеток памяти, которая включала IgA-

продуцирующие ASC, которые могут обеспечивать местную защиту у вакцинированных животных. См. фиг. 98-100.

[00491] Интраназальное введение вектора с S1 или вектора с RBD вызывало ответы с образованием нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, которые измеряли в реакции нейтрализации с уменьшением фокусов (FNRT) (аналогичной реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT)) в пермиссивных к инфекции клетках Vero E6 с применением изолята USA-WA1/2020 вируса SARS-CoV-2 дикого типа. Анализ предусматривал использование образцов от C57BL/6 мышей через 4 недели после вакцинации посредством S1 и RBD с использованием средней или высокой дозы вакцины и образцов CD1 мышей через 3 недели после вакцинации высокой дозой вакцины на основе вектора с RBD (**фиг. 94A**). Интраназальное введение вектора с RBD вызывало появление значимо больших титров нейтрализующих антител по сравнению с применением вектора с S1 во всех оцениваемых условиях. Интраназальная вакцинация в наиболее высокой дозе вектора с RBD индуцировала ответы с выработкой нейтрализующих антител выше исходного уровня у 10/10 C57BL/6 и 8/10 CD-1 мышей с медианным титром 563 и 431 соответственно **(фиг. 94A)**. Уровень ответа в образованием нейтрализующих антител тесно коррелировал с величиной ответа с образованием спайк-специфичных сывороточных IgG, измеряемого у отдельных животных **(фиг. 94B)**, что свидетельствовало о том, что устойчивые ответы с образованием антител на введение вектора с RBD были связаны с образованием потенциально защитных нейтрализующих антител.

[00492] В примерах 13, 15 и 17 продемонстрировано, что настоящая композиция вакцины, например вакцина, доставляемая в векторе на основе аденовируса и кодирующая последовательность RBD (**SEQ ID NO: 15**) спайк-белка SARS-CoV-2, предназначенная для интраназального введения, является высокоиммуногенной как у инбредных, так и у аутбредных мышей и вызывает устойчивые системные ответы и местные ответы в слизистых оболочках с участием Т-клеток и с образованием антител. После однократной интраназальной вакцинации композиция, содержащая вектор с RBD, вызывала сильный и сфокусированный иммунный ответ против спайк-домена SARS-CoV-2 за счет индукции образования функциональных антител, которые нейтрализуют инфекцию пермиссивных клеток вирусом SARS-CoV-2 дикого типа, а также за счет развития IgA- и цитокин-продуцирующих $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в слизистых оболочках легких. Клеточные ответы, индуцированные композицией, содержащей вектор с RBD, были смещены в сторону противовирусного ответа, что демонстрировалось высокими уровнями антиген-специфических $CD8^+$ Т-клеток и

экспрессией цитокинов, в число которых входили IFN-γ и TNF-α. Формирование популяции резидентных $CD8^+$ Т-клеток памяти в легких дополняет устойчивую индукцию образования в слизистых оболочках антитела IgA против спайк-белка и представляет собой важное дополнение к общему иммунному ответу на композицию, содержащую вектор с RBD. Из этих данных также видно, что интраназальное введение композиции вакцины на основе вектора с RBD не инициировало потенциально вредный ответ с участием Th2, а скорее индуцировало ожидаемые противовирусные Т-клеточные ответы благодаря противовирусному ответу, индуцированному с помощью интраназально вводимого вектора на основе аденовируса. См. патент США № 9605275. В целом из данных видно, что интраназальное введение вектора на основе репликационно-некомпетентного Ad5, экспрессирующего последовательность спайк-домена RBD SARS-CoV-2 (**SEQ ID NO: 15**), вызывало развитие гуморальных и клеточных иммунных ответов как системно, так и в участках слизистых оболочек, в особенности, в легком, которое является основным участком для инфекции и клинически проявляющегося заболевания.

[00493] Хотя некоторые варианты осуществления были описаны с точки зрения предпочтительных вариантов осуществления, понятно, что специалистам в данной области техники будут очевидны изменения и модификации. Поэтому имеется в виду, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные варианты, которые входят в объем представленной далее формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), причем вектор на основе rdAd является выбранным из:

a) вектора на основе rdAd, у которого отсутствует кодирующая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, отличный от аденовирусного;

b) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2;

c) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2;

d) комбинации векторов из a) и b), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

e) комбинации векторов из b) и c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

f) комбинации любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

g) комбинации двух отличающихся типов векторов на основе rdAd из b), причем каждый тип вектора на основе rdAd содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другими типами векторов на основе rdAd в комбинации, при этом векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

причем указанная иммуногенная композиция способна индуцировать иммунный ответ с выработкой нейтрализующих антител и/или клеточный иммунный ответ против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, которому вводится указанная иммуногенная композиция.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, причем экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2 для спайк (S) белка или домена S1 спайк-белка.

3. Иммуногенная композиция по п. 1, причем экспрессионная кассета содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% гомологией

и/или идентичностью с SEQ ID NO: 3; последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 15; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 446; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с SEQ ID NO: 446; любой из SEQ ID NO: 412-417; любой из SEQ ID NO: 438-445 и любой из SEQ ID NO: 475-476 или 460; последовательности, характеризующейся по меньшей мере 80% гомологией и/или идентичностью с любой из SEQ ID NO: 412-417, SEQ ID NO: 438-445 и SEQ ID NO: 475-476 и 460.

4. Иммуногенная композиция по п. 1, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует последовательность спайк-белка, содержащую последовательность, в которой расщепляемый сайт S1/S2 и/или S2' являются устойчивыми к протеомной деградации, и/или последовательность, в которой пептид слияния был удален или модифицирован для предотвращения его фузогенной активности, и/или последовательность, в которой внутриклеточный домен был модифицирован или частично с изменением мотива для удержания в эндоплазматическом ретикулуме, необязательно, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует последовательность, включающую в себя по меньшей мере одну из NSPQQAQSVAS (SEQ ID NO: 451), NSPSGAGSVAS (SEQ ID NO: 456) или NSP----VAS (SEQ ID NO: 461) в сайте расщепления S1/S2, KRSFIADA (SEQ ID NO: 453), PSKPSKQSF (SEQ ID NO: 457), PSKPSKNSF (SEQ ID NO: 458), PSKPSNASF (SEQ ID NO: 459) в сайте расщепления S2', или SRLDPPEAEV (SEQ ID NO: 455), и/или любую модификацию последовательности, представленную в таблице 1 и/или таблице 2.

5. Иммуногенная композиция по п. 1, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, или ее иммуногенный фрагмент.

6. Иммуногенная композиция по п. 1, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует по меньшей мере аминокислоты 331-527 в SEQ ID NO: 3.

7. Иммуногенная композиция по п. 6, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) спайк-белка и содержит одну или более из следующих замен: K417N, K417T, R403K, N439K, G446V, G446S, L452R, G476A, S477N, T478K, E484D, T478I, E484K, F490S, Q493R, S494P, P499H и/или N501Y.

8. Иммуногенная композиция по п. 1, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) спайк-белка или ее иммуногенный фрагмент и/или содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 412-417, SEQ ID NO: 438-445, SEQ ID NO 475-476, SEQ ID NO: 446 и SEQ ID NO: 460 или их иммуногенный фрагмент.

9. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем экспрессионная кассета в векторе на основе репликационно-дефектного аденовируса дополнительно содержит кодирующую последовательность, которая кодирует один или более из структурных белков оболочки (E), мембраны (M) или нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2.

10. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, содержащая дополнительный вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит кодирующую последовательность, которая кодирует один или более из структурных белков оболочки (E), мембраны (M) или нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2.

11. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем экспрессионная кассета в векторе на основе репликационно-дефектного аденовируса содержит кодирующую последовательность для модифицированного варианта SEQ ID NO: 411, содержащую:

одну или более замен любой одной или более из аминокислот 333-388, 390-395, 397-399, 401-411, 413-415, 417-419, 424, 426-435, 437, 439-442, 444-446, 449, 450, 452, 453, 455-463, 465, 467-473, 475-479, 481-486, 490, 491, 493-495, 499-510 и/или 513-526; одну или более замен любой одной или более из аминокислот 367, 403, 417, 439, 446, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 490, 493, 494, 495, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505; одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из аминокислоты 367 (V) на F, I, L S или A, аминокислоты 403 (R) на K или S, 417 (K) на N или T; аминокислоты 439 (N) на K, аминокислоты 446 (G) на V, S или A; аминокислоты 449 (Y) на N; аминокислоты 452 (L) на L, M или Q, аминокислоты 453 (Y) на F; аминокислоты 455 (L) на F; аминокислоты 456 (F) на L; аминокислоты 470 (T) на I, A или N, аминокислоты 473 (Y) на V; аминокислоты 475 (A) на V; аминокислоты 476 (G) на S или A; аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I; аминокислоты 476 (G) на S или A, аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I, аминокислоты 478 (T) на I, K, R или A, аминокислоты 484 (E) на Q, K, D, A или R; аминокислоты 486 (F) на L или S;

аминокислоты 490 (F) на L или S, аминокислоты 493 (Q) на L или R; аминокислоты 494 (S) на P или L, аминокислоты 495 (Y) на N или F; аминокислоты 496 (G) на V или S, аминокислоты 499 (P) на H, S или R, аминокислоты 500 (T) на I; аминокислоты 501 (N) на Y, T или S; аминокислоты 502 (G) на R, D или C; аминокислоты 503 (V) на L, I или F и аминокислоты 504 (G) на V, D или S, аминокислоты 505 (Y) на H, E, W или C.

12. Иммуногенная композиция по п. 1, причем по меньшей мере один антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2, получен из вируса гриппа.

13. Иммуногенная композиция по п. 1, содержащая комбинацию любых двух из векторов на основе rdAd из a)-c).

14. Иммуногенная композиция по п. 13, причем указанная иммуногенная композиция представляет собой двухкомпонентную композицию, содержащую по меньшей мере одну композицию, которая содержит векторы на основе rdAd из a)-c), и по меньшей мере вторую композицию, содержащую отличающийся вектор на основе rdAd из a)-c).

15. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, дополнительно способная индуцировать комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ против SARS-CoV-2.

16. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем кодирующая последовательность кодирует по меньшей мере один или более В-клеточных эпитопов, один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов и/или один или более CD4+ Т-клеточных эпитопов.

17. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем кодирующая последовательность является оптимизированной по кодонам для субъекта-млекопитающего.

18. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем нейтрализующие антитела обеспечивают серологическую защиту от инфекции SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, необязательно, при этом субъект-млекопитающее представляет собой человека.

19. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой аденовирус человека, необязательно, Ad5 или Ad26.

20. Иммуногенная композиция по п. 1, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой бычий аденовирус, собачий аденовирус, аденовирус приматов, отличных от человека, аденовирус кур, или свиной аденовирус, или аденовирус свиней.

21. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой аденовирус с удаленным или разрушенным E1, E3 и/или E4.

22. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем кодирующая последовательность антигена SARS-CoV-2 кодирует один или более пептидов, содержащих один или более Т-клеточных эпитопов из таблицы 3A, одну или более групп Т-клеточных эпитопов из таблицы 3B или SEQ ID NO. 27-282; и/или один или более В-клеточных эпитопов с SEQ ID NO. 25-68; и/или одну или более из SEQ ID NO. 328-369; необязательно, при этом пептиды являются последовательно соединенными и, необязательно, разделенными линкерной аминокислотной последовательностью из двух-десяти аминокислот.

23. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем вектор на основе rdAd дополнительно содержит по меньшей мере один молекулярный адъювант, выбранный из группы, состоящей из: одного или более полипептидов или пептидов, которые функционируют в качестве костимулирующего компонента; одного или более цитокинов; одного или более хемокинов; одного или более иммуноингибирующих белков; одного или более агонистов TLR, необязательно, при этом один или более агонистов TLR являются выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 463-474; и их комбинации.

24. Иммуногенная композиция по любому предыдущему пункту, причем вектор на основе rdAd содержит по меньшей мере одну последовательность полинуклеотида, кодирующую по меньшей мере один белок, блокирующий SARS-CoV-2; при этом по меньшей мере одна последовательность полинуклеотида кодирует по меньшей мере один пептид или полипептид, который индуцирует иммунный ответ, препятствующий связыванию S-белка SARS-CoV-2 с его клеточным рецептором, напрямую препятствует связыванию S-белка SARS-CoV-2 с его клеточным рецептором, представляет собой связывающее RBD средство, представляет собой связывающее ACE2 средство и/или представляет собой как связывающее RBD средство, так и связывающее ACE2 средство.

25. Полинуклеотид, кодирующий вектор на основе rdAd в иммуногенной композиции по любому предыдущему пункту.

26. Вектор на основе rdAd, продуцирующийся при экспрессии полинуклеотида по п. 25 в клетке-хозяине.

27. Композиция, содержащая вектор на основе rdAd по п. 26.

28. Фармацевтический состав, содержащий эффективное количество иммуногенной композиции по пп. 1-24 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель,

необязательно, при этом разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор.

29. Фармацевтический состав по п. 28, выполненный с возможностью неинвазивного введения.

30. Фармацевтический состав по п. 28 или п. 29, выполненный с возможностью интраназального введения субъекту-млекопитающему.

31. Фармацевтический состав по любому из пп. 28-30, причем введение фармацевтического состава субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунный ответ у субъекта-млекопитающего, необязательно, комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ.

32. Фармацевтический состав по любому из пп. 28-31, причем фармацевтически приемлемый носитель имеет форму распыляемого раствора или аэрозоля.

33. Фармацевтический состав по любому из пп. 28-32, причем эффективное количество составляет по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp).

34. Фармацевтический состав по любому из пп. 28-33, выполненный в виде однократной интраназальной дозы.

35. Фармацевтический состав по любому из пп. 28-34, выполненный в виде двух или более интраназальных доз.

36. Фармацевтический состав, подходящий для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащий:

эффективное количество по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp) в иммуногенной композиции по пп. 1-31, содержащей по меньшей мере один вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса, который содержит экспрессионную кассету, содержащую кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2 или по меньшей мере один его иммуногенный фрагмент, причем эффективное количество индуцирует комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ; и

фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

37. Фармацевтический состав по п. 36, причем состав способен обеспечивать серологическую защиту субъекта-человека от SARS-CoV-2 в течение по меньшей мере 6 месяцев или, предпочтительно, 9 месяцев.

38. Фармацевтический состав по п. 36 или п. 37, причем кодирующая последовательность является оптимизированной по кодонам для субъекта-человека.

39. Фармацевтическая доза для интраназального введения, содержащая:

фармацевтически приемлемый носитель в форме распыляемого раствора или аэрозоля, смешанный с иммуногенной композицией по пп. 1-27, причем доза выполнена с возможностью интраназального введения с целью неинвазивной индукции защитного иммунного ответа против SARS-CoV-2.

40. Фармацевтическая доза по п. 39, причем иммуногенная композиция содержит эффективное количество, составляющее по меньшей мере 10^7 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp).

41. Фармацевтическая доза по п. 39, причем эффективное количество индуцирует комплексный защитный иммунный ответ слизистых оболочек, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ.

42. Фармацевтическая доза по любому из пп. 39-41, выполненная в виде однократной дозы для индукции защитного иммунного ответа против коронавируса.

43. Фармацевтическая доза по любому из пп. 39-42, выполненная в виде двух или более доз для индукции защитного иммунного ответа против SARS-CoV-2.

44. Способ индукции иммунного ответа против коронавируса, причем способ предусматривает введение эффективного количества иммуногенной композиции по пп. 1-27 субъекту-млекопитающему.

45. Способ по п. 44, причем иммунный ответ является защитным против SARS-CoV-2.

46. Способ индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, причем способ предусматривает введение фармацевтического состава по любому из пп. 28-38 или фармацевтической дозы по п. 39-43 субъекту-млекопитающему.

47. Способ по п. 46, причем иммунный ответ является защитным против SARS-CoV-2.

48. Способ по любому из пп. 44-47, причем способ предусматривает интраназальное введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту-млекопитающему, при этом иммунный ответ обеспечивает защиту от вторичного заражения SARS-CoV-2.

49. Способ индукции комплексного защитного иммунного ответа слизистых оболочек, гуморального и/или Т-клеточного защитного иммунного ответа против коронавируса у субъекта-человека, предусматривающий:

интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы фармацевтического состава против коронавируса (SARS-CoV-2) по любому из пп. 28-38 или фармацевтической

дозы по пп. 39-43, причем введение индуцирует выработку сывороточных антител, антител в слизистых оболочках и индуцирует Т-клетки против SARS-CoV-2, необязательно, в результате чего субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере около 6 месяцев или, предпочтительно, 9 месяцев.

50. Способ по п. 49, причем серологическая защита длится в течение по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев.

51. Способ по любому из пп. 44-50, дополнительно предусматривающий введение человеку одного или более противоцитокиновых реактивов для предупреждения и/или лечения SARS-CoV-2, необязательно, при этом один или более противоцитокиновых реактивов включают в себя один или более реактивов против IL-1α, один или более реактивов против IL5, один или более реактивов против IL-6, один или более реактивов против IL-12, один или более реактивов против IL-17, один или более реактивов против MCP-1, один или более реактивов против TNF-α, один или более реактивов против GM-CSF и/или один или более реактивов против RANTES.

52. Способ по п. 51, причем один или более противоцитокиновых реактивов не включают в себя один или более реактивов против MIPa и/или один или более реактивов против RANTES.

53. Способ по п. 51, в котором:

один или более противоцитокиновых реактивов вводят совместно, по существу, с эффективным количеством иммуногенной композиции;

один или более противоцитокиновых реактивов не вводят, по существу, с эффективным количеством иммуногенной композиции;

иммуногенную композицию вводят млекопитающему однократно, а один или более противоцитокиновых реактивов вводят несколько раз; или

иммуногенную композицию вводят млекопитающему совместно с одним или более противоцитокиновыми реактивами и один или более противоцитокиновых реактивов впоследствии вводят млекопитающему.

54. Способ лечения или подавления симптомов респираторной вирусной инфекции у млекопитающего, причем указанная респираторная вирусная инфекция вызывает повышенную экспрессию интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1-альфа (IL-1α) и/или интерлейкина-12 (IL-12) в легком указанного млекопитающего, при этом способ предусматривает: интраназальное введение субъекту эффективного количества вектора на

основе аденовируса с делецией E1 и E3 и с экспрессией антигена SARS-CoV-2 или без нее, в результате чего экспрессия IL-6, IL-1α и/или IL-12 в легком снижается, тем самым облегчая указанные симптомы в течение периода около до 28 суток после введения вектора.

55. Способ по п. 54, причем экспрессия моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1), IFN-γ и/или RANTES повышается в легком после введения вектора.

56. Способ по п. 54, причем экспрессия воспалительного белка макрофагов 1 альфа (MIP-1α) и/или RANTES не снижается после введения вектора.

57. Способ индукции противовирусного иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего с респираторной вирусной инфекцией, или имеющего риск респираторной вирусной инфекции, причем способ предусматривает: интраназальное введение субъекту эффективного количества вектора на основе аденовируса с делецией E1 и E3 и с экспрессией антигена SARS-CoV-2 или без нее, при этом противовирусный иммунный ответ вызывает повышенную экспрессию моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1) и/или интерферона альфа (IFN-γ) после стадии введения.

58. Способ по любому из пп. 44-57, причем одно или более дополнительных средств против SARS-CoV-2 вводят субъектам до, по существу, одновременно или после введения вектора на основе аденовируса с делецией E1 и E3, необязательно, при этом указанные одно или более дополнительных средств являются выбранными из группы, состоящей из хлорохина, азитромицина, ремдесивира и их комбинации.

59. Способ по любому из пп. 44-58, причем субъект-млекопитающее является инфицированным SARS-CoV-2 до введения ему фармацевтического состава.

60. Способ по любому из пп. 44-59, причем субъект-млекопитающее представляет собой человека.

61. Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), причем вектор на основе rdAd является выбранным из:

a) вектора на основе rdAd, у которого отсутствует кодирующая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, отличный от аденовирусного;

b) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2;

c) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2;

d) комбинации векторов из a) и b), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

e) комбинации векторов из b) и c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

f) комбинации любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

g) комбинации двух отличающихся типов векторов на основе rdAd из b), причем каждый тип вектора на основе rdAd содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другими типами векторов на основе rdAd в комбинации, при этом векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

причем указанная иммуногенная композиция способна индуцировать иммунный ответ с выработкой нейтрализующих антител и/или клеточный иммунный ответ против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, которому вводят указанную иммуногенную композицию,

для применения в лечении или предупреждении SARS-CoV-2.

62. Применение иммуногенной композиции, содержащей вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), причем вектор на основе rdAd является выбранным из:

a) вектора на основе rdAd, у которого отсутствует кодирующая последовательность, которая кодирует экзогенный антиген, отличный от аденовирусного;

b) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность антигена SARS-CoV-2, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, необязательно, при этом указанный антиген содержит рецептор-связывающий домен (RBD) спайк (S) белка SARS-CoV-2;

c) вектора на основе rdAd, содержащего экспрессионную кассету, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует по меньшей мере один экзогенный антиген возбудителя инфекции, отличного от SARS-CoV-2;

d) комбинации векторов из a) и b), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

e) комбинации векторов из b) и c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

f) комбинации любых из векторов на основе rdAd согласно любому из a), b) или c), причем векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

g) комбинации двух отличающихся типов векторов на основе rdAd из b), причем каждый тип вектора на основе rdAd содержит экспрессионную кассету, кодирующую по меньшей мере один антиген SARS-CoV-2, отличный от кодируемого другими типами векторов на основе rdAd в комбинации, при этом векторы на основе rdAd вводятся вместе или отдельно;

причем указанная иммуногенная композиция способна индуцировать иммунный ответ с выработкой нейтрализующих антител и/или клеточный иммунный ответ против SARS-CoV-2 у субъекта-млекопитающего, которому вводят указанную иммуногенную композицию,

характеризующееся тем, что иммуногенная композиция применяется в производстве лекарственного препарата для обеспечения лечения или предупреждения SARS-CoV-2.

63. Иммуногенная композиция, содержащая вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса (rdAd), который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 446 или вариант, характеризующийся по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 446.

64. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует SEQ ID NO: 15.

65. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует SEQ ID NO: 13.

66. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует одну или более из SEQ ID NO: 412-417, SEQ ID NO: 438-445, SEQ ID NO: 475-476 и SEQ ID NO: 460.

67. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более точковых мутаций в SEQ ID NO: 3.

68. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций в положениях 333-388, 390-395, 397-399, 401-411, 413-415, 417-419, 424, 426-435, 437, 439-442, 444-446, 449, 450, 452, 453, 455-463, 465, 467-473, 475-479, 481-486, 490, 491, 493-495, 499-510 или 513-526, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

69. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций в положениях аминокислот 367, 403, 439, 417, 446, 447, 449, 452, 453, 455, 456, 470, 473, 475, 476, 477, 478, 484, 486, 487, 490, 493, 494, 496, 499, 500, 501, 502, 503, 504 и/или 505, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

70. Иммуногенная композиция по п. 68, причем одна или более мутаций являются выбранными из замены аминокислоты 417 (K) на N; замены аминокислоты 446 (G) на V, S или A; замены аминокислоты 449 (Y) на N; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замены аминокислоты 455 (L) на F; замены аминокислоты 456 (F) на L; замены аминокислоты 473 (Y) на V; замены аминокислоты 475 (A) на V; замены аминокислоты 476 (G) на S или A; замены аминокислоты 477 (S) на N, R, T, G, A или I; замены аминокислоты 484 (E) на Q, K, D, A или R; замены аминокислоты 486 (F) на L или S; замены аминокислоты 453 (Y) на F; замены аминокислоты 493 (Q) на L или R; замены аминокислоты 495 (Y) на N или F; замены аминокислоты 500 (T) на I; замены аминокислоты 501 (N) на Y, T или S; замены аминокислоты 502 (G) на R, D или C; замены аминокислоты 503 (V) на L, I или F или замены аминокислоты 505 (Y) на H, E, W или C, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

71. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует последовательность, содержащую одну или более мутаций, выбранных из K417T, K417N, E484K, L452R и/или N501Y, при этом нумерация аминокислот соответствует SEQ ID NO: 411.

72. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует одну или более из SEQ ID NO: 412-417.

73. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность кодирует одну или более из SEQ ID NO: 438-443 или 460.

74. Иммуногенная композиция по п. 63, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 446, дополнительно содержит лидерную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 418-437.

75. Иммуногенная композиция по любому из пп. 63-74, причем кодирующая последовательность является оптимизированной по кодонам для субъекта-млекопитающего.

76. Иммуногенная композиция по п. 63, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой бычий аденовирус, собачий аденовирус,

аденовирус приматов, отличных от человека, аденовирус кур, свиной аденовирус, или аденовирус свиней, или аденовирус человека.

77. Иммуногенная композиция по п. 76, причем аденовирус приматов, отличных от человека, представляет собой аденовирус шимпанзе или горилл.

78. Иммуногенная композиция по п. 63, причем вектор на основе репликационно-дефектного аденовируса представляет собой аденовирус человека.

79. Иммуногенная композиция по п. 78, причем аденовирус человека представляет собой Ad5 или Ad26.

80. Фармацевтический состав, содержащий эффективное количество иммуногенной композиции по п. 63, причем композиция содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, необязательно, при этом разбавитель представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор.

81. Фармацевтический состав по п. 80, выполненный с возможностью неинвазивного или интраназального введения, необязательно, при этом фармацевтически приемлемый носитель имеет форму распыляемого раствора или аэрозоля.

82. Способ индукции иммунного ответа против SARS-CoV-2, причем способ предусматривает введение человеку эффективного количества иммуногенной композиции по п. 63.

83. Способ по п. 82, причем эффективное количество составляет по меньшей мере 10^8 вирусных частиц (vp), по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) или по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp).

84. Способ по п. 82, причем иммуногенную композицию вводят интраназально.

85. Способ по п. 82, причем иммунный ответ против SARS-CoV-2 продолжается в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 12 месяцев после введения субъекту-человеку.

86. Способ по п. 82, причем иммунный ответ против SARS-CoV-2 включает ответ с выработкой IgA и/или Т-клеточный ответ слизистых оболочек против SARS-CoV-2, индуцируемый после введения иммуногенной композиции.

87. Способ по п. 82, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения легких или умеренных связанных с COVID-19 заболеваний после введения субъекту-человеку.

88. Способ по п. 82, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения тяжелых связанных с COVID-19 заболеваний после введения субъекту-человеку.

89. Способ по п. 82, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает тяжесть связанных с COVID-19 заболеваний после введения субъекту-человеку.

90. Способ по п. 82, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения инфекции SARS-CoV-2 после введения субъекту-человеку.

91. Способ по п. 82, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает частоту возникновения бессимптомного COVID-19 после введения субъекту-человеку.

92. Способ по п. 82, причем эффективное количество иммуногенной композиции снижает передачу SARS-CoV-2 после введения субъекту-человеку.

Фиг. 1A

SEQ ID NO: 1

Изолят вируса пневмонии с уханьского рынка морепродуктов Wuhan-Hu-1, полный геном

(GenBank: MN908947.3)

```
   1 attaaaggtt tataccttcc caggtaacaa accaaccaac tttcgatctc ttgtagatct
  61 gttctctaaa cgaactttaa aatctgtgtg gctgtcactc ggctgcatgc ttagtgcact
 121 cacgcagtat aattaataac taattactgt cgttgacagg acacgagtaa ctcgtctatc
 181 ttctgcaggc tgcttacggt ttcgtccgtg ttgcagccga tcatcagcac atctaggttt
 241 cgtccgggtg tgaccgaaag gtaagatgga gagccttgtc cctggtttca acgagaaaac
 301 acacgtccaa ctcagtttgc ctgttttaca ggttcgcgac gtgctcgtac gtggctttgg
 361 agactccgtg gaggaggtct tatcagaggc acgtcaacat cttaaagatg gcacttgtgg
 421 cttagtagaa gttgaaaaag gcgttttgcc tcaacttgaa cagccctatg tgttcatcaa
 481 acgttcggat gctcgaactg cacctcatgg tcatgttatg gttgagctgg tagcagaact
 541 cgaaggcatt cagtacggtc gtagtggtga gacacttggt gtccttgtcc ctcatgtggg
 601 cgaaatacca gtggcttacc gcaaggttct tcttcgtaag aacggtaata aaggagctgg
 661 tggccatagt tacggcgccg atctaaagtc atttgactta ggcgacgagc ttggcactga
 721 tccttatgaa gattttcaag aaaactggaa cactaaacat agcagtggtg ttacccgtga
 781 actcatgcgt gagcttaacg gaggggcata cactcgctat gtcgataaca acttctgtgg
 841 ccctgatggc taccctcttg agtgcattaa agaccttcta gcacgtgctg gtaaagcttc
 901 atgcactttg tccgaacaac tggactttat tgacactaag aggggtgtat actgctgccg
 961 tgaacatgag catgaaattg cttggtacac ggaacgttct gaaaagagct atgaattgca
1021 gacacctttt gaaattaaat tggcaaagaa atttgacacc ttcaatgggg aatgtccaaa
1081 ttttgtattt cccttaaatt ccataatcaa gactattcaa ccaagggttg aaaagaaaaa
1141 gcttgatggc tttatgggta gaattcgatc tgtctatcca gttgcgtcac caaatgaatg
1201 caaccaaatg tgcctttcaa ctctcatgaa gtgtgatcat tgtggtgaaa cttcatggca
1261 gacgggcgat tttgttaaag ccacttgcga attttgtggc actgagaatt tgactaaaga
1321 aggtgccact acttgtggtt acttacccca aaatgctgtt gttaaaattt attgtccagc
1381 atgtcacaat tcagaagtag gacctgagca tagtcttgcc gaataccata atgaatctgg
1441 cttgaaaacc attcttcgta agggtggtcg cactattgcc tttggaggct gtgtgttctc
1501 ttatgttggt tgccataaca agtgtgccta ttgggttcca cgtgctagcg ctaacatagg
1561 ttgtaaccat acaggtgttg ttggagaagg ttccgaaggt cttaatgaca accttcttga
1621 aatactccaa aaagagaaag tcaacatcaa tattgttggt gactttaaac ttaatgaaga
1681 gatcgccatt attttggcat ctttttctgc ttccacaagt gcttttgtgg aaactgtgaa
1741 aggtttggat tataaagcat tcaaacaaat tgttgaatcc tgtggtaatt ttaaagttac
1801 aaaaggaaaa gctaaaaaag gtgcctggaa tattggtgaa cagaaatcaa tactgagtcc
1861 tctttatgca tttgcatcag aggctgctcg tgttgtacga tcaattttct cccgcactct
1921 tgaaactgct caaaattctg tgcgtgtttt acagaaggcc gctataacaa tactagatgg
1981 aatttcacag tattcactga gactcattga tgctatgatg ttcacatctg atttggctac
2041 taacaatcta gttgtaatgg cctacattac aggtggtgtt gttcagttga cttcgcagtg
2101 gctaactaac atctttggca ctgtttatga aaaactcaaa cccgtccttg attggcttga
2161 agagaagttt aaggaaggtg tagagtttct tagagacggt tgggaaattg ttaaatttat
2221 ctcaacctgt gcttgtgaaa ttgtcggtgg acaaattgtc acctgtgcaa aggaaattaa
2281 ggagagtgtt cagacattct ttaagcttgt aaataaattt ttggctttgt gtgctgactc
2341 tatcattatt ggtggagcta aacttaaagc cttgaattta ggtgaaacat ttgtcacgca
2401 ctcaaaggga ttgtacagaa agtgtgttaa atccagagaa gaaactggcc tactcatgcc
2461 tctaaaagcc ccaaaagaaa ttatcttctt agagggagaa acacttccca cagaagtgtt
2521 aacagaggaa gttgtcttga aaactggtga tttacaacca ttagaacaac ctactagtga
2581 agctgttgaa gctccattgg ttggtacacc agtttgtatt aacgggctta tgttgctcga
2641 aatcaaagac acagaaaagt actgtgccct tgcacctaat atgatggtaa caaacaatac
2701 cttcacactc aaaggcggtg caccaacaaa ggttactttt ggtgatgaca ctgtgataga
2761 agtgcaaggt tacaagagtg tgaatatcac ttttgaactt gatgaaagga ttgataaagt
2821 acttaatgag aagtgctctg cctatacagt tgaactcggt acagaagtaa atgagttcgc
2881 ctgtgttgtg gcagatgctg tcataaaaac tttgcaacca gtatctgaat tacttacacc
2941 actgggcatt gatttagatg agtggagtat ggctacatac tacttatttg atgagtctgg
3001 tgagtttaaa ttggcttcac atatgtattg ttctttctac cctccagatg aggatgaaga
3061 agaaggtgat tgtgaagaag aagagtttga gccatcaact caatatgagt atggtactga
3121 agatgattac caaggtaaac ctttggaatt tggtgccact tctgctgctc ttcaacctga
```

Фиг. 1B

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
3181 agaagagcaa gaagaagatt ggttagatga tgatagtcaa caaactgttg gtcaacaaga
3241 cggcagtgag gacaatcaga caactactat tcaaacaatt gttgaggttc aacctcaatt
3301 agagatggaa cttacaccag ttgttcagac tattgaagtg aatagtttta gtggttattt
3361 aaaacttact gacaatgtat acattaaaaa tgcagacatt gtggaagaag ctaaaaaggt
3421 aaaaccaaca gtggttgtta atgcagccaa tgtttacctt aaacatggag gaggtgttgc
3481 aggagcctta aataaggcta ctaacaatgc catgcaagtt gaatctgatg attacatagc
3541 tactaatgga ccacttaaag tgggtggtag ttgtgtttta agcggacaca atcttgctaa
3601 acactgtctt catgttgtcg gcccaaatgt taacaaaggt gaagacattc aacttcttaa
3661 gagtgcttat gaaaatttta atcagcacga agttctactt gcaccattat tatcagctgg
3721 tatttttggt gctgacccta tacattcttt aagagtttgt gtagatactg ttcgcacaaa
3781 tgtctactta gctgtctttg ataaaaatct ctatgacaaa cttgtttcaa gctttttgga
3841 aatgaagagt gaaaagcaag ttgaacaaaa gatcgctgag attcctaaag aggaagttaa
3901 gccatttata actgaaagta aaccttcagt tgaacagaga aaacaagatg ataagaaaat
3961 caaagcttgt gttgaagaag ttacaacaac tctggaagaa actaagttcc tcacagaaaa
4021 cttgttactt tatattgaca ttaatggcaa tcttcatcca gattctgcca ctcttgttag
4081 tgacattgac atcactttct taaagaaaga tgctccatat atagtgggtg atgttgttca
4141 agagggtgtt ttaactgctg tggttatacc tactaaaaag gctggtggca ctactgaaat
4201 gctagcgaaa gctttgagaa aagtgccaac agacaattat ataaccactt acccgggtca
4261 gggtttaaat ggttacactg tagaggaggc aaagacagtg cttaaaaagt gtaaaagtgc
4321 cttttacatt ctaccatcta ttatctctaa tgagaagcaa gaaattcttg gaactgtttc
4381 ttggaatttg cgagaaatgc ttgcacatgc agaagaaaca cgcaaattaa tgcctgtctg
4441 tgtggaaact aaagccatag tttcaactat acagcgtaaa tataagggta ttaaaataca
4501 agagggtgtg gttgattatg gtgctagatt ttacttttac accagtaaaa caactgtagc
4561 gtcacttatc aacacactta acgatctaaa tgaaactctt gttacaatgc cacttggcta
4621 tgtaacacat ggcttaaatt tggaagaagc tgctcggtat atgagatctc tcaaagtgcc
4681 agctacagtt tctgtttctt cacctgatgc tgttacagcg tataatggtt atcttacttc
4741 ttcttctaaa acacctgaag aacattttat tgaaaccatc tcacttgctg gttcctataa
4801 agattggtcc tattctggac aatctacaca actaggtata gaatttctta agagaggtga
4861 taaaagtgta tattacacta gtaatcctac cacattccac ctagatggtg aagttatcac
4921 ctttgacaat cttaagacac ttctttcttt gagagaagtg aggactatta aggtgtttac
4981 aacagtagac aacattaacc tccacacgca agttgtggac atgtcaatga catatggaca
5041 acagtttggt ccaacttatt tggatggagc tgatgttact aaaataaaac ctcataattc
5101 acatgaaggt aaaacatttt atgttttacc taatgatgac actctacgtg ttgaggcttt
5161 tgagtactac cacacaactg atcctagttt tctgggtagg tacatgtcag cattaaatca
5221 cactaaaaag tggaaatacc cacaagttaa tggtttaact tctattaaat gggcagataa
5281 caactgttat cttgccactg cattgttaac actccaacaa atagagttga agtttaatcc
5341 acctgctcta caagatgctt attacagagc aagggctggt gaagctgcta acttttgtgc
5401 acttatctta gcctactgta ataagacagt aggtgagtta ggtgatgtta gagaaacaat
5461 gagttacttg tttcaacatg ccaatttaga ttcttgcaaa agagtcttga acgtggtgtg
5521 taaaacttgt ggacaacagc agacaaccct taagggtgta gaagctgtta tgtacatggg
5581 cacactttct tatgaacaat ttaagaaagg tgttcagata ccttgtacgt gtggtaaaca
5641 agctacaaaa tatctagtac aacaggagtc acctttttgtt atgatgtcag caccacctgc
5701 tcagtatgaa cttaagcatg gtacatttac ttgtgctagt gagtacactg gtaattacca
5761 gtgtggtcac tataaacata taacttctaa agaaactttg tattgcatag acggtgcttt
5821 acttacaaag tcctcagaat acaaaggtcc tattacggat gttttctaca aagaaaacag
5881 ttacacaaca accataaaac cagttactta taaattggat ggtgttgttt gtacagaaat
5941 tgaccctaag ttggacaatt attataagaa agacaattct tatttcacag agcaaccaat
6001 tgatcttgta ccaaaccaac catatccaaa cgcaagcttc gataatttta agtttgtatg
6061 tgataatatc aaatttgctg atgatttaaa ccagttaact ggttataaga aacctgcttc
6121 aagagagctt aaagttacat ttttccctga cttaaatggt gatgtggtgg ctattgatta
6181 taaacactac acaccctctt ttaagaaagg agctaaattg ttacataaac ctattgtttg
6241 gcatgttaac aatgcaacta ataaagccac gtataaacca aatacctggt gtatacgttg
6301 tctttggagc acaaaaccag ttgaaacatc aaattcgttt gatgtactga agtcagagga
6361 cgcgcaggga atggataatc ttgcctgcga agatctaaaa ccagtctctg aagaagtagt
```

Фиг. 1C

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
6421 ggaaaatcct accatacaga aagacgttct tgagtgtaat gtgaaaacta ccgaagttgt
6481 aggagacatt atacttaaac cagcaaataa tagtttaaaa attacagaag aggttggcca
6541 cacagatcta atggctgctt atgtagacaa ttctagtctt actattaaga aacctaatga
6601 attatctaga gtattaggtt tgaaaaccct tgctactcat ggtttagctg ctgttaatag
6661 tgtcccttgg gatactatag ctaattatgc taagcctttt cttaacaaag ttgttagtac
6721 aactactaac atagttacac ggtgtttaaa ccgtgtttgt actaattata tgccttattt
6781 ctttacttta ttgctacaat tgtgtacttt tactagaagt acaaattcta gaattaaagc
6841 atctatgccg actactatag caaagaatac tgttaagagt gtcggtaaat tttgtctaga
6901 ggcttcattt aattatttga agtcacctaa tttttctaaa ctgataaata ttataatttg
6961 gtttttacta ttaagtgttt gcctaggttc tttaatctac tcaaccgctg ctttaggtgt
7021 tttaatgtct aatttaggca tgccttctta ctgtactggt tacagagaag gctatttgaa
7081 ctctactaat gtcactattg caacctactg tactggttct ataccttgta gtgtttgtct
7141 tagtggttta gattctttag acacctatcc ttctttagaa actatacaaa ttaccatttc
7201 atcttttaaa tgggatttaa ctgcttttgg cttagttgca gagtggtttt tggcatatat
7261 tcttttcact aggtttttct atgtacttgg attggctgca atcatgcaat tgtttttcag
7321 ctattttgca gtacatttta ttagtaattc ttggcttatg tggttaataa ttaatcttgt
7381 acaaatggcc ccgatttcag ctatggttag aatgtacatc ttctttgcat cattttatta
7441 tgtatggaaa agttatgtgc atgttgtaga cggttgtaat tcatcaactt gtatgatgtg
7501 ttacaaacgt aatagagcaa caagagtcga atgtacaact attgttaatg gtgttagaag
7561 gtccttttat gtctatgcta atggaggtaa aggcttttgc aaactacaca attggaattg
7621 tgttaattgt gatacattct gtgctggtag tacatttatt agtgatgaag ttgcgagaga
7681 cttgtcacta cagtttaaaa gaccaataaa tcctactgac cagtcttctt acatcgttga
7741 tagtgttaca gtgaagaatg gttccatcca tctttacttt gataaagctg gtcaaaagac
7801 ttatgaaaga cattctctct ctcattttgt taacttagac aacctgagag ctaataacac
7861 taaaggttca ttgcctatta atgttatagt ttttgatggt aaatcaaaat gtgaagaatc
7921 atctgcaaaa tcagcgtctg tttactacag tcagcttatg tgtcaaccta tactgttact
7981 agatcaggca ttagtgtctg atgttggtga tagtgcggaa gttgcagtta aaatgtttga
8041 tgcttacgtt aatacgtttt catcaacttt taacgtacca atggaaaaac tcaaaacact
8101 agttgcaact gcagaagctg aacttgcaaa gaatgtgtcc ttagacaatg tcttatctac
8161 ttttatttca gcagctcggc aagggtttgt tgattcagat gtagaaacta aagatgttgt
8221 tgaatgtctt aaattgtcac atcaatctga catagaagtt actggcgata gttgtaataa
8281 ctatatgctc acctataaca aagttgaaaa catgacaccc cgtgaccttg gtgcttgtat
8341 tgactgtagt gcgcgtcata ttaatgcgca ggtagcaaaa agtcacaaca ttgctttgat
8401 atggaacgtt aaagatttca tgtcattgtc tgaacaacta cgaaaacaaa tacgtagtgc
8461 tgctaaaaag aataacttac cttttaagtt gacatgtgca actactagac aagttgttaa
8521 tgttgtaaca acaaagatag cacttaaggg tggtaaaatt gttaataatt ggttgaagca
8581 gttaattaaa gttacacttg tgttcctttt tgttgctgct attttctatt taataacacc
8641 tgttcatgtc atgtctaaac atactgactt ttcaagtgaa atcataggat acaaggctat
8701 tgatggtggt gtcactcgtg acatagcatc tacagatact tgttttgcta acaaacatgc
8761 tgattttgac acatggttta gccagcgtgg tggtagttat actaatgaca aagcttgccc
8821 attgattgct gcagtcataa caagagaagt gggttttgtc gtgcctggtt tgcctggcac
8881 gatattacgc acaactaatg gtgacttttt gcatttctta cctagagttt ttagtgcagt
8941 tggtaacatc tgttacacac catcaaaact tatagagtac actgactttg caacatcagc
9001 ttgtgttttg gctgctgaat gtacaatttt taaagatgct tctggtaagc cagtaccata
9061 ttgttatgat accaatgtac tagaaggttc tgttgcttat gaaagtttac gccctgacac
9121 acgttatgtg ctcatggatg gctctattat tcaatttcct aacacctacc ttgaaggttc
9181 tgttagagtg gtaacaactt ttgattctga gtactgtagg cacggcactt gtgaaagatc
9241 agaagctggt gtttgtgtat ctactagtgg tagatgggta cttaacaatg attattacag
9301 atctttacca ggagttttct gtggtgtaga tgctgtaaat ttacttacta atatgtttac
9361 accactaatt caacctattg gtgctttgga catatcagca tctatagtag ctggtggtat
9421 tgtagctatc gtagtaacat gccttgccta ctattttatg aggtttagaa gagcttttgg
9481 tgaatacagt catgtagttg cctttaatac tttactattc cttatgtcat tcactgtact
9541 ctgtttaaca ccagtttact cattcttacc tggtgtttat tctgttattt acttgtactt
9601 gacattttat cttactaatg atgtttcttt tttagcacat attcagtgga tggttatgtt
```

Фиг. 1D

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
 9661 cacaccttta gtacctttct ggataacaat tgcttatatc atttgtattt ccacaaagca
 9721 tttctattgg ttctttagta attacctaaa gagacgtgta gtctttaatg gtgtttcctt
 9781 tagtactttt gaagaagctg cgctgtgcac ctttttgtta aataaagaaa tgtatctaaa
 9841 gttgcgtagt gatgtgctat tacctcttac gcaatataat agatacttag ctctttataa
 9901 taagtacaag tattttagtg gagcaatgga tacaactagc tacagagaag ctgcttgttg
 9961 tcatctcgca aaggctctca atgacttcag taactcaggt tctgatgttc tttaccaacc
10021 accacaaacc tctatcacct cagctgtttt gcagagtggt tttagaaaaa tggcattccc
10081 atctggtaaa gttgagggtt gtatggtaca agtaacttgt ggtacaacta cacttaacgg
10141 tctttggctt gatgacgtag tttactgtcc aagacatgtg atctgcacct ctgaagacat
10201 gcttaaccct aattatgaag atttactcat tcgtaagtct aatcataatt tcttggtaca
10261 ggctggtaat gttcaactca gggttattgg acattctatg caaaattgtg tacttaagct
10321 taaggttgat acagccaatc ctaagacacc taagtataag tttgttcgca ttcaaccagg
10381 acagactttt tcagtgttag cttgttacaa tggttcacca tctggtgttt accaatgtgc
10441 tatgaggccc aatttcacta ttaagggttc attccttaat ggttcatgtg gtagtgttgg
10501 ttttaacata gattatgact gtgtctcttt ttgttacatg caccatatgg aattaccaac
10561 tggagttcat gctggcacag acttagaagg taacttttat ggacctttg ttgacaggca
10621 aacagcacaa gcagctggta cggacacaac tattacagtt aatgttttag cttggttgta
10681 cgctgctgtt ataaatggag acaggtggtt tctcaatcga tttaccacaa ctcttaatga
10741 ctttaacctt gtggctatga agtacaatta tgaacctcta acacaagacc atgttgacat
10801 actaggacct ctttctgctc aaactggaat tgccgtttta gatatgtgtg cttcattaaa
10861 agaattactg caaaatggta tgaatggacg taccatattg ggtagtgctt tattagaaga
10921 tgaatttaca ccttttgatg ttgttagaca atgctcaggt gttactttcc aaagtgcagt
10981 gaaaagaaca atcaagggta cacaccactg gttgttactc acaattttga cttcactttt
11041 agttttagtc cagagtactc aatggtcttt gttctttttt ttgtatgaaa atgccttttt
11101 acctttgct atgggtatta ttgctatgtc tgcttttgca atgatgtttg tcaaacataa
11161 gcatgcattt ctctgtttgt ttttgttacc ttctcttgcc actgtagctt attttaatat
11221 ggtctatatg cctgctagtt gggtgatgcg tattatgaca tggttggata tggttgatac
11281 tagtttgtct ggttttaagc taaaagactg tgttatgtat gcatcagctg tagtgttact
11341 aatccttatg acagcaagaa ctgtgtatga tgatggtgct aggagagtgt ggacacttat
11401 gaatgtcttg acactcgttt ataaagttta ttatggtaat gctttagatc aagccatttc
11461 catgtgggct cttataatct ctgttacttc taactactca ggtgtagtta caactgtcat
11521 gtttttggcc agaggtattg tttttatgtg tgttgagtat tgccctattt tcttcataac
11581 tggtaataca cttcagtgta taatgctagt ttattgtttc ttaggctatt tttgtacttg
11641 ttactttggc ctcttttgtt tactcaaccg ctactttaga ctgactcttg gtgtttatga
11701 ttacttagtt tctacacagg agtttagata tatgaattca cagggactac tcccacccaa
11761 gaatagcata gatgccttca aactcaacat taaattgttg ggtgttggtg gcaaaccttg
11821 tatcaaagta gccactgtac agtctaaaat gtcagatgta aagtgcacat cagtagtctt
11881 actctcagtt ttgcaacaac tcagagtaga atcatcatct aaattgtggg ctcaatgtgt
11941 ccagttacac aatgacattc tcttagctaa agatactact gaagcctttg aaaaaatggt
12001 ttcactactt tctgttttgc tttccatgca gggtgctgta gacataaaca agctttgtga
12061 agaaatgctg gacaacaggg caaccttaca agctatagcc tcagagttta gttcccttcc
12121 atcatatgca gcttttgcta ctgctcaaga agcttatgag caggctgttg ctaatggtga
12181 ttctgaagtt gttcttaaaa agttgaagaa gtctttgaat gtggctaaat ctgaatttga
12241 ccgtgatgca gccatgcaac gtaagttgga aaagatggct gatcaagcta tgacccaaat
12301 gtataaacag gctagatctg aggacaagag ggcaaaagtt actagtgcta tgcagacaat
12361 gcttttcact atgcttagaa agttggataa tgatgcactc aacaacatta tcaacaatgc
12421 aagagatggt tgtgttccct tgaacataat acctcttaca acagcagcca aactaatggt
12481 tgtcatacca gactataaca catataaaaa tacgtgtgat ggtacaacat ttacttatgc
12541 atcagcattg tgggaaatcc aacaggttgt agatgcagat agtaaaattg ttcaacttag
12601 tgaaattagt atggacaatt cacctaattt agcatggcct cttattgtaa cagctttaag
12661 ggccaattct gctgtcaaat tacagaataa tgagcttagt cctgttgcac tacgacagat
12721 gtcttgtgct gccggtacta cacaaactgc ttgcactgat gacaatgcgt tagcttacta
12781 caacacaaca aagggaggta ggtttgtact tgcactgtta tccgatttac aggatttgaa
12841 atgggctaga ttccctaaga gtgatggaac tggtactatc tatacagaac tggaaccacc
```

Фиг. 1E

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

12901 ttgtaggttt gttacagaca cacctaaagg tcctaaagtg aagtatttat actttattaa
12961 aggattaaac aacctaaata gaggtatggt acttggtagt ttagctgcca cagtacgtct
13021 acaagctggt aatgcaacag aagtgcctgc caattcaact gtattatctt tctgtgcttt
13081 tgctgtagat gctgctaaag cttacaaaga ttatctagct agtgggggac aaccaatcac
13141 taattgtgtt aagatgttgt gtacacacac tggtactggt caggcaataa cagttacacc
13201 ggaagccaat atggatcaag aatcctttgg tggtgcatcg tgttgtctgt actgccgttg
13261 ccacatagat catccaaatc ctaaaggatt ttgtgactta aaaggtaagt atgtacaaat
13321 acctacaact tgtgctaatg accctgtggg ttttacactt aaaaacacag tctgtaccgt
13381 ctgcggtatg tggaaaggtt atggctgtag ttgtgatcaa ctccgcgaac ccatgcttca
13441 gtcagctgat gcacaatcgt ttttaaacgg gtttgcggtg taagtgcagc ccgtcttaca
13501 ccgtgcggca caggcactag tactgatgtc gtatacaggg cttttgacat ctacaatgat
13561 aaagtagctg gttttgctaa attcctaaaa actaattgtt gtcgcttcca agaaaaggac
13621 gaagatgaca atttaattga ttcttacttt gtagttaaga gacacacttt ctctaactac
13681 caacatgaag aaacaattta taatttactt aaggattgtc cagctgttgc taaacatgac
13741 ttctttaagt ttagaataga cggtgacatg gtaccacata tatcacgtca acgtcttact
13801 aaatacacaa tggcagacct cgtctatgct ttaaggcatt ttgatgaagg taattgtgac
13861 acattaaaag aaatacttgt cacatacaat tgttgtgatg atgattattt caataaaaag
13921 gactggtatg attttgtaga aaacccagat atattacgcg tatacgccaa cttaggtgaa
13981 cgtgtacgcc aagctttgtt aaaaacagta caattctgtg atgccatgcg aaatgctggt
14041 attgttggtg tactgacatt agataatcaa gatctcaatg gtaactggta tgatttcggt
14101 gatttcatac aaaccacgcc aggtagtgga gttcctgttg tagattctta ttattcattg
14161 ttaatgccta tattaacctt gaccagggct ttaactgcag agtcacatgt tgacactgac
14221 ttaacaaagc cttacattaa gtgggatttg ttaaaatatg acttcacgga agagaggtta
14281 aaactctttg accgttattt taaatattgg gatcagacat accacccaaa ttgtgttaac
14341 tgtttggatg acagatgcat tctgcattgt gcaaacttta atgttttatt ctctacagtg
14401 ttcccaccta caagttttgg accactagtg agaaaaatat ttgttgatgg tgttccattt
14461 gtagtttcaa ctggatacca cttcagagag ctaggtgttg tacataatca ggatgtaaac
14521 ttacatagct ctagacttag ttttaaggaa ttacttgtgt atgctgctga ccctgctatg
14581 cacgctgctt ctggtaatct attactagat aaacgcacta cgtgcttttc agtagctgca
14641 cttactaaca atgttgcttt tcaaactgtc aaacccggta attttaacaa agacttctat
14701 gactttgctg tgtctaaggg tttctttaag gaaggaagtt ctgttgaatt aaaacacttc
14761 ttctttgctc aggatggtaa tgctgctatc agcgattatg actactatcg ttataatcta
14821 ccaacaatgt gtgatatcag acaactacta tttgtagttg aagttgttga taagtacttt
14881 gattgttacg atggtggctg tattaatgct aaccaagtca tcgtcaacaa cctagacaaa
14941 tcagctggtt ttccatttaa taaatggggt aaggctagac tttattatga ttcaatgagt
15001 tatgaggatc aagatgcact tttcgcatat acaaaacgta atgtcatccc tactataact
15061 caaatgaatc ttaagtatgc cattagtgca aagaatagag ctcgcaccgt agctggtgtc
15121 tctatctgta gtactatgac caatagacag tttcatcaaa aattattgaa atcaatagcc
15181 gccactagag gagctactgt agtaattgga acaagcaaat tctatggtgg ttggcacaac
15241 atgttaaaaa ctgtttatag tgatgtagaa aaccctcacc ttatgggttg ggattatcct
15301 aaatgtgata gagccatgcc taacatgctt agaattatgg cctcacttgt tcttgctcgc
15361 aaacatacaa cgtgttgtag cttgtcacac cgtttctata gattagctaa tgagtgtgct
15421 caagtattga gtgaaatggt catgtgtggc ggttcactat atgttaaacc aggtggaacc
15481 tcatcaggag atgccacaac tgcttatgct aatagtgttt ttaacatttg tcaagctgtc
15541 acggccaatg ttaatgcact tttatctact gatggtaaca aaattgccga taagtatgtc
15601 cgcaatttac aacacagact ttatgagtgt ctctatagaa atagagatgt tgacacagac
15661 tttgtgaatg agttttacgc atatttgcgt aaacatttct caatgatgat actctctgac
15721 gatgctgttg tgtgtttcaa tagcacttat gcatctcaag gtctagtggc tagcataaag
15781 aactttaagt cagttcttta ttatcaaaac aatgttttta tgtctgaagc aaaatgttgg
15841 actgagactg accttactaa aggacctcat gaattttgct ctcaacatac aatgctagtt
15901 aaacagggtg atgattatgt gtaccttcct tacccagatc catcaagaat cctaggggcc
15961 ggctgttttg tagatgatat cgtaaaaaca gatggtacac ttatgattga acggttcgtg
16021 tctttagcta tagatgctta cccacttact aaacatccta atcaggagta tgctgatgtc
16081 tttcatttgt acttacaata cataagaaag ctacatgatg agttaacagg acacatgtta

Фиг. 1F

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
16141 gacatgtatt ctgttatgct tactaatgat aacacttcaa ggtattggga acctgagttt
16201 tatgaggcta tgtacacacc gcatacagtc ttacaggctg ttggggcttg tgttctttgc
16261 aattcacaga cttcattaag atgtggtgct tgcatacgta gaccattctt atgttgtaaa
16321 tgctgttacg accatgtcat atcaacatca cataaattag tcttgtctgt taatccgtat
16381 gtttgcaatg ctccaggttg tgatgtcaca gatgtgactc aactttactt aggaggtatg
16441 agctattatt gtaaatcaca taaaccaccc attagttttc cattgtgtgc taatggacaa
16501 gtttttggtt tatataaaaa tacatgtgtt ggtagcgata atgttactga ctttaatgca
16561 attgcaacat gtgactggac aaatgctggt gattacattt tagctaacac ctgtactgaa
16621 agactcaagc tttttgcagc agaaacgctc aaagctactg aggagacatt taaactgtct
16681 tatggtattg ctactgtacg tgaagtgctg tctgacagag aattacatct ttcatgggaa
16741 gttggtaaac ctagaccacc acttaaccga aattatgtct ttactggtta tcgtgtaact
16801 aaaaacagta aagtacaaat aggagagtac acctttgaaa aaggtgacta tggtgatgct
16861 gttgtttacc gaggtacaac aacttacaaa ttaaatgttg gtgattattt tgtgctgaca
16921 tcacatacag taatgccatt aagtgcacct acactagtgc cacaagagca ctatgttaga
16981 attactggct tatacccaac actcaatatc tcagatgagt tttctagcaa tgttgcaaat
17041 tatcaaaagg ttggtatgca aaagtattct acactccagg gaccacctgg tactggtaag
17101 agtcattttg ctattggcct agctctctac tacccttctg ctcgcatagt gtatacagct
17161 tgctctcatg ccgctgttga tgcactatgt gagaaggcat taaaatattt gcctatagat
17221 aaatgtagta gaattatacc tgcacgtgct cgtgtagagt gttttgataa attcaaagtg
17281 aattcaacat tagaacagta tgtcttttgt actgtaaatg cattgcctga gacgacagca
17341 gatatagttg tctttgatga aatttcaatg gccacaaatt atgatttgag tgttgtcaat
17401 gccagattac gtgctaagca ctatgtgtac attggcgacc ctgctcaatt acctgcacca
17461 cgcacattgc taactaaggg cacactagaa ccagaatatt tcaattcagt gtgtagactt
17521 atgaaaacta taggtccaga catgttcctc ggaacttgtc ggcgttgtcc tgctgaaatt
17581 gttgacactg tgagtgcttt ggtttatgat aataagctta aagcacataa agacaaatca
17641 gctcaatgct ttaaaatgtt ttataagggt gttatcacgc atgatgtttc atctgcaatt
17701 aacaggccac aaataggcgt ggtaagagaa ttccttacac gtaaccctgc ttggagaaaa
17761 gctgtcttta tttcacctta taattcacag aatgctgtag cctcaaagat tttgggacta
17821 ccaactcaaa ctgttgattc atcacagggc tcagaatatg actatgtcat attcactcaa
17881 accactgaaa cagctcactc ttgtaatgta aacagattta atgttgctat taccagagca
17941 aaagtaggca tactttgcat aatgtctgat agagaccttt atgacaagtt gcaatttaca
18001 agtcttgaaa ttccacgtag gaatgtggca actttacaag ctgaaaatgt aacaggactc
18061 tttaaagatt gtagtaaggt aatcactggg ttacatccta cacaggcacc tacacacctc
18121 agtgttgaca ctaaattcaa aactgaaggt ttatgtgttg acatacctgg catacctaag
18181 gacatgacct atagaagact catctctatg atgggtttta aaatgaatta tcaagttaat
18241 ggttacccta acatgtttat cacccgcgaa gaagctataa gacatgtacg tgcatggatt
18301 ggcttcgatg tcgaggggtg tcatgctact agagaagctg ttggtaccaa tttaccttta
18361 cagctaggtt tttctacagg tgttaaccta gttgctgtac ctacaggtta tgttgataca
18421 cctaataata cagatttttc cagagttagt gctaaaccac cgcctggaga tcaatttaaa
18481 cacctcatac cacttatgta caaaggactt ccttggaatg tagtgcgtat aaagattgta
18541 caaatgttaa gtgacacact taaaaatctc tctgacagag tcgtatttgt cttatgggca
18601 catggctttg agttgacatc tatgaagtat tttgtgaaaa taggacctga gcgcacctgt
18661 tgtctatgtg atagacgtgc cacatgcttt tccactgctt cagacactta tgcctgttgg
18721 catcattcta ttggatttga ttacgtctat aatccgttta tgattgatgt tcaacaatgg
18781 ggttttacag gtaacctaca aagcaaccat gatctgtatt gtcaagtcca tggtaatgca
18841 catgtagcta gttgtgatgc aatcatgact aggtgtctag ctgtccacga gtgctttgtt
18901 aagcgtgttg actggactat tgaatatcct ataattggtg atgaactgaa gattaatgcg
18961 gcttgtagaa aggttcaaca catggttgtt aaagctgcat tattagcaga caaattccca
19021 gttcttcacg acattggtaa ccctaaagct attaagtgtg tacctcaagc tgatgtagaa
19081 tggaagttct atgatgcaca gccttgtagt gacaaagctt ataaaataga agaattattc
19141 tattcttatg ccacacattc tgacaaattc acagatggtg tatgcctatt ttggaattgc
19201 aatgtcgata gatatcctgc taattccatt gtttgtagat ttgacactag agtgctatct
19261 aaccttaact tgcctggttg tgatggtggc agtttgtatg taaataaaca tgcattccac
19321 acaccagctt ttgataaaag tgcttttgtt aatttaaaac aattaccatt tttctattac
```

Фиг. 1G

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
19381 tctgacagtc catgtgagtc tcatggaaaa caagtagtgt cagatataga ttatgtacca
19441 ctaaagtctg ctacgtgtat aacacgttgc aatttaggtg gtgctgtctg tagacatcat
19501 gctaatgagt acagattgta tctcgatgct tataacatga tgatctcagc tggctttagc
19561 ttgtgggttt acaaacaatt tgatacttat aacctctgga acacttttac aagacttcag
19621 agtttagaaa atgtggcttt taatgttgta aataagggac actttgatgg acaacagggt
19681 gaagtaccag tttctatcat taataacact gtttacacaa aagttgatgg tgttgatgta
19741 gaattgtttg aaaataaaac aacattacct gttaatgtag catttgagct ttgggctaag
19801 cgcaacatta aaccagtacc agaggtgaaa atactcaata atttgggtgt ggacattgct
19861 gctaatactg tgatctggga ctacaaaaga gatgctccag cacatatatc tactattggt
19921 gtttgttcta tgactgacat agccaagaaa ccaactgaaa cgatttgtgc accactcact
19981 gtctttttg atggtagagt tgatggtcaa gtagacttat ttagaaatgc ccgtaatggt
20041 gttcttatta cagaaggtag tgttaaaggt ttacaaccat ctgtaggtcc caaacaagct
20101 agtcttaatg gagtcacatt aattggagaa gccgtaaaaa cacagttcaa ttattataag
20161 aaagttgatg gtgttgtcca acaattacct gaaacttact ttactcagag tagaaattta
20221 caagaattta aacccaggag tcaaatggaa attgatttct tagaattagc tatggatgaa
20281 ttcattgaac ggtataaatt agaaggctat gccttcgaac atatcgttta tggagatttt
20341 agtcatagtc agttaggtgg tttacatcta ctgattggac tagctaaacg ttttaaggaa
20401 tcacctttg aattagaaga ttttattcct atggacagta cagttaaaaa ctatttcata
20461 acagatgcgc aaacaggttc atctaagtgt gtgtgttctg ttattgattt attacttgat
20521 gattttgttg aaataataaa atcccaagat ttatctgtag tttctaaggt tgtcaaagtg
20581 actattgact atacagaaat ttcatttatg ctttggtgta aagatggcca tgtagaaaca
20641 ttttacccaa aattacaatc tagtcaagcg tggcaaccgg gtgttgctat gcctaatctt
20701 tacaaaatgc aaagaatgct attagaaaag tgtgaccttc aaaattatgg tgatagtgca
20761 acattaccta aaggcataat gatgaatgtc gcaaaatata ctcaactgtg tcaatattta
20821 aacacattaa cattagctgt accctataat atgagagtta tacattttgg tgctggttct
20881 gataaaggag ttgcaccagg tacagctgtt ttaagacagt ggttgcctac gggtacgctg
20941 cttgtcgatt cagatcttaa tgactttgtc tctgatgcag attcaacttt gattggtgat
21001 tgtgcaactg tacatacagc taataaatgg gatctcatta ttagtgatat gtacgaccct
21061 aagactaaaa atgttacaaa agaaaatgac tctaaagagg gttttttcac ttacatttgt
21121 gggtttatac aacaaaagct agctcttgga ggttccgtgg ctataaagat aacagaacat
21181 tcttggaatg ctgatcttta taagctcatg ggacacttcg catggtggac agcctttgtt
21241 actaatgtga atgcgtcatc atctgaagca tttttaattg gatgtaatta tcttggcaaa
21301 ccacgcgaac aaatagatgg ttatgtcatg catgcaaatt acatattttg gaggaataca
21361 aatccaattc agttgtcttc ctattcttta tttgacatga gtaaatttcc ccttaaatta
21421 aggggtactg ctgttatgtc tttaaaagaa ggtcaaatca atgatatgat tttatctctt
21481 cttagtaaag gtagacttat aattagagaa aacaacagag ttgttatttc tagtgatgtt
21541 cttgttaaca actaaacgaa caatgtttgt ttttcttgtt ttattgccac tagtctctag
21601 tcagtgtgtt aatcttacaa ccagaactca attacccccc gcatacacta attctttcac
21661 acgtggtgtt tattaccctg acaaagtttt cagatcctca gttttacatt caactcagga
21721 cttgttctta cctttctttt ccaatgttac ttggttccat gctatacatg tctctgggac
21781 caatggtact aagaggtttg ataaccctgt cctaccattt aatgatggtg tttatttttgc
21841 ttccactgag aagtctaaca taataagagg ctggattttt ggtactactt tagattcgaa
21901 gacccagtcc ctacttattg ttaataacgc tactaatgtt gttattaaag tctgtgaatt
21961 tcaatttttgt aatgatccat ttttgggtgt ttattaccac aaaaacaaca aaagttggat
22021 ggaaagtgag ttcagagttt attctagtgc gaataattgc acttttgaat atgtctctca
22081 gccttttctt atggaccttg aaggaaaaca gggtaatttc aaaaatctta gggaatttgt
22141 gtttaagaat attgatggtt attttaaaat atattctaag cacacgccta ttaatttagt
22201 gcgtgatctc cctcagggtt tttcggcttt agaaccattg gtagatttgc caataggtat
22261 taacatcact aggtttcaaa ctttacttgc tttacataga agttatttga ctcctggtga
22321 ttcttcttca ggttggacag ctggtgctgc agcttattat gtgggttatc ttcaacctag
22381 gacttttcta ttaaaatata atgaaaatgg aaccattaca gatgctgtag actgtgcact
22441 tgaccctctc tcagaaacaa agtgtacgtt gaaatccttc actgtagaaa aaggaatcta
22501 tcaaacttct aactttagag tccaaccaac agaatctatt gttagatttc ctaatattac
22561 aaacttgtgc ccttttggtg aagtttttaa cgccaccaga tttgcatctg tttatgcttg
```

Фиг. 1H

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
22621 gaacaggaag agaatcagca actgtgttgc tgattattct gtcctatata attccgcatc
22681 attttccact tttaagtgtt atggagtgtc tcctactaaa ttaaatgatc tctgctttac
22741 taatgtctat gcagattcat ttgtaattag aggtgatgaa gtcagacaaa tcgctccagg
22801 gcaaactgga aagattgctg attataatta taaattacca gatgatttta caggctgcgt
22861 tatagcttgg aattctaaca atcttgattc taaggttggt ggtaattata attacctgta
22921 tagattgttt aggaagtcta atctcaaacc ttttgagaga gatatttcaa ctgaaatcta
22981 tcaggccggt agcacacctt gtaatggtgt tgaaggtttt aattgttact ttcctttaca
23041 atcatatggt ttccaaccca ctaatggtgt tggttaccaa ccatacagag tagtagtact
23101 ttcttttgaa cttctacatg caccagcaac tgtttgtgga cctaaaaagt ctactaattt
23161 ggttaaaaac aaatgtgtca atttcaactt caatggttta acaggcacag gtgttcttac
23221 tgagtctaac aaaaagtttc tgcctttcca acaatttggc agagacattg ctgacactac
23281 tgatgctgtc cgtgatccac agacacttga gattcttgac attacaccat gttcttttgg
23341 tggtgtcagt gttataacac caggaacaaa tacttctaac caggttgctg ttctttatca
23401 ggatgttaac tgcacagaag tccctgttgc tattcatgca gatcaactta ctcctacttg
23461 gcgtgtttat tctacaggtt ctaatgtttt tcaaacacgt gcaggctgtt taataggggc
23521 tgaacatgtc aacaactcat atgagtgtga catacccatt ggtgcaggta tatgcgctag
23581 ttatcagact cagactaatt ctcctcggcg ggcacgtagt gtagctagtc aatccatcat
23641 tgcctacact atgtcacttg gtgcagaaaa ttcagttgct tactctaata actctattgc
23701 catacccaca aattttacta ttagtgttac cacagaaatt ctaccagtgt ctatgaccaa
23761 gacatcagta gattgtacaa tgtacatttg tggtgattca actgaatgca gcaatctttt
23821 gttgcaatat ggcagttttt gtacacaatt aaaccgtgct ttaactggaa tagctgttga
23881 acaagacaaa aacacccaag aagtttttgc acaagtcaaa caaatttaca aaacaccacc
23941 aattaaagat tttggtggtt ttaatttttc acaaatatta ccagatccat caaaaccaag
24001 caagaggtca tttattgaag atctactttt caacaaagtg acacttgcag atgctggctt
24061 catcaaacaa tatggtgatt gccttggtga tattgctgct agagacctca tttgtgcaca
24121 aaagtttaac ggccttactg ttttgccacc tttgctcaca gatgaaatga ttgctcaata
24181 cacttctgca ctgttagcgg gtacaatcac ttctggttgg acctttggtg caggtgctgc
24241 attacaaata ccatttgcta tgcaaatggc ttataggttt aatggtattg gagttacaca
24301 gaatgttctc tatgagaacc aaaaattgat tgccaaccaa tttaatagtg ctattggcaa
24361 aattcaagac tcactttctt ccacagcaag tgcacttgga aaacttcaag atgtggtcaa
24421 ccaaaatgca caagctttaa acacgcttgt taaacaactt agctccaatt ttggtgcaat
24481 ttcaagtgtt ttaaatgata tcctttcacg tcttgacaaa gttgaggctg aagtgcaaat
24541 tgataggttg atcacaggca gacttcaaag tttgcagaca tatgtgactc aacaattaat
24601 tagagctgca gaaatcagag cttctgctaa tcttgctgct actaaaatgt cagagtgtgt
24661 acttggacaa tcaaaaagag ttgatttttg tggaaagggc tatcatctta tgtccttccc
24721 tcagtcagca cctcatggtg tagtcttctt gcatgtgact tatgtccctg cacaagaaaa
24781 gaacttcaca actgctcctg ccatttgtca tgatggaaaa gcacactttc ctcgtgaagg
24841 tgtctttgtt tcaaatggca cacactggtt tgtaacacaa aggaattttt atgaaccaca
24901 aatcattact acagacaaca catttgtgtc tggtaactgt gatgttgtaa taggaattgt
24961 caacaacaca gtttatgatc ctttgcaacc tgaattagac tcattcaagg aggagttaga
25021 taaatatttt aagaatcata catcaccaga tgttgattta ggtgacatct ctggcattaa
25081 tgcttcagtt gtaaacattc aaaaagaaat tgaccgcctc aatgaggttg ccaagaattt
25141 aaatgaatct ctcatcgatc tccaagaact tggaaagtat gagcagtata taaaatggcc
25201 atggtacatt tggctaggtt ttatagctgg cttgattgcc atagtaatgg tgacaattat
25261 gctttgctgt atgaccagtt gctgtagttg tctcaagggc tgttgttctt gtggatcctg
25321 ctgcaaattt gatgaagacg actctgagcc agtgctcaaa ggagtcaaat tacattacac
25381 ataaacgaac ttatggattt gtttatgaga atcttcacaa ttggaactgt aactttgaag
25441 caaggtgaaa tcaaggatgc tactccttca gattttgttc gcgctactgc aacgataccg
25501 atacaagcct cactcccttt cggatggctt attgttggcg ttgcacttct tgctgttttt
25561 cagagcgctt ccaaaatcat aaccctcaaa aagagatggc aactagcact ctccaagggt
25621 gttcactttg tttgcaactt gctgttgttg tttgtaacag tttactcaca ccttttgctc
25681 gttgctgctg gccttgaagc ccctttctc tatctttatg ctttagtcta cttcttgcag
25741 agtataaact ttgtaagaat aataatgagg ctttggcttt gctggaaatg ccgttccaaa
25801 aacccattac tttatgatgc caactatttt ctttgctggc atactaattg ttacgactat
```

Фиг. 1I

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
25861 tgtatacctt acaatagtgt aacttcttca attgtcatta cttcaggtga tggcacaaca
25921 agtcctattt ctgaacatga ctaccagatt ggtggttata ctgaaaaatg ggaatctgga
25981 gtaaaagact gtgttgtatt acacagttac ttcacttcag actattacca gctgtactca
26041 actcaattga gtacagacac tggtgttgaa catgttacct tcttcatcta caataaaatt
26101 gttgatgagc ctgaagaaca tgtccaaatt cacacaatcg acggttcatc cggagttgtt
26161 aatccagtaa tggaaccaat ttatgatgaa ccgacgacga ctactagcgt gcctttgtaa
26221 gcacaagctg atgagtacga acttatgtac tcattcgttt cggaagagac aggtacgtta
26281 atagttaata gcgtacttct ttttcttgct ttcgtggtat tcttgctagt tacactagcc
26341 atccttactg cgcttcgatt gtgtgcgtac tgctgcaata ttgttaacgt gagtcttgta
26401 aaaccttctt tttacgttta ctctcgtgtt aaaaatctga attcttctag agttcctgat
26461 cttctggtct aaacgaacta aatattatat tagtttttct gtttggaact ttaattttag
26521 ccatggcaga ttccaacggt actattaccg ttgaagagct taaaaagctc cttgaacaat
26581 ggaacctagt aataggtttc ctattcctta catggatttg tcttctacaa tttgcctatg
26641 ccaacaggaa taggtttttg tatataatta agttaatttt cctctggctg ttatggccag
26701 taactttagc ttgttttgtg cttgctgctg tttacagaat aaattggatc accggtggaa
26761 ttgctatcgc aatggcttgt cttgtaggct tgatgtggct cagctacttc attgcttctt
26821 tcagactgtt tgcgcgtacg cgttccatgt ggtcattcaa tccagaaact aacattcttc
26881 tcaacgtgcc actccatggc actattctga ccagaccgct tctagaaagt gaactcgtaa
26941 tcggagctgt gatccttcgt ggacatcttc gtattgctgg acaccatcta ggacgctgtg
27001 acatcaagga cctgcctaaa gaaatcactg ttgctacatc acgaacgctt tcttattaca
27061 aattgggagc ttcgcagcgt gtagcaggtg actcaggttt tgctgcatac agtcgctaca
27121 ggattggcaa ctataaatta aacacagacc attccagtag cagtgacaat attgctttgc
27181 ttgtacagta agtgacaaca gatgtttcat ctcgttgact ttcaggttac tatagcagag
27241 atattactaa ttattatgag gacttttaaa gtttccattt ggaatcttga ttacatcata
27301 aacctcataa ttaaaaattt atctaagtca ctaactgaga ataaatattc tcaattagat
27361 gaagagcaac caatggagat tgattaaacg aacatgaaaa ttattctttt cttggcactg
27421 ataacactcg ctacttgtga gctttatcac taccaagagt gtgttagagg tacaacagta
27481 cttttaaaag aaccttgctc ttctggaaca tacgagggca attcaccatt tcatcctcta
27541 gctgataaca aatttgcact gacttgcttt agcactcaat ttgcttttgc ttgtcctgac
27601 ggcgtaaaac acgtctatca gttacgtgcc agatcagttt cacctaaact gttcatcaga
27661 caagaggaag ttcaagaact ttactctcca atttttctta ttgttgcggc aatagtgttt
27721 ataacacttt gcttcacact caaaagaaag acagaatgat tgaactttca ttaattgact
27781 tctatttgtg ctttttagcc tttctgctat tccttgtttt aattatgctt attatctttt
27841 ggttctcact tgaactgcaa gatcataatg aaacttgtca cgcctaaacg aacatgaaat
27901 ttcttgtttt cttaggaatc atcacaactg tagctgcatt tcaccaagaa tgtagtttac
27961 agtcatgtac tcaacatcaa ccatatgtag ttgatgaccc gtgtcctatt cacttctatt
28021 ctaaatggta tattagagta ggagctagaa aatcagcacc tttaattgaa ttgtgcgtgg
28081 atgaggctgg ttctaaatca cccattcagt acatcgatat cggtaattat acagtttcct
28141 gtttaccttt tacaattaat tgccaggaac ctaaattggg tagtcttgta gtgcgttgtt
28201 cgttctatga agacttttta gagtatcatg acgttcgtgt tgttttagat ttcatctaaa
28261 cgaacaaact aaaatgtctg ataatggacc ccaaaatcag cgaaatgcac cccgcattac
28321 gtttggtgga ccctcagatt caactggcag taaccagaat ggagaacgca gtggggcgcg
28381 atcaaaacaa cgtcggcccc aaggtttacc caataatact gcgtcttggt tcaccgctct
28441 cactcaacat ggcaaggaag accttaaatt ccctcgagga caaggcgttc caattaacac
28501 caatagcagt ccagatgacc aaattggcta ctaccgaaga gctaccagac gaattcgtgg
28561 tggtgacggt aaaatgaaag atctcagtcc aagatggtat ttctactacc taggaactgg
28621 gccagaagct ggacttccct atggtgctaa caaagacggc atcatatggg ttgcaactga
28681 gggagccttg aatacaccaa aagatcacat tggcacccgc aatcctgcta acaatgctgc
28741 aatcgtgcta caacttcctc aaggaacaac attgccaaaa ggcttctacg cagaagggag
28801 cagaggcggc agtcaagcct cttctcgttc ctcatcacgt agtcgcaaca gttcaagaaa
28861 ttcaactcca ggcagcagta ggggaacttc tcctgctaga atggctggca atggcggtga
28921 tgctgctctt gctttgctgc tgcttgacag attgaaccag cttgagagca aaatgtctgg
28981 taaaggccaa caacaacaag gccaaactgt cactaagaaa tctgctgctg aggcttctaa
29041 gaagcctcgg caaaaacgta ctgccactaa agcatacaat gtaacacaag ctttcggcag
```

Фиг. 1J

SEQ ID NO: 1 (продолжение)

```
29101 acgtggtcca gaacaaaccc aaggaaattt tggggaccag gaactaatca gacaaggaac
29161 tgattacaaa cattggccgc aaattgcaca atttgccccc agcgcttcag cgttcttcgg
29221 aatgtcgcgc attggcatgg aagtcacacc ttcgggaacg tggttgacct acacaggtgc
29281 catcaaattg gatgacaaag atccaaattt caaagatcaa gtcattttgc tgaataagca
29341 tattgacgca tacaaaacat tcccaccaac agagcctaaa aaggacaaaa agaagaaggc
29401 tgatgaaact caagccttac cgcagagaca gaagaaacag caaactgtga ctcttcttcc
29461 tgctgcagat ttggatgatt tctccaaaca attgcaacaa tccatgagca gtgctgactc
29521 aactcaggcc taaactcatg cagaccacac aaggcagatg ggctatataa acgttttcgc
29581 ttttccgttt acgatatata gtctactctt gtgcagaatg aattctcgta actacatagc
29641 acaagtagat gtagttaact ttaatctcac atagcaatct ttaatcagtg tgtaacatta
29701 gggaggactt gaaagagcca ccacattttc accgaggcca cgcggagtac gatcgagtgt
29761 acagtgaaca atgctaggga gagctgccta tatggaagag ccctaatgtg taaaattaat
29821 tttagtagtg ctatccccat gtgattttaa tagcttctta ggagaatgac aaaaaaaaaa
29881 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa (SEQ ID NO: 1)
```

Фиг. 2A

SEQ ID NO: 2

(полипротеин SARS-CoV-2; GenBank: QHD43415.1)

MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVRDVLVRGFGDSVEEVLSEARQ

HLKDGTCGLVEVEKGVLPQLEQPYVFIKRSDARTAPHGHVMVELVAELEGIQYGRSGE

TLGVLVPHVGEIPVAYRKVLLRKNGNKGAGGHSYGADLKSFDLGDELGTDPYEDFQEN

WNTKHSSGVTRELMRELNGGAYTRYVDNNFCGPDGYPLECIKDLLARAGKASCTLSEQ

LDFIDTKRGVYCCREHEHEIAWYTERSEKSYELQTPFEIKLAKKFDTFNGECPNFVFP

LNSIIKTIQPRVEKKKLDGFMGRIRSVYPVASPNECNQMCLSTLMKCDHCGETSWQTG

DFVKATCEFCGTENLTKEGATTCGYLPQNAVVKIYCPACHNSEVGPEHSLAEYHNESG

LKTILRKGGRTIAFGGCVFSYVGCHNKCAYWVPRASANIGCNHTGVVGEGSEGLNDNL

LEILQKEKVNINIVGDFKLNEEIAIILASFSASTSAFVETVKGLDYKAFKQIVESCGN

FKVTKGKAKKGAWNIGEQKSILSPLYAFASEAARVVRSIFSRTLETAQNSVRVLQKAA

ITILDGISQYSLRLIDAMMFTSDLATNNLVVMAYITGGVVQLTSQWLTNIFGTVYEKL

KPVLDWLEEKFKEGVEFLRDGWEIVKFISTCACEIVGGQIVTCAKEIKESVQTFFKLV

NKFLALCADSIIIGGAKLKALNLGETFVTHSKGLYRKCVKSREETGLLMPLKAPKEII

FLEGETLPTEVLTEEVVLKTGDLQPLEQPTSEAVEAPLVGTPVCINGLMLLEIKDTEK

YCALAPNMMVTNNTFTLKGGAPTKVTFGDDTVIEVQGYKSVNITFELDERIDKVLNEK

CSAYTVELGTEVNEFACVVADAVIKTLQPVSELLTPLGIDLDEWSMATYYLFDESGEF

KLASHMYCSFYPPDEDEEEGDCEEEEFEPSTQYEYGTEDDYQGKPLEFGATSAALQPE

EEQEEDWLDDDSQQTVGQQDGSEDNQTTTIQTIVEVQPQLEMELTPVVQTIEVNSFSG

YLKLTDNVYIKNADIVEEAKKVKPTVVVNAANVYLKHGGGVAGALNKATNNAMQVESD

DYIATNGPLKVGGSCVLSGHNLAKHCLHVVGPNVNKGEDIQLLKSAYENFNQHEVLLA

PLLSAGIFGADPIHSLRVCVDTVRTNVYLAVFDKNLYDKLVSSFLEMKSEKQVEQKIA

EIPKEEVKPFITESKPSVEQRKQDDKKIKACVEEVTTTLEETKFLTENLLLYIDINGN

LHPDSATLVSDIDITFLKKDAPYIVGDVVQEGVLTAVVIPTKKAGGTTEMLAKALRKV

PTDNYITTYPGQGLNGYTVEEAKTVLKKCKSAFYILPSIISNEKQEILGTVSWNLREM

LAHAEETRKLMPVCVETKAIVSTIQRKYKGIKIQEGVVDYGARFYFYTSKTTVASLIN

TLNDLNETLVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRSLKVPATVSVSSPDAVTAYNGYLTSSS

Фиг. 2B

SEQ ID NO: 2 (продолжение)

KTPEEHFIETISLAGSYKDWSYSGQSTQLGIEFLKRGDKSVYYTSNPTTFHLDGEVIT

FDNLKTLLSLREVRTIKVFTTVDNINLHTQVVDMSMTYGQQFGPTYLDGADVTKIKPH

NSHEGKTFYVLPNDDTLRVEAFEYYHTTDPSFLGRYMSALNHTKKWKYPQVNGLTSIK

WADNNCYLATALLTLQQIELKFNPPALQDAYYRARAGEAANFCALILAYCNKTVGELG

DVRETMSYLFQHANLDSCKRVLNVVCKTCGQQQTTLKGVEAVMYMGTLSYEQFKKGVQ

IPCTCGKQATKYLVQQESPFVMMSAPPAQYELKHGTFTCASEYTGNYQCGHYKHITSK

ETLYCIDGALLTKSSEYKGPITDVFYKENSYTTTIKPVTYKLDGVVCTEIDPKLDNYY

KKDNSYFTEQPIDLVPNQPYPNASFDNFKFVCDNIKFADDLNQLTGYKKPASRELKVT

FFPDLNGDVVAIDYKHYTPSFKKGAKLLHKPIVWHVNNATNKATYKPNTWCIRCLWST

KPVETSNSFDVLKSEDAQGMDNLACEDLKPVSEEVVENPTIQKDVLECNVKTTEVVGD

IILKPANNSLKITEEVGHTDLMAAYVDNSSLTIKKPNELSRVLGLKTLATHGLAAVNS

VPWDTIANYAKPFLNKVVSTTTNIVTRCLNRVCTNYMPYFFTLLLQLCTFTRSTNSRI

KASMPTTIAKNTVKSVGKFCLEASFNYLKSPNFSKLINIIIWFLLLSVCLGSLIYSTA

ALGVLMSNLGMPSYCTGYREGYLNSTNVTIATYCTGSIPCSVCLSGLDSLDTYPSLET

IQITISSFKWDLTAFGLVAEWFLAYILFTRFFYVLGLAAIMQLFFSYFAVHFISNSWL

MWLIINLVQMAPISAMVRMYIFFASFYYVWKSYVHVVDGCNSSTCMMCYKRNRATRVE

CTTIVNGVRRSFYVYANGGKGFCKLHNWNCVNCDTFCAGSTFISDEVARDLSLQFKRP

INPTDQSSYIVDSVTVKNGSIHLYFDKAGQKTYERHSLSHFVNLDNLRANNTKGSLPI

NVIVFDGKSKCEESSAKSASVYYSQLMCQPILLLDQALVSDVGDSAEVAVKMFDAYVN

TFSSTFNVPMEKLKTLVATAEAELAKNVSLDNVLSTFISAARQGFVDSDVETKDVVEC

LKLSHQSDIEVTGDSCNNYMLTYNKVENMTPRDLGACIDCSARHINAQVAKSHNIALI

WNVKDFMSLSEQLRKQIRSAAKKNNLPFKLTCATTRQVVNVVTTKIALKGGKIVNNWL

KQLIKVTLVFLFVAAIFYLITPVHVMSKHTDFSSEIIGYKAIDGGVTRDIASTDTCFA

NKHADFDTWFSQRGGSYTNDKACPLIAAVITREVGFVVPGLPGTILRTTNGDFLHFLP

RVFSAVGNICYTPSKLIEYTDFATSACVLAAECTIFKDASGKPVPYCYDTNVLEGSVA

YESLRPDTRYVLMDGSIIQFPNTYLEGSVRVVTTFDSEYCRHGTCERSEAGVCVSTSG

RWVLNNDYYRSLPGVFCGVDAVNLLTNMFTPLIQPIGALDISASIVAGGIVAIVVTCL

Фиг. 2C

SEQ ID NO: 2 (продолжение)

AYYFMRFRRAFGEYSHVVAFNTLLFLMSFTVLCLTPVYSFLPGVYSVIYLYLTFYLTN

DVSFLAHIQWMVMFTPLVPFWITIAYIICISTKHFYWFFSNYLKRRVVFNGVSFSTFE

EAALCTFLLNKEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYNKYKYFSGAMDTTSYREAACCHL

AKALNDFSNSGSDVLYQPPQTSITSAVLQSGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNG

LWLDDVVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIRKSNHNFLVQAGNVQLRVIGHSMQNCVL

KLKVDTANPKTPKYKFVRIQPGQTFSVLACYNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSC

GSVGFNIDYDCVSFCYMHHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITVN

VLAWLYAAVINGDRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKYNYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAV

LDMCASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTPFDVVRQCSGVTFQSAVKRTIKGTHHW

LLLTILTSLLVLVQSTQWSLFFFLYENAFLPFAMGIIAMSAFAMMFVKHKHAFLCLFL

LPSLATVAYFNMVYMPASWVMRIMTWLDMVDTSLSGFKLKDCVMYASAVVLLILMTAR

TVYDDGARRVWTLMNVLTLVYKVYYGNALDQAISMWALIISVTSNYSGVVTTVMFLAR

GIVFMCVEYCPIFFITGNTLQCIMLVYCFLGYFCTCYFGLFCLLNRYFRLTLGVYDYL

VSTQEFRYMNSQGLLPPKNSIDAFKLNIKLLGVGGKPCIKVATVQSKMSDVKCTSVVL

LSVLQQLRVESSSKLWAQCVQLHNDILLAKDTTEAFEKMVSLLSVLLSMQGAVDINKL

CEEMLDNRATLQAIASEFSSLPSYAAFATAQEAYEQAVANGDSEVVLKKLKKSLNVAK

SEFDRDAAMQRKLEKMADQAMTQMYKQARSEDKRAKVTSAMQTMLFTMLRKLDNDALN

NIINNARDGCVPLNIIPLTTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTTFTYASALWEIQQVVDA

DSKIVQLSEISMDNSPNLAWPLIVTALRANSAVKLQNNELSPVALRQMSCAAGTTQTA

CTDDNALAYYNTTKGGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSDGTGTIYTELEPPCRFVTDTP

KGPKVKYLYFIKGLNNLNRGMVLGSLAATVRLQAGNATEVPANSTVLSFCAFAVDAAK

AYKDYLASGGQPITNCVKMLCTHTGTGQAITVTPEANMDQESFGGASCCLYCRCHIDH

PNPKGFCDLKGKYVQIPTTCANDPVGFTLKNTVCTVCGMWKGYGCSCDQLREPMLQSA

DAQSFLNRVCGVSAARLTPCGTGTSTDVVYRAFDIYNDKVAGFAKFLKTNCCRFQEKD

EDDNLIDSYFVVKRHTFSNYQHEETIYNLLKDCPAVAKHDFFKFRIDGDMVPHISRQR

LTKYTMADLVYALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKKDWYDFVENPDILRVYA

NLGERVRQALLKTVQFCDAMRNAGIVGVLTLDNQDLNGNWYDFGDFIQTTPGSGVPVV

Фиг. 2D

SEQ ID NO: 2 (продолжение)

DSYYSLLMPILTLTRALTAESHVDTDLTKPYIKWDLLKYDFTEERLKLFDRYFKYWDQ

TYHPNCVNCLDDRCILHCANFNVLFSTVFPPTSFGPLVRKIFVDGVPFVVSTGYHFRE

LGVVHNQDVNLHSSRLSFKELLVYAADPAMHAASGNLLLDKRTTCFSVAALTNNVAFQ

TVKPGNFNKDFYDFAVSKGFFKEGSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYYRYNLPTMCDI

RQLLFVVEVVDKYFDCYDGGCINANQVIVNNLDKSAGFPFNKWGKARLYYDSMSYEDQ

DALFAYTKRNVIPTITQMNLKYAISAKNRARTVAGVSICSTMTNRQFHQKLLKSIAAT

RGATVVIGTSKFYGGWHNMLKTVYSDVENPHLMGWDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLAR

KHTTCCSLSHRFYRLANECAQVLSEMVMCGGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQ

AVTANVNALLSTDGNKIADKYVRNLQHRLYECLYRNRDVDTDFVNEFYAYLRKHFSMM

ILSDDAVVCFNSTYASQGLVASIKNFKSVLYYQNNVFMSEAKCWTETDLTKGPHEFCS

QHTMLVKQGDDYVYLPYPDPSRILGAGCFVDDIVKTDGTLMIERFVSLAIDAYPLTKH

PNQEYADVFHLYLQYIRKLHDELTGHMLDMYSVMLTNDNTSRYWEPEFYEAMYTPHTV

LQAVGACVLCNSQTSLRCGACIRRPFLCCKCCYDHVISTSHKLVLSVNPYVCNAPGCD

VTDVTQLYLGGMSYYCKSHKPPISFPLCANGQVFGLYKNTCVGSDNVTDFNAIATCDW

TNAGDYILANTCTERLKLFAAETLKATEETFKLSYGIATVREVLSDRELHLSWEVGKP

RPPLNRNYVFTGYRVTKNSKVQIGEYTFEKGDYGDAVVYRGTTTYKLNVGDYFVLTSH

TVMPLSAPTLVPQEHYVRITGLYPTLNISDEFSSNVANYQKVGMQKYSTLQGPPGTGK

SHFAIGLALYYPSARIVYTACSHAAVDALCEKALKYLPIDKCSRIIPARARVECFDKF

KVNSTLEQYVFCTVNALPETTADIVVFDEISMATNYDLSVVNARLRAKHYVYIGDPAQ

LPAPRTLLTKGTLEPEYFNSVCRLMKTIGPDMFLGTCRRCPAEIVDTVSALVYDNKLK

AHKDKSAQCFKMFYKGVITHDVSSAINRPQIGVVREFLTRNPAWRKAVFISPYNSQNA

VASKILGLPTQTVDSSQGSEYDYVIFTQTTETAHSCNVNRFNVAITRAKVGILCIMSD

RDLYDKLQFTSLEIPRRNVATLQAENVTGLFKDCSKVITGLHPTQAPTHLSVDTKFKT

EGLCVDIPGIPKDMTYRRLISMMGFKMNYQVNGYPNMFITREEAIRHVRAWIGFDVEG

CHATREAVGTNLPLQLGFSTGVNLVAVPTGYVDTPNNTDFSRVSAKPPPGDQFKHLIP

LMYKGLPWNVVRIKIVQMLSDTLKNLSDRVVFVLWAHGFELTSMKYFVKIGPERTCCL

CDRRATCFSTASDTYACWHHSIGFDYVYNPFMIDVQQWGFTGNLQSNHDLYCQVHGNA

Фиг. 2E

SEQ ID NO: 2 (продолжение)

HVASCDAIMTRCLAVHECFVKRVDWTIEYPIIGDELKINAACRKVQHMVVKAALLADK

FPVLHDIGNPKAIKCVPQADVEWKFYDAQPCSDKAYKIEELFYSYATHSDKFTDGVCL

FWNCNVDRYPANSIVCRFDTRVLSNLNLPGCDGGSLYVNKHAFHTPAFDKSAFVNLKQ

LPFFYYSDSPCESHGKQVVSDIDYVPLKSATCITRCNLGGAVCRHHANEYRLYLDAYN

MMISAGFSLWVYKQFDTYNLWNTFTRLQSLENVAFNVVNKGHFDGQQGEVPVSIINNT

VYTKVDGVDVELFENKTTLPVNVAFELWAKRNIKPVPEVKILNNLGVDIAANTVIWDY

KRDAPAHISTIGVCSMTDIAKKPTETICAPLTVFFDGRVDGQVDLFRNARNGVLITEG

SVKGLQPSVGPKQASLNGVTLIGEAVKTQFNYYKKVDGVVQQLPETYFTQSRNLQEFK

PRSQMEIDFLELAMDEFIERYKLEGYAFEHIVYGDFSHSQLGGLHLLIGLAKRFKESP

FELEDFIPMDSTVKNYFITDAQTGSSKCVCSVIDLLLDDFVEIIKSQDLSVVSKVVKV

TIDYTEISFMLWCKDGHVETFYPKLQSSQAWQPGVAMPNLYKMQRMLLEKCDLQNYGD

SATLPKGIMMNVAKYTQLCQYLNTLTLAVPYNMRVIHFGAGSDKGVAPGTAVLRQWLP

TGTLLVDSDLNDFVSDADSTLIGDCATVHTANKWDLIISDMYDPKTKNVTKENDSKEG

FFTYICGFIQQKLALGGSVAIKITEHSWNADLYKLMGHFAWWTAFVTNVNASSSEAFL

IGCNYLGKPREQIDGYVMHANYIFWRNTNPIQLSSYSLFDMSKFPLKLRGTAVMSLKE

GQINDMILSLLSKGRLIIRENNRVVISSDVLVNN (SEQ ID NO:2)

Фиг. 3A

SEQ ID NO: 3

(поверхностный гликопротеин (спайк-белок) SARS-CoV-2; GenBank: QHD43416.1)

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTK
RFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWME
SEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPI
GINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTV
EKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPT
KLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLK
PFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCV
NFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVN
CTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSII
AYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGI
AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAAR
DLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIA
NQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRL
QSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTA
PAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKY
FKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTI
MLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT (SEQ ID NO:3)

Фиг. 3B

(RBD участок спайк-белка)

NITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV
RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYR**L**FRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVE
G**F**NCYFPL**QS**YGFQPT**N**GVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP (SEQ ID NO: 446)

Фиг. 4

SEQ ID NO: 4

(белок ORF3A SARS-CoV-2; GenBank: QHD43417.1)

MDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQASLPFGWLIVGVALLAVFQSASKIITLKKRWQLALSKGV
HFVCNLLLLFVTVYSHLLLVAAGLEAPFLYLYALVYFLQSINFVRIIMRLWLCWKCRSKNPLLYDANYFLCWHTNCY
DYCIPYNSVTSSIVITSGDGTTSPISEHDYQIGGYTEKWESGVKDCVVLHSYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVTFF
IYNKIVDEPEEHVQIHTIDGSSGVVNPVMEPIYDEPTTTTSVPL (SEQ ID NO:4)

Фиг. 5

SEQ ID NO: 5

(белок оболочки SARS-CoV-2; GenBank: QHD43418.1)

MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVSLVKPSFYVYSRVKNLNSSRVPDLLV
(SEQ ID NO: 5)

Фиг. 6

SEQ ID NO: 6

(мембранный гликопротеин SARS-CoV-2; GenBank: QHD43419.1)

MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFLTWICLLQFAYANRNRFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAVYRINWIT
GGIAIAMACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESELVIGAVILRGHLRIAGH
HLGRCDIKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLNTDHSSSSDNIA (SEQ ID
NO:6)

Фиг. 7

SEQ ID NO: 7

(белок ORF6 SARS-CoV-2; GenBank: QHD43420.1)

MFHLVDFQVTIAEILLIIMRTFKVSIWNLDYIINLIIKNLSKSLTENKYSQLDEEQPMEID (SEQ ID NO:7)

Фиг. 8

SEQ ID NO: 8

(белок ORF7a SARS-CoV-2; GenBank: QHD43421.1)

MKIILFLALITLATCELYHYQECVRGTTVLLKEPCSSGTYEGNSPFHPLADNKFALTCFSTQFAFACPDGVKHVYQL

RARSVSPKLFIRQEEVQELYSPIFLIVAAIVFITLCFTLKRKTE (SEQ ID NO:8)

Фиг. 9

SEQ ID NO: 9

(белок ORF8 SARS-CoV-2; GenBank: QHD43422.1)

MKFLVFLGIITTVAAFHQECSLQSCTQHQPYVVDDPCPIHFYSKWYIRVGARKSAPLIELCVDEAGSKSPIQYIDIG

NYTVSCLPFTINCQEPKLGSLVVRCSFYEDFLEYHDVRVVLDFI (SEQ ID NO:9)

Фиг. 10

SEQ ID NO: 10

(фосфопротеин нуклеокапсида SARS-CoV-2; GenBank: QHD43423.2)

MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPINTN

SSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPEAGLPYGANKDGIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANN

AAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRSRNSSRNSTPGSSRGTSPARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLE

SKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFA

PSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQR

QKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA (SEQ ID NO:10)

Фиг. 11

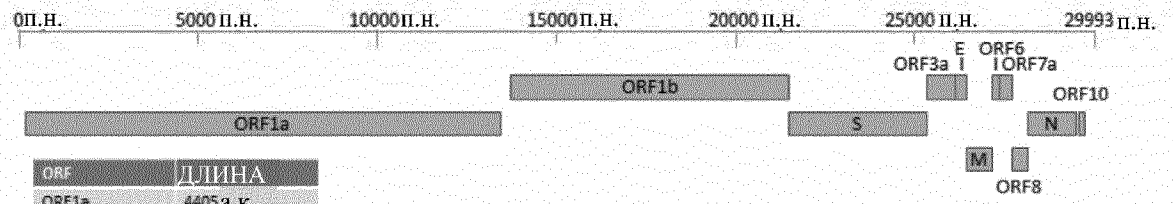
SEQ ID NO: 11

(белок ORF10 SARS-CoV-2; GenBank: QHI42199.1)

MGYINVFAFPFTIYSLLLCRMNSRNYIAQVDVVNFNLT (SEQ ID NO:11)

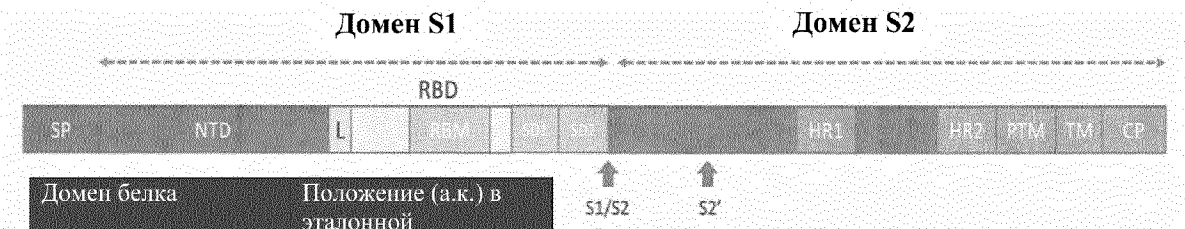
Изолят вируса пневмонии с уханьского рынка морепродуктов Wuhan-Hu-1, полный геном

Эталонная последовательность в NCBI: NC_045512.2



ORF	ДЛИНА
ORF1a	4405 а.к.
ORF1b	2595 а.к.
S	1282 а.к.
ORF3a	275 а.к.
E	75 а.к.
M	222 а.к.
ORF6	61 а.к.
ORF7a	121 а.к.
ORF8	121 а.к.
N	419 а.к.
ORF10	38 а.к.

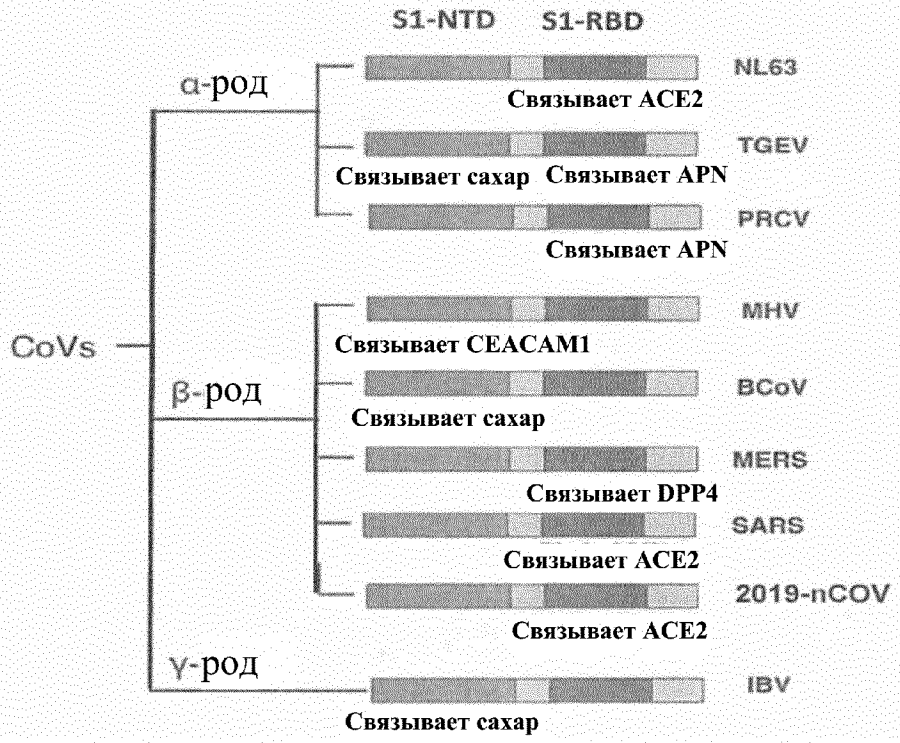
Фиг. 12



Домен белка	Положение (а.к.) в эталонной последовательности NC_045512.2
Сигнальный пептид (SP)	1-15
Домен S1	16-685
Домен S2	686-1273
Расщепление S1/S2	685/686
Расщепление S2'	815/816
N-концевой домен NTD	16-305
Линкер	306-330
Рецептор-связывающий домен (RBD)	331-527
Рецептор-связывающий мотив (RBM)	436-509
Субдомен 1 (SD1)	528-589
Субдомен 2 (SD2)	590-676
Гептадный повтор 1 (HR1)	920-970
Гептадный повтор 2 (HR2)	1163-1202
Пред-трансмембранный домен (PTM)	1203-1220
Трансмембранный домен (TM)	1214-1234
Предполагаемый пептид слияния 1	788-806
Предполагаемый пептид слияния 2	891-906
Предполагаемый пептид слияния 3	816-837
Предполагаемый пептид слияния 4	816-855

Фиг. 13

Фиг. 14



Фиг. 15

Положение	455	486	493	494	501
Амино-кислотные остатки	L	F	Q	S	N
	Y	L	N	D	T
	Y	L	K	D	S
	Y	P	N	G	S
	Y	P	R	G	S
	F	F	N	D	S
	F или Y	F, L или P	N, R или K	D или G	T или S
	F	F	N	D	T
	Y или F	P, L или F	R, K или N	G или D	T или S
	Y	P	R	G	T
	S	F	N	D	N
	Y, F, L или S	L, F или P	N, Q, R или K	D, G или S	T, S или N
	Алифатические, ароматические или небольшие остатки	Алифатические, ароматические или P	Незаряженные полярные или положительно заряженные остатки	Небольшие остатки или отрицательно заряженные остатки	Небольшие остатки или незаряженные полярные

Фиг. 16

SEQ ID NO: 12

(спайк-белок SARS-CoV-2 (GenBank: QHD43416.1) с выделенной подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и последовательностями RBD)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWF
HAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLG
VYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQG
FSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPL
SETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYN
YLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP
KKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNT
SNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSP
RRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIK
QYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVT
QNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEA
EVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVT
YVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQP
ELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGF
IAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT (SEQ ID NO: 12)

Фиг. 17A

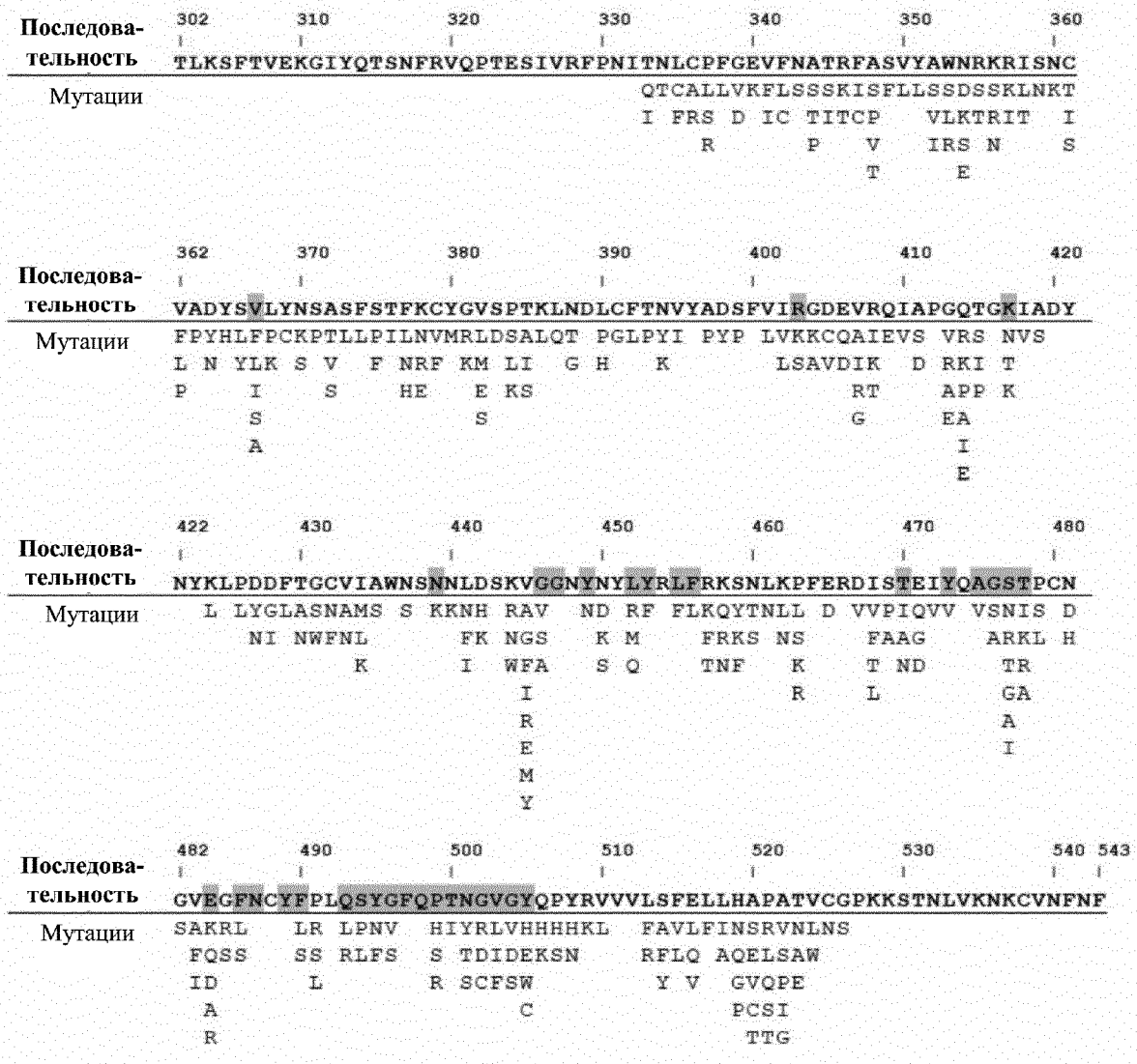
SEQ ID NO: 13

(домен S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с выделенной подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и последовательностью RBD)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWF
HAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLG
VYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQG
FSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPL
SETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSAS
FSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYN
YLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP
KKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNT
SNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSP
RRAR (SEQ ID NO: 13)

Фиг. 17B

SEQ ID NO: 411



Фиг. 18

SEQ ID NO: 14

(рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с сигнальной последовательностью pTA (курсивом) и выделенными подчеркиванием короткими фланкирующими последовательностями)

*MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGS*RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVL YNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV GGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPA TVCGPKKSTNLVKNK (SEQ ID NO: 14)

Фиг. 19

SEQ ID NO: 15

(рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с сигнальной последовательностью pTA (курсивом) и выделенными подчеркиванием длинными фланкирующими последовательностями)

*MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGS*TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVY AWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD FTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGY QPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNF (SEQ ID NO: 15)

Фиг. 20

SEQ ID NO: 16

(рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с консервативными заменами в положениях 455, 486, 493, 494 и 501)

NITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYR(455)FRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC NGVEG(486)NCYFPL(493)(494)YGFQPT(501)GVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP (SEQ ID NO: 16)

Фиг. 21

SEQ ID NO: 17

(рецептор-связывающий домен (RBD) домена S1 спайк-белка SARS-CoV-2 с консервативными заменами в положениях 455, 486, 493, 494 и 501)

NSNNLDSKVGGNYNYLYR(455)FRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEG(486)NCYFPL(493)(494)YGF

QPT(501)GVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP (SEQ ID NO: 17)

Фиг. 22

SEQ ID NO: 18

(спайк-белок SARS-CoV-2 с выделенной подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и заменами в сайтах S1/S2, S2' и HR1)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPF
FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVI
KVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNID
GYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVG
YLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPF
GEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR
QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGST
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTG
TGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCT
EVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPQQAQSVA
SQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIADAGFIKQYG
DCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNG
IGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLN
DILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYH
LMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTD
NTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNE
VAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDE
DDSEPVLKGVKLHYT

Сайт S1/S2 RRAR заменены на QQAQ

Сайт S2' FIEDLLFNKVTLAD заменены на FI----------AD

Сайт HR1 LDKV заменены на LDPP

Фиг. 23

SEQ ID NO: 19

(спайк-белок SARS-CoV-2 с выделенной подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и заменами в сайтах S1/S2, S2' и HR1)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPF
FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVI
KVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNID
GYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVG
YLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPF
GEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR
QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGST
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTG
TGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCT
EVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSGAGSVA
SQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKQSFIEDLLFNKVTL
ADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPF
AMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSS
NFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSK
RVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRN
FYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVN
IQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCC
SCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

Сайт S1/S2	RRAR заменены на	SGAG
Сайт S2'	PSKR заменены на	PSKQ
Сайт HR1	LDKV заменены на	LDPP

Фиг. 24

SEQ ID NO: 20

(спайк-белок SARS-CoV-2 с выделенной подчеркиванием сигнальной последовательностью pTA и заменами в сайтах S1/S2, S2', HR1, сайтами пептида слияния и мотива для удержания в ER)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSGTGSVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPF
FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVI
KVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNID
GYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVG
YLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPF
GEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVR
QIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGST
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTG
TGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCT
EVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSGAGSVA
SQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKQSFIEDPLFNKVTL
ADPGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPF
AMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSS
NFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSK
RVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRN
FYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVN
IQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCC
SCGSCCKFDEDDSEPVLKGVALAYT

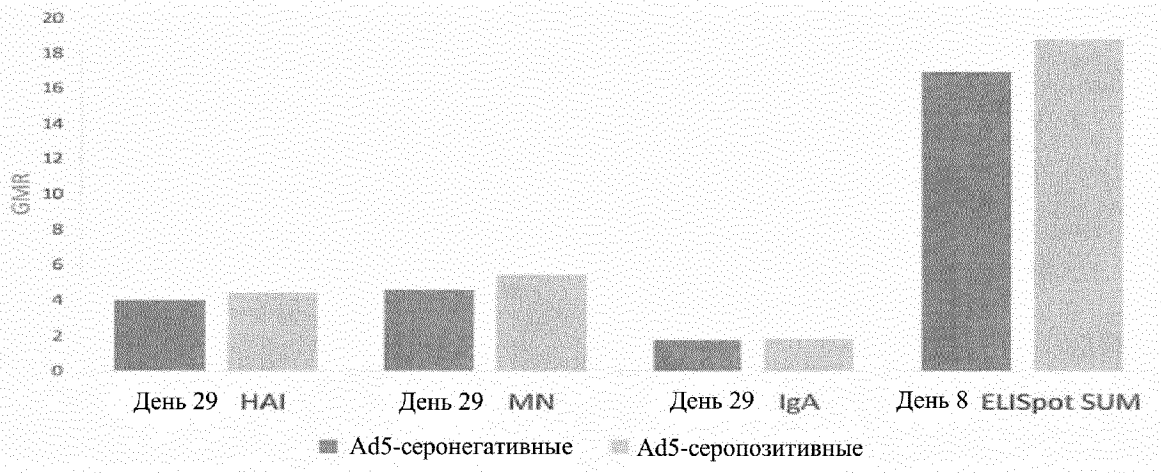
Сайт S1/S2	RRAR заменены на SGAG
Сайт S2'	PSKR заменены на PSKQ
Сайт HR1	LDKV заменены на LDPP
Пептид слияния	SFIEDLLFNKVTLADAGF заменены на SFIEDPLFNKVTLADPGF
Мотив для удержания в ER	KLHYT заменены на ALAYT

Фиг. 25

	Положительный в отношении Ad5 согласно ПЦР (%)		
	10^9 vp n=15	10^{10} vp n=15	10^{11} vp n=15
День 4	47%	60%	80%
День 8	7%	13%	20%
День 15	0%	0%	0%

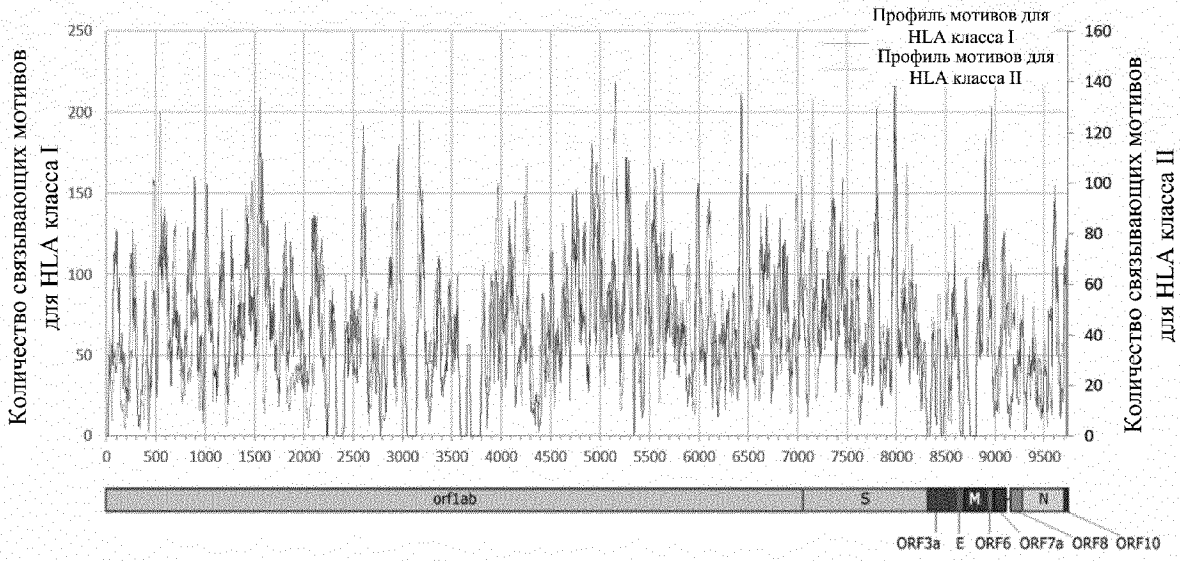
GMR для антитела к Ad5 в День 29 в сравнении с исходным уровнем (95% CI)		
10^9 vp n=15	10^{10} vp n=15	10^{11} vp n=15
1.67 (0.96 – 2.93)	1.58 (1.06 – 2.35)	2.34 (1.37 – 4.13)

Фиг. 26



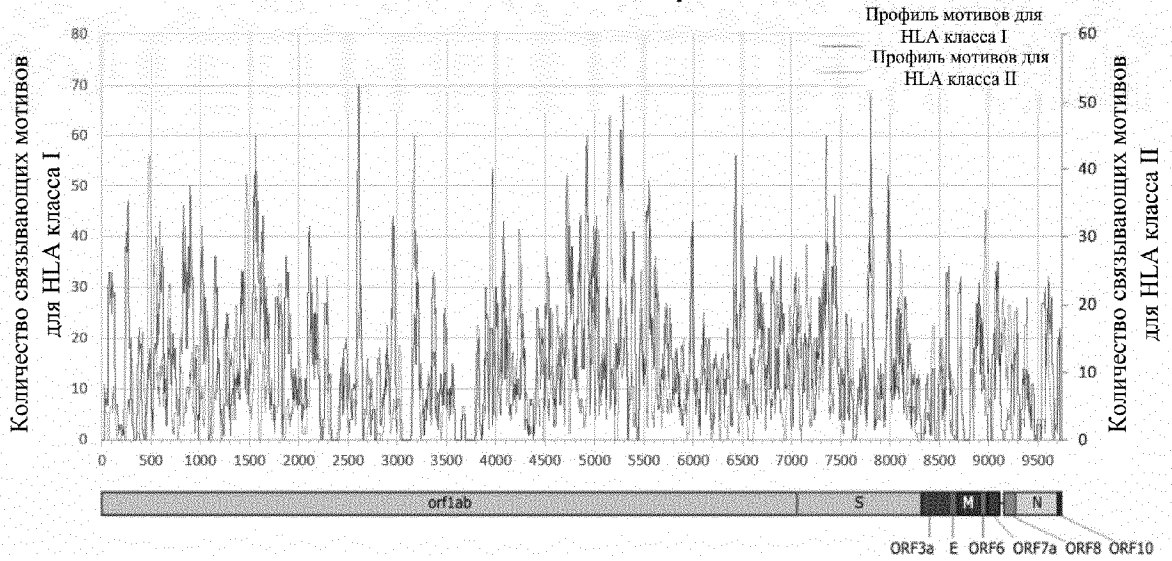
Фиг. 27

Профили высокоаффинных связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II во всем протеоме SARS-CoV-2



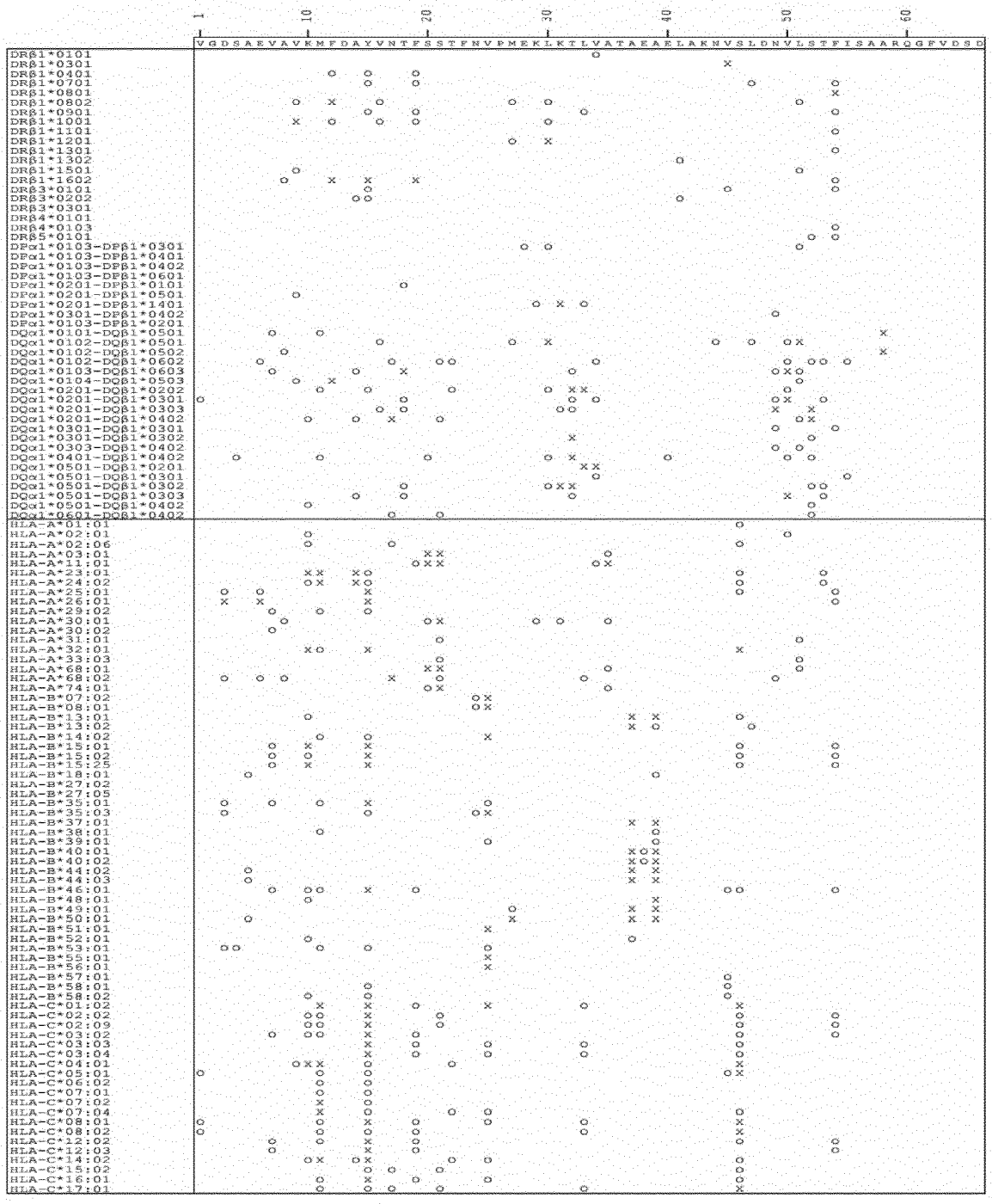
Фиг. 28

Профили связывающих мотивов с высокой и умеренной аффиностью для HLA класса I и HLA класса II во всем протеоме SARS-CoV-2



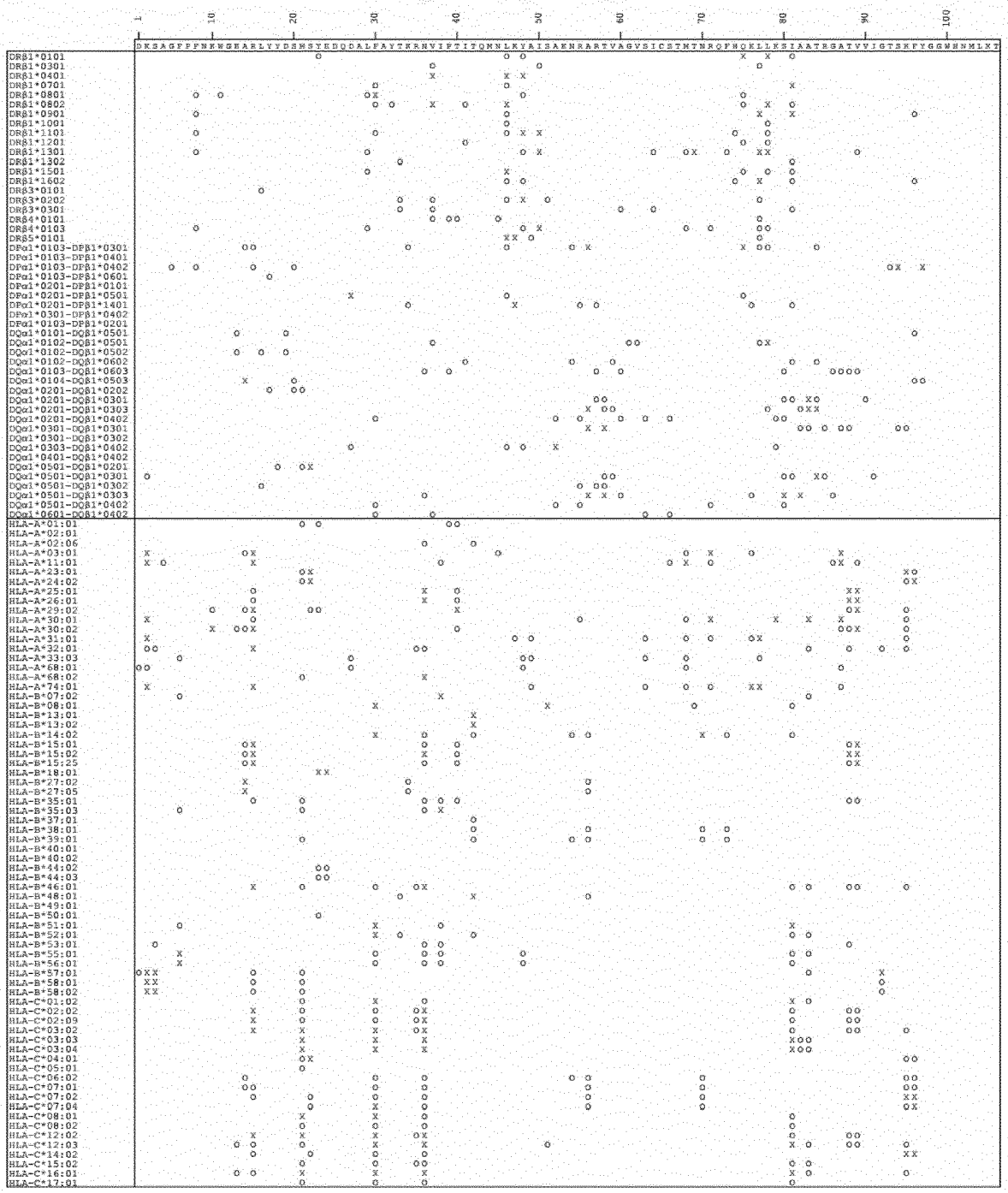
Фиг. 29

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 328



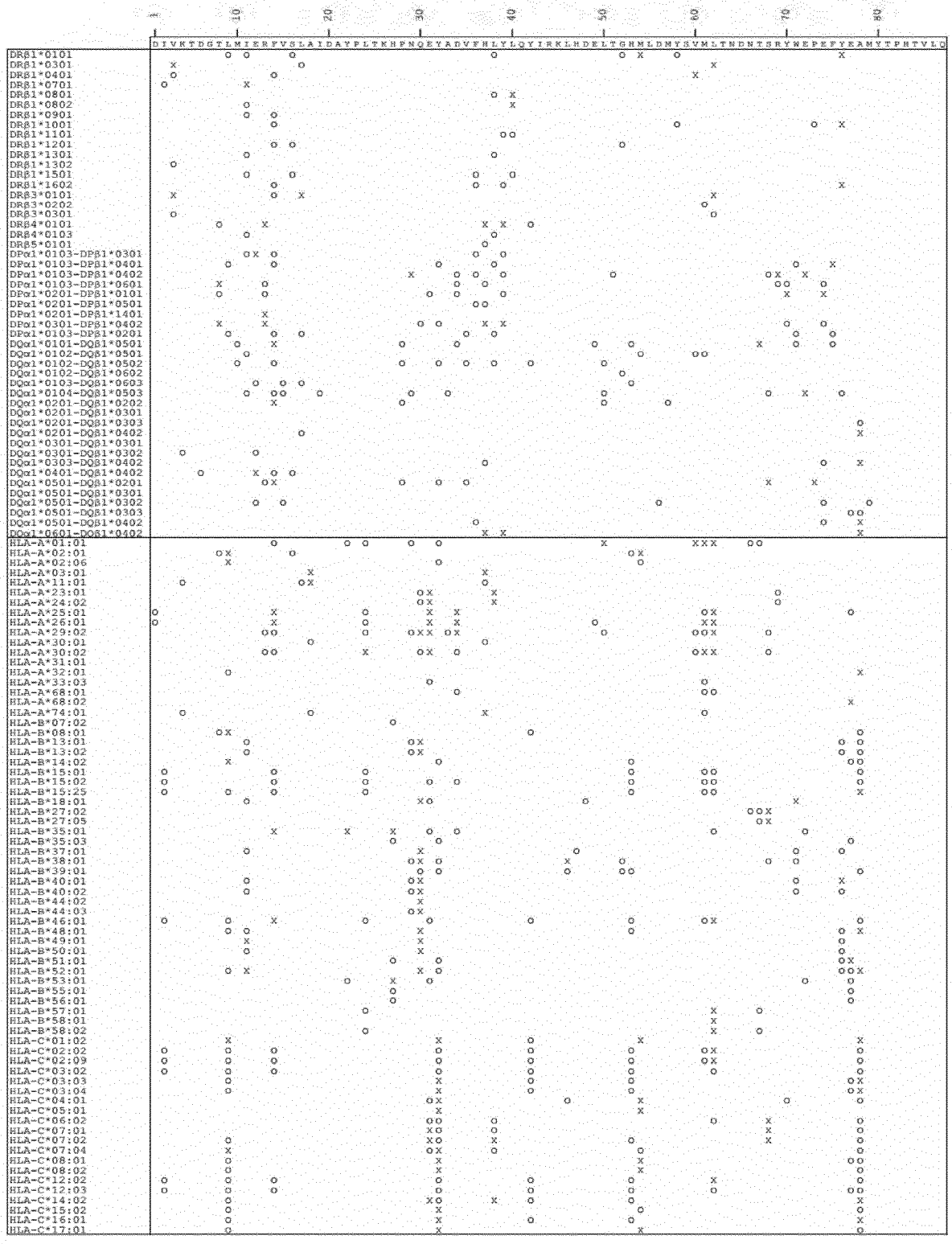
Фиг. 30

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 329



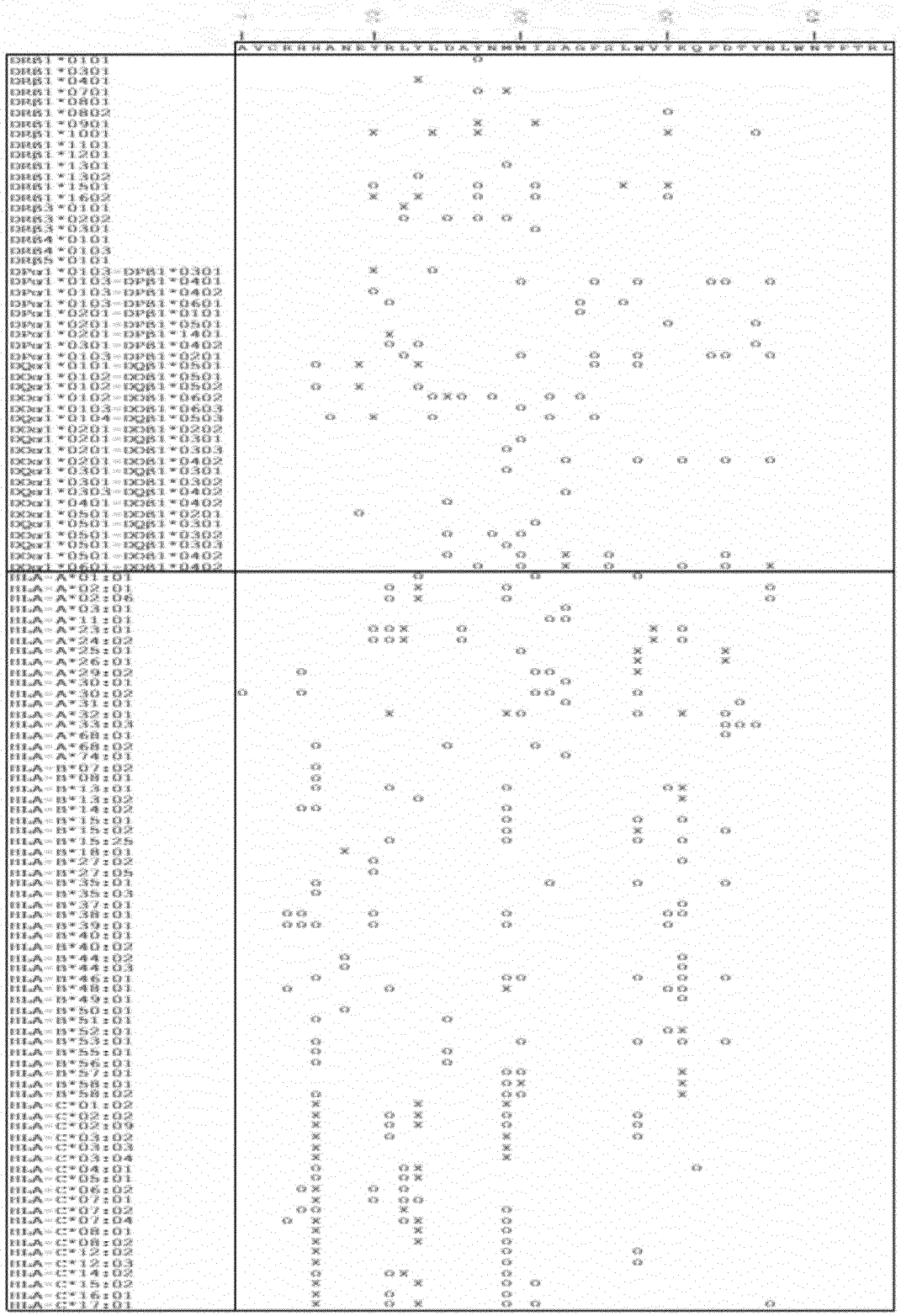
Фиг. 31

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 330



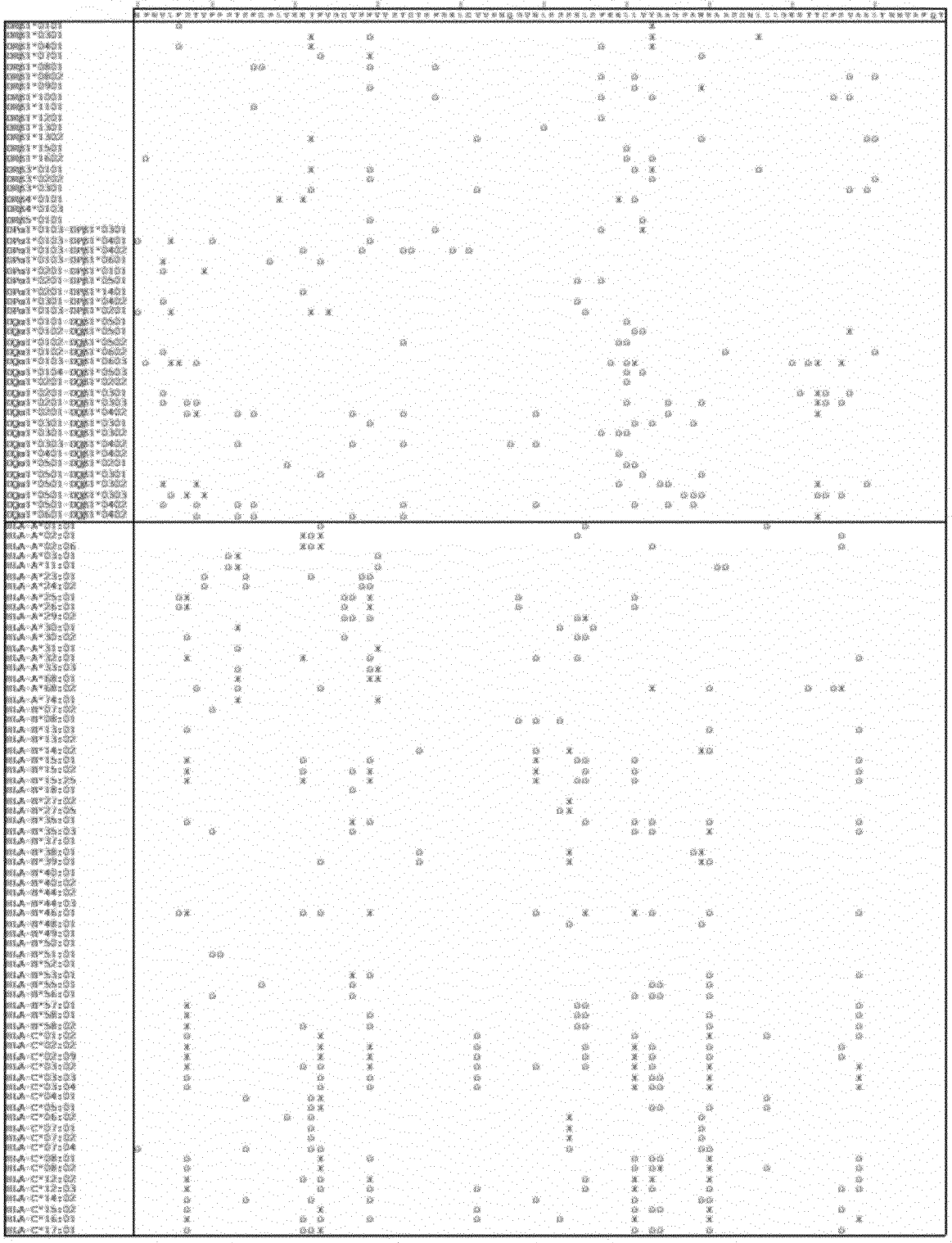
Фиг. 32

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 331



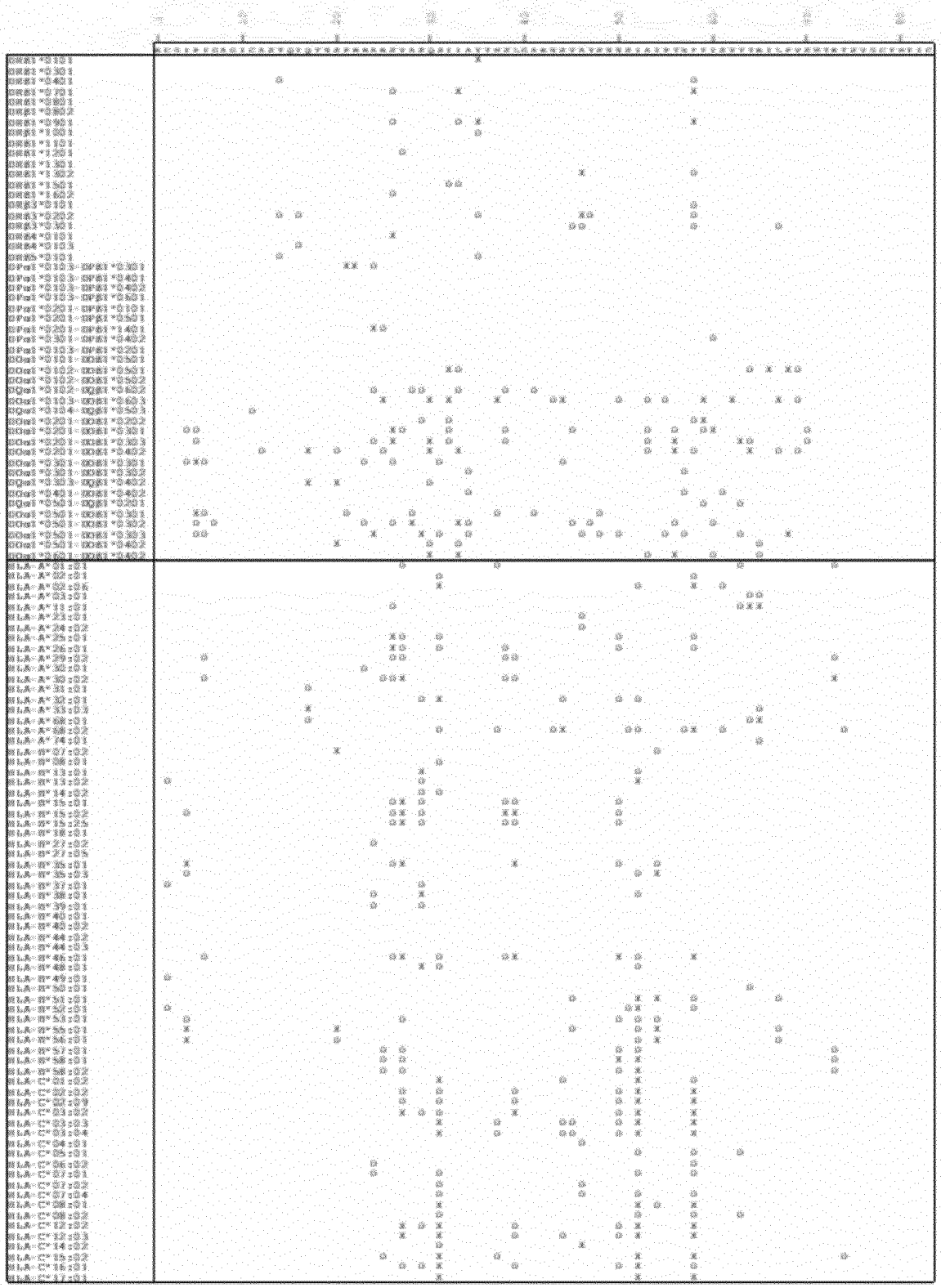
Фиг. 33

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 332



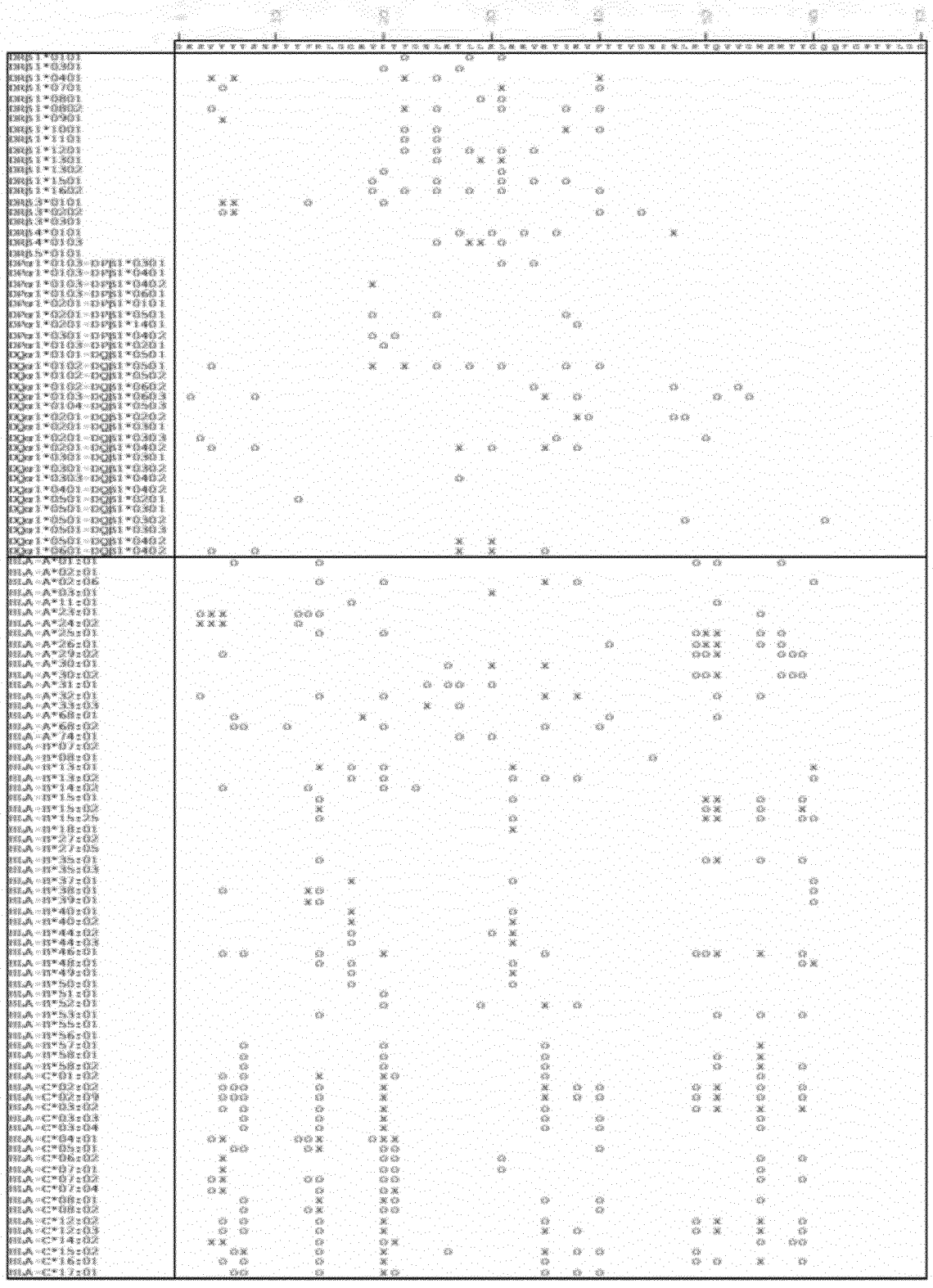
Фиг. 34

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 333



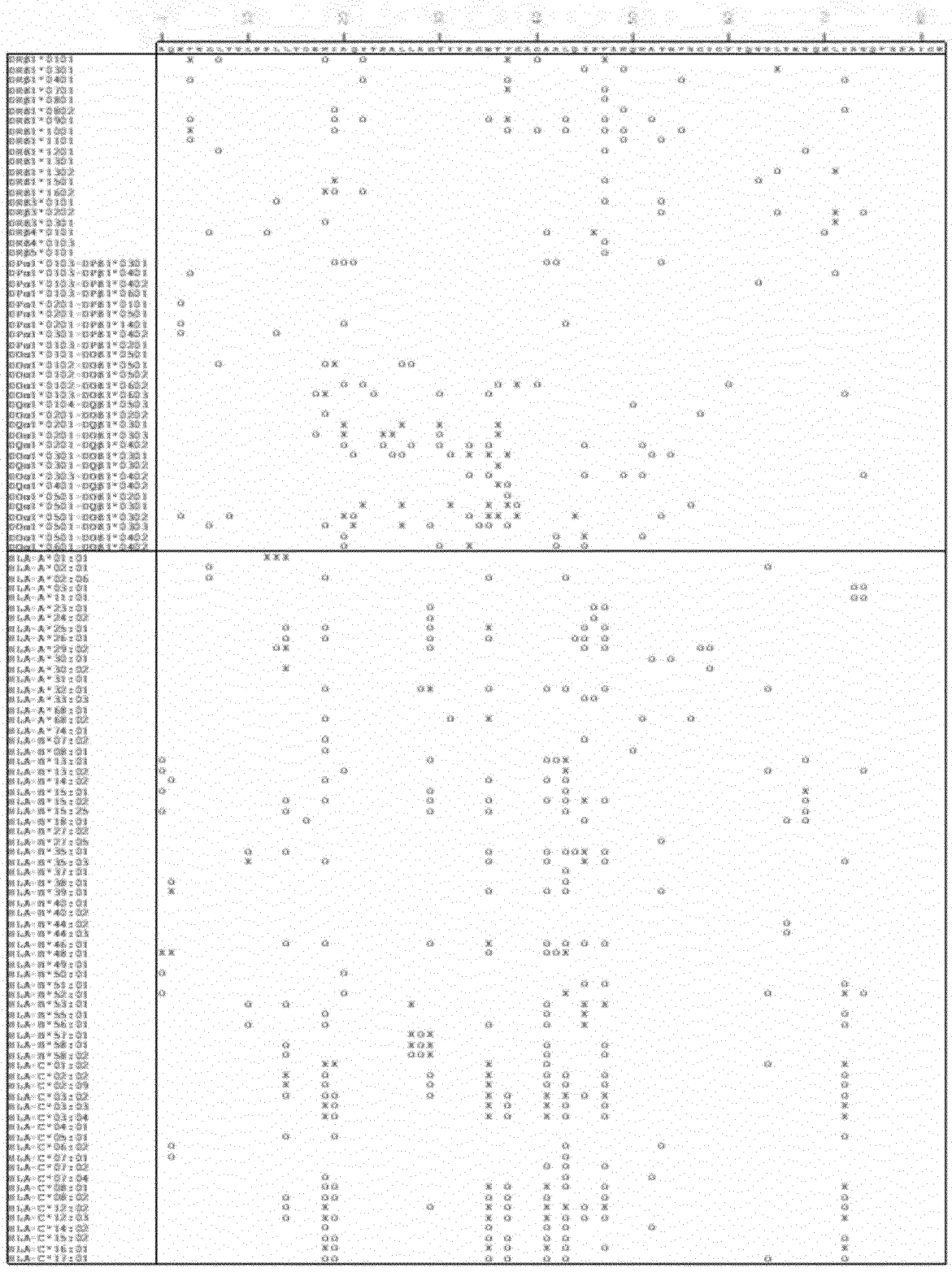
Фиг. 35

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 334



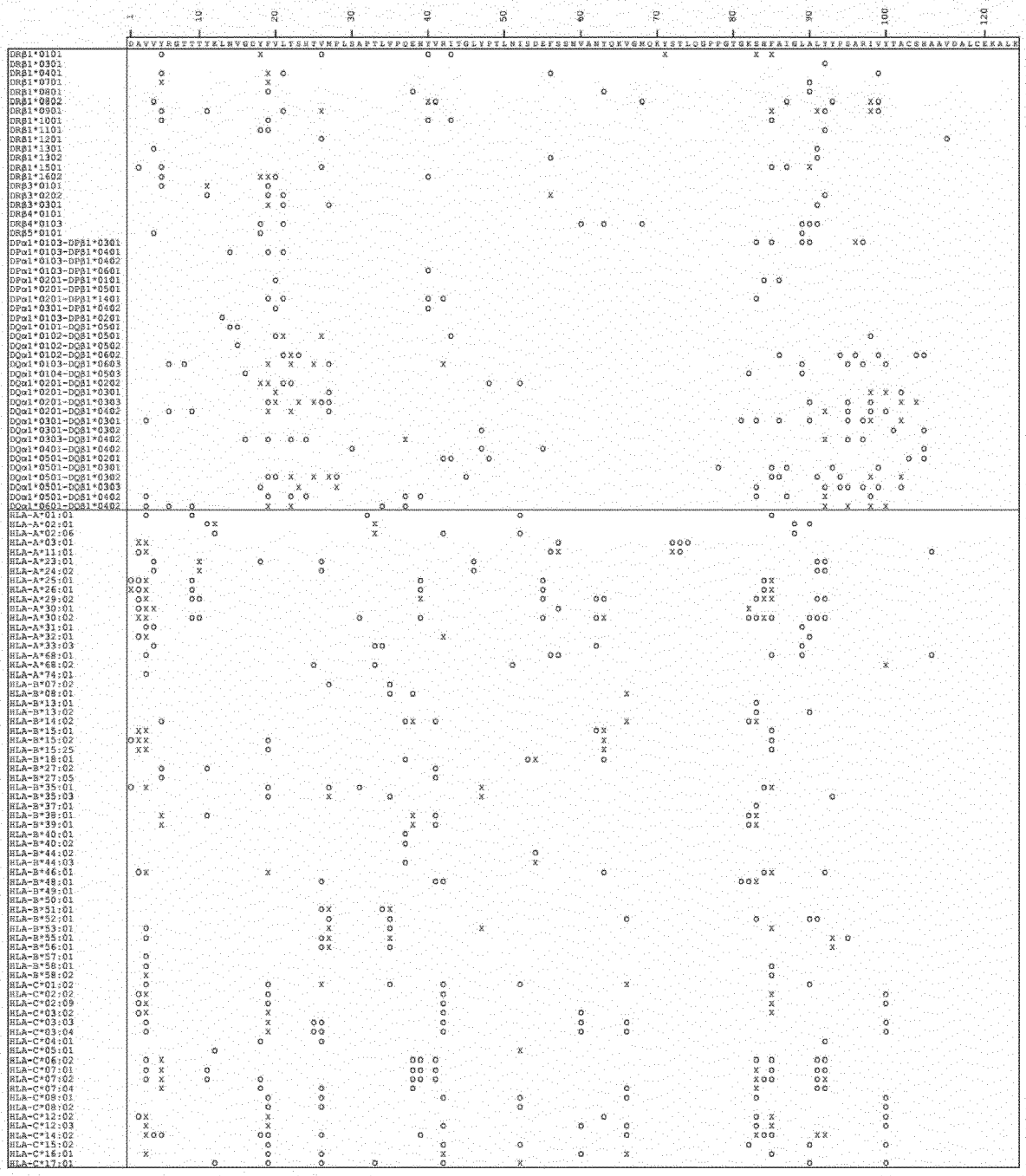
Фиг. 36

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 335



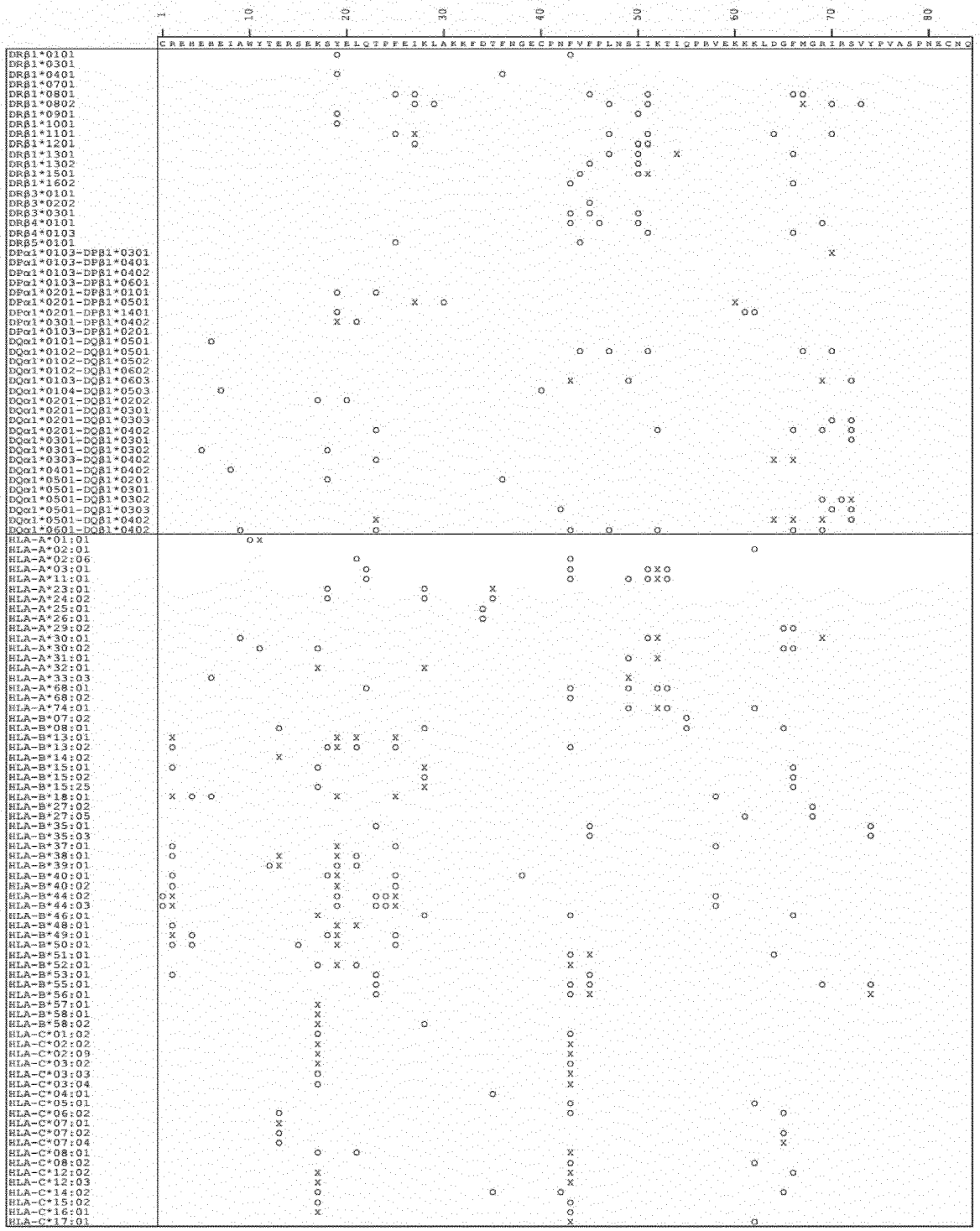
Фиг. 37

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 336



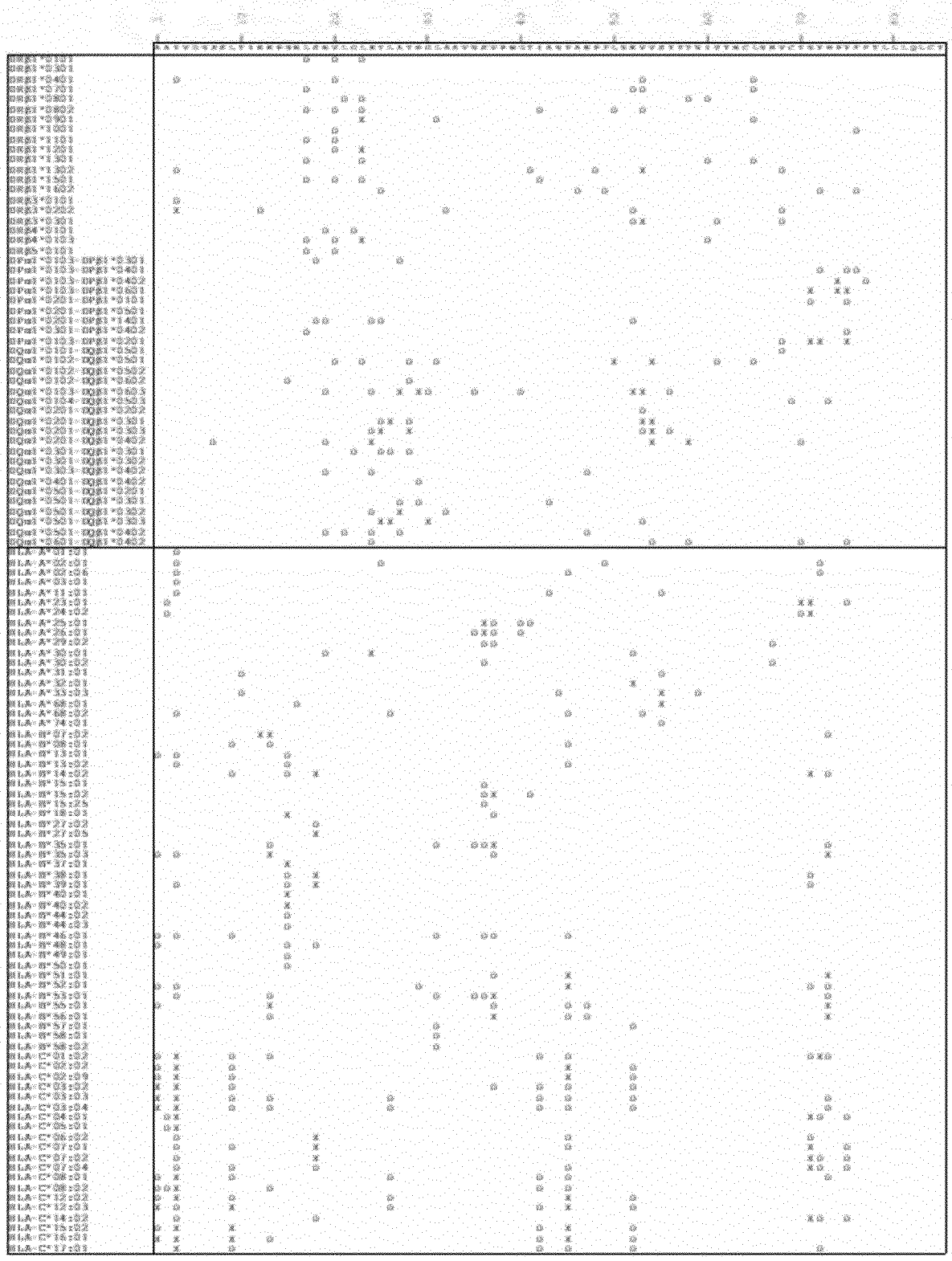
Фиг. 38

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 337



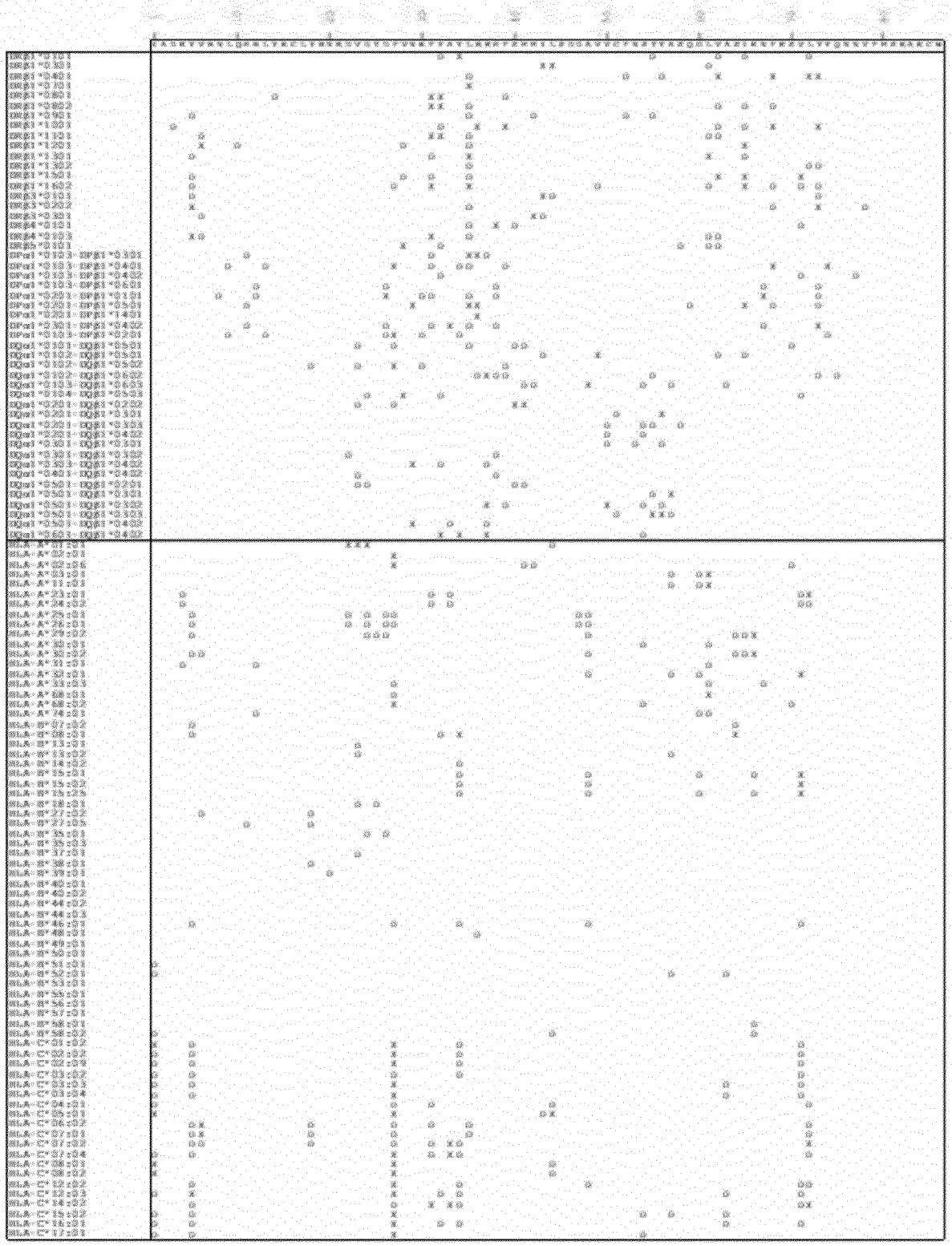
Фиг. 39

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 338



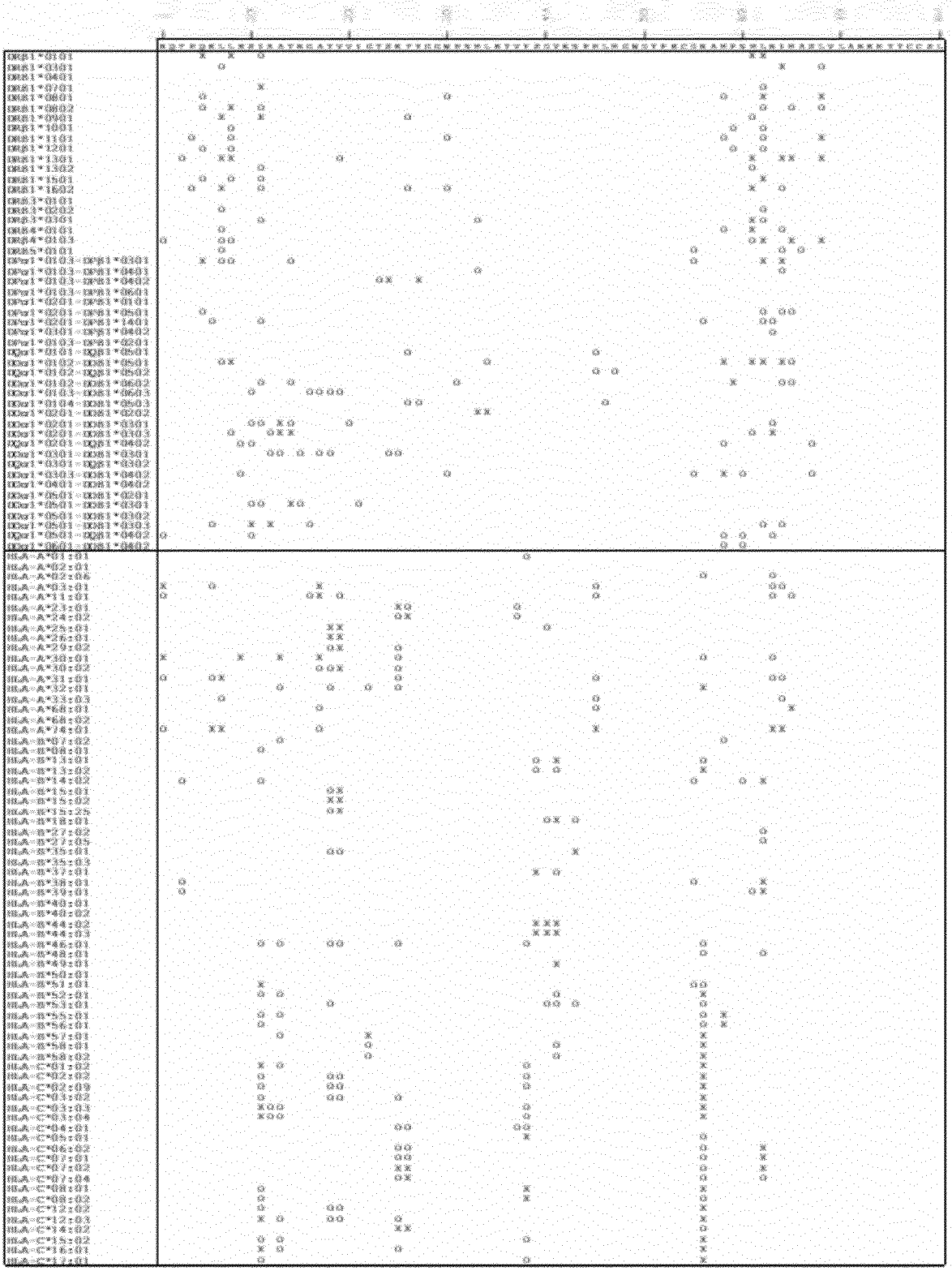
Фиг. 40

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 339



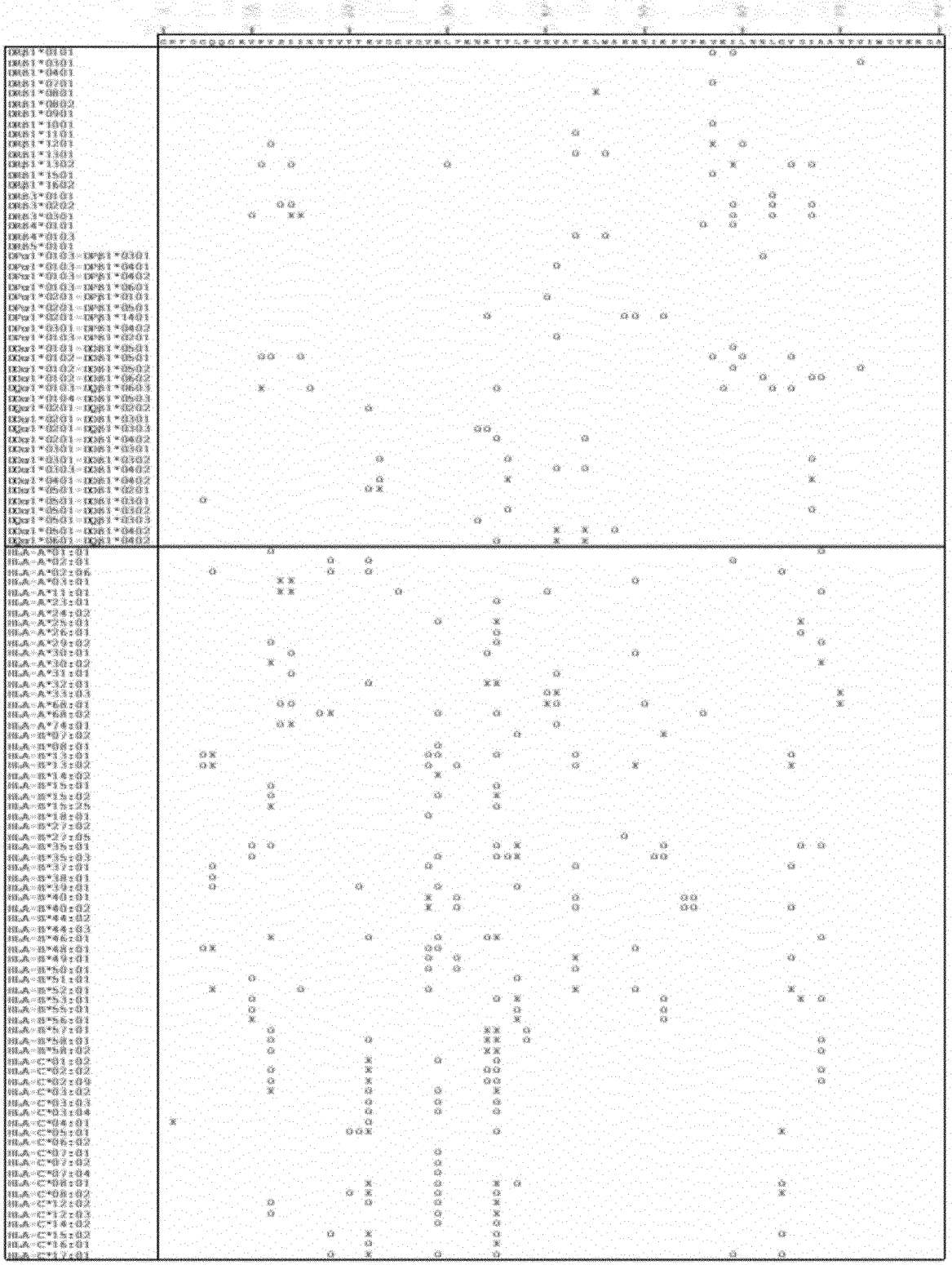
Фиг. 41

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 340



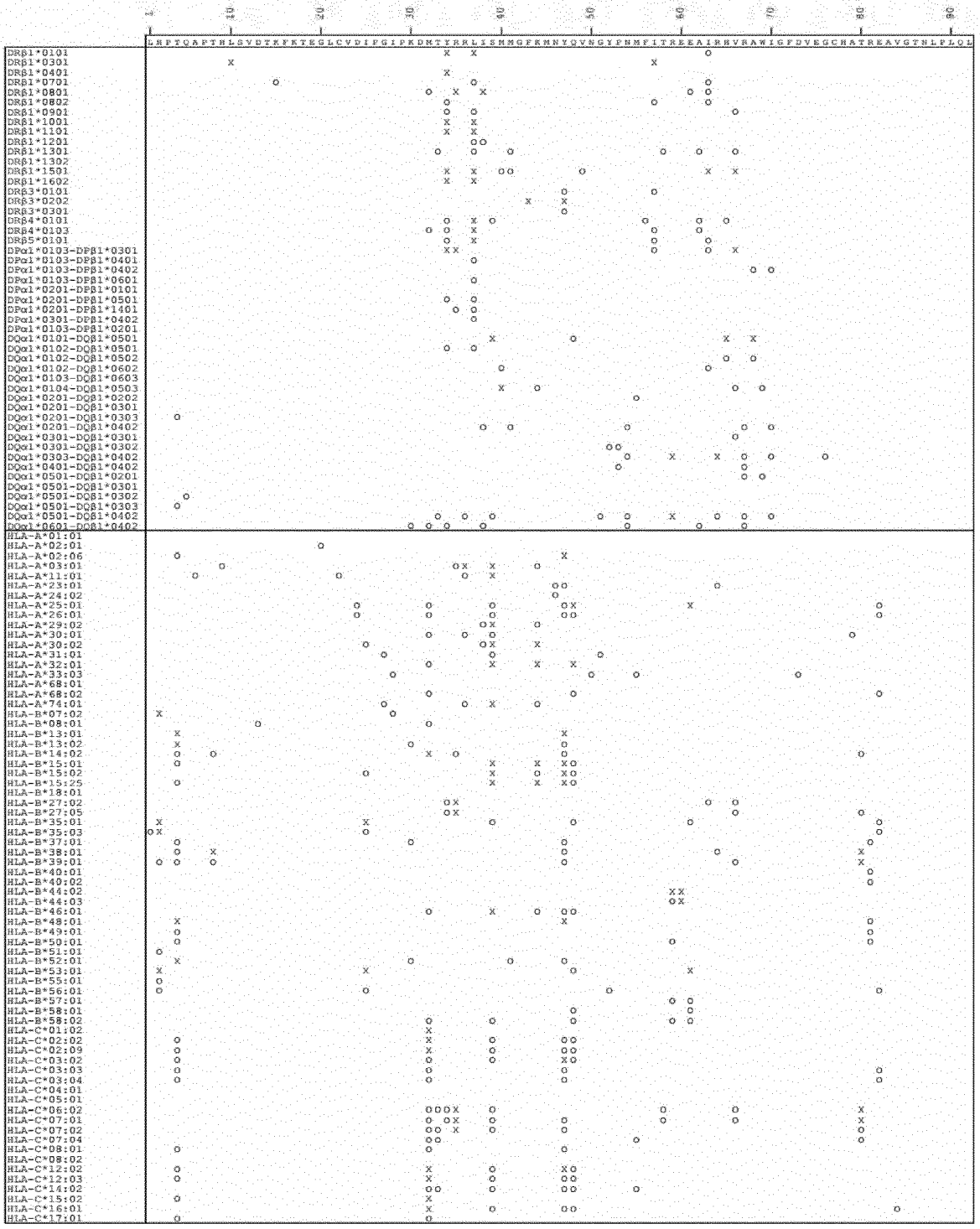
Фиг. 42

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 341



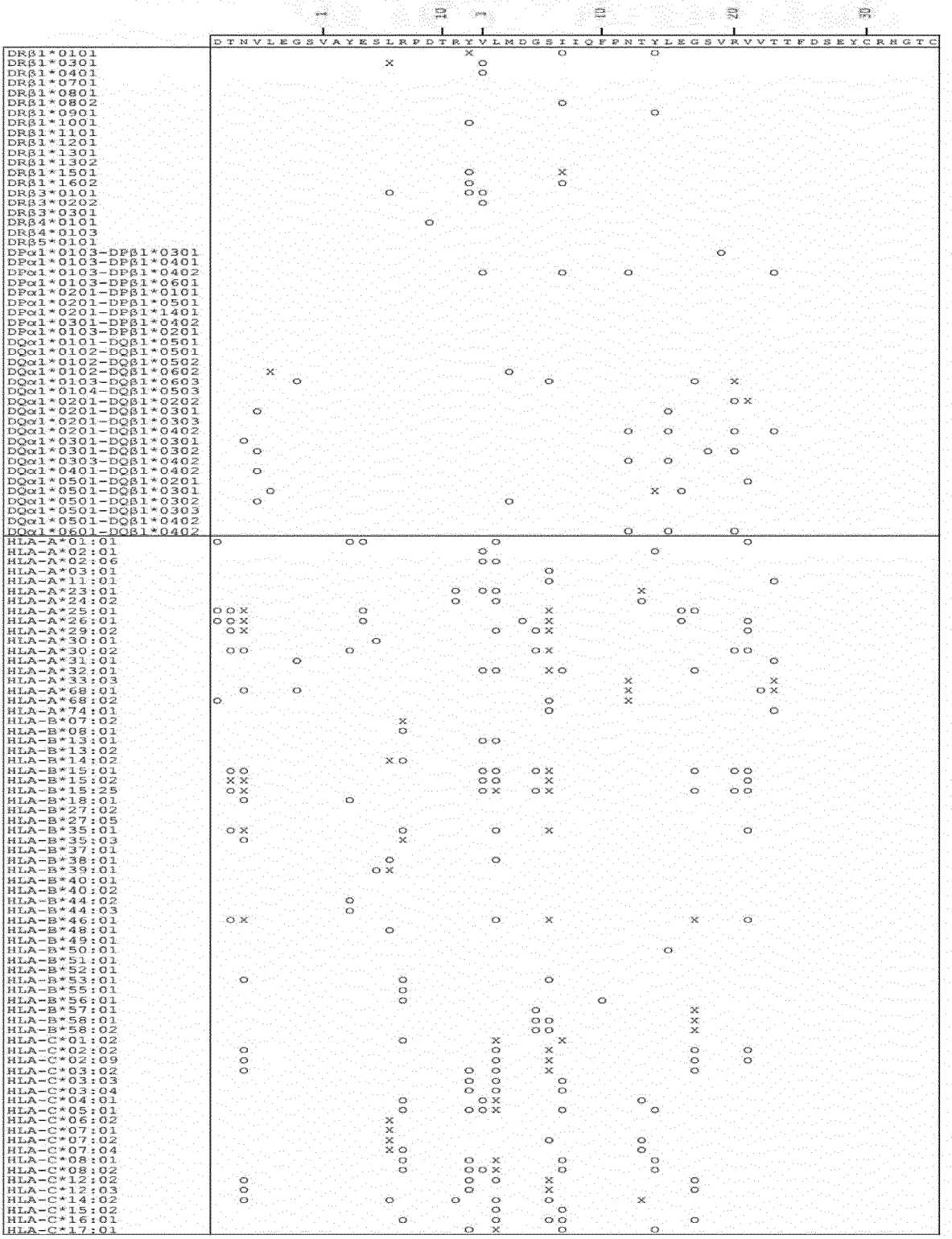
Фиг. 43

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 342



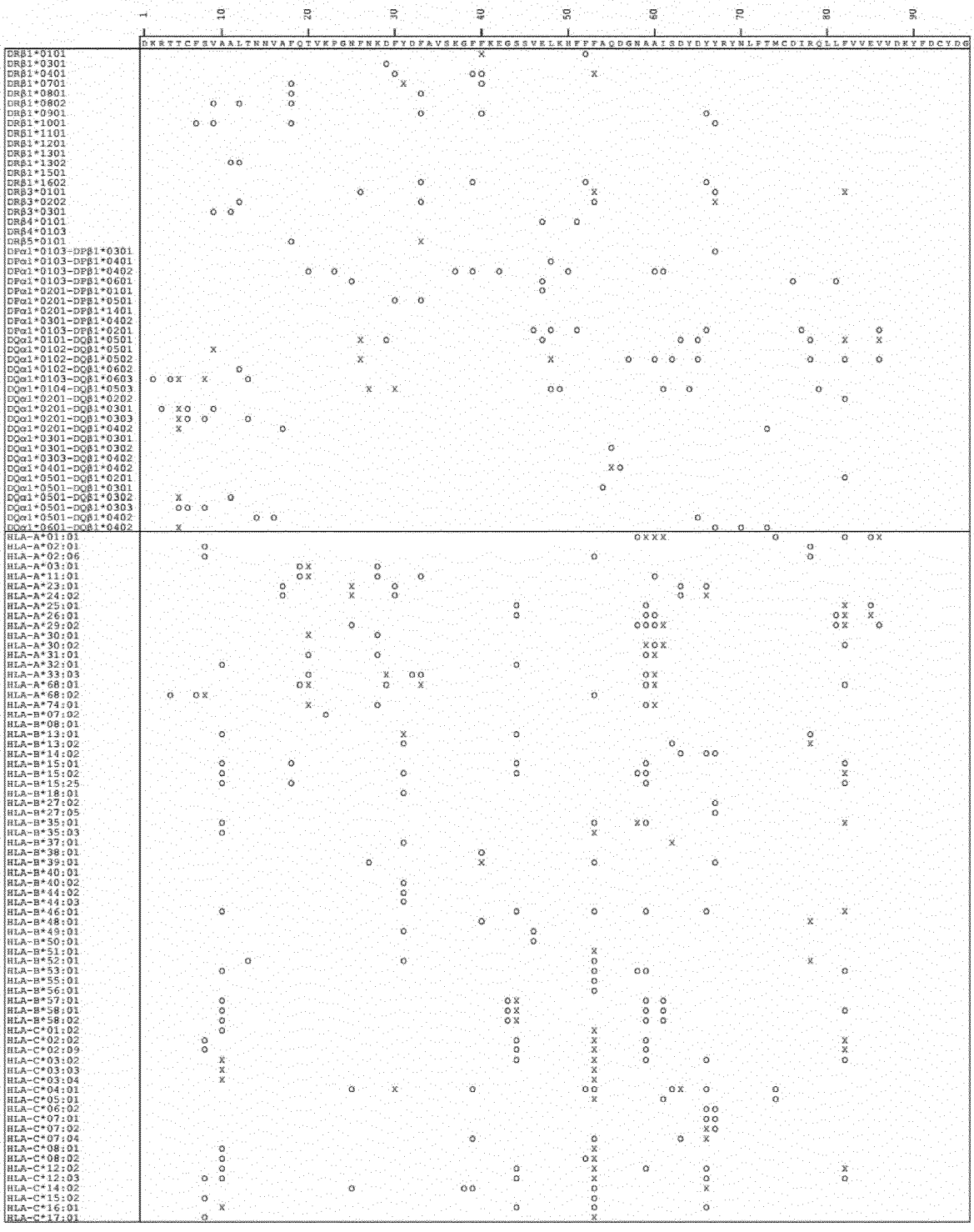
Фиг. 44

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 343



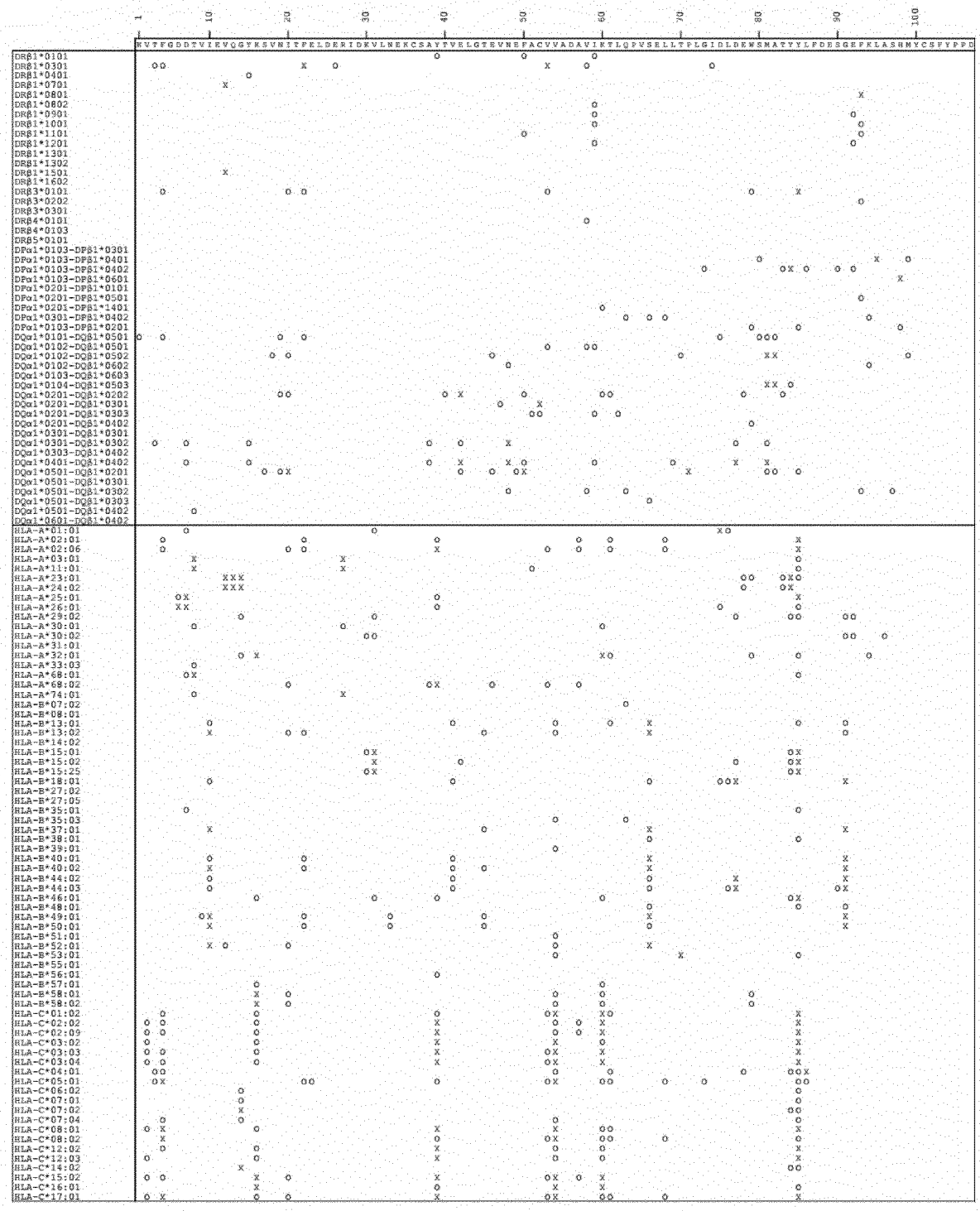
Фиг. 45

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 344



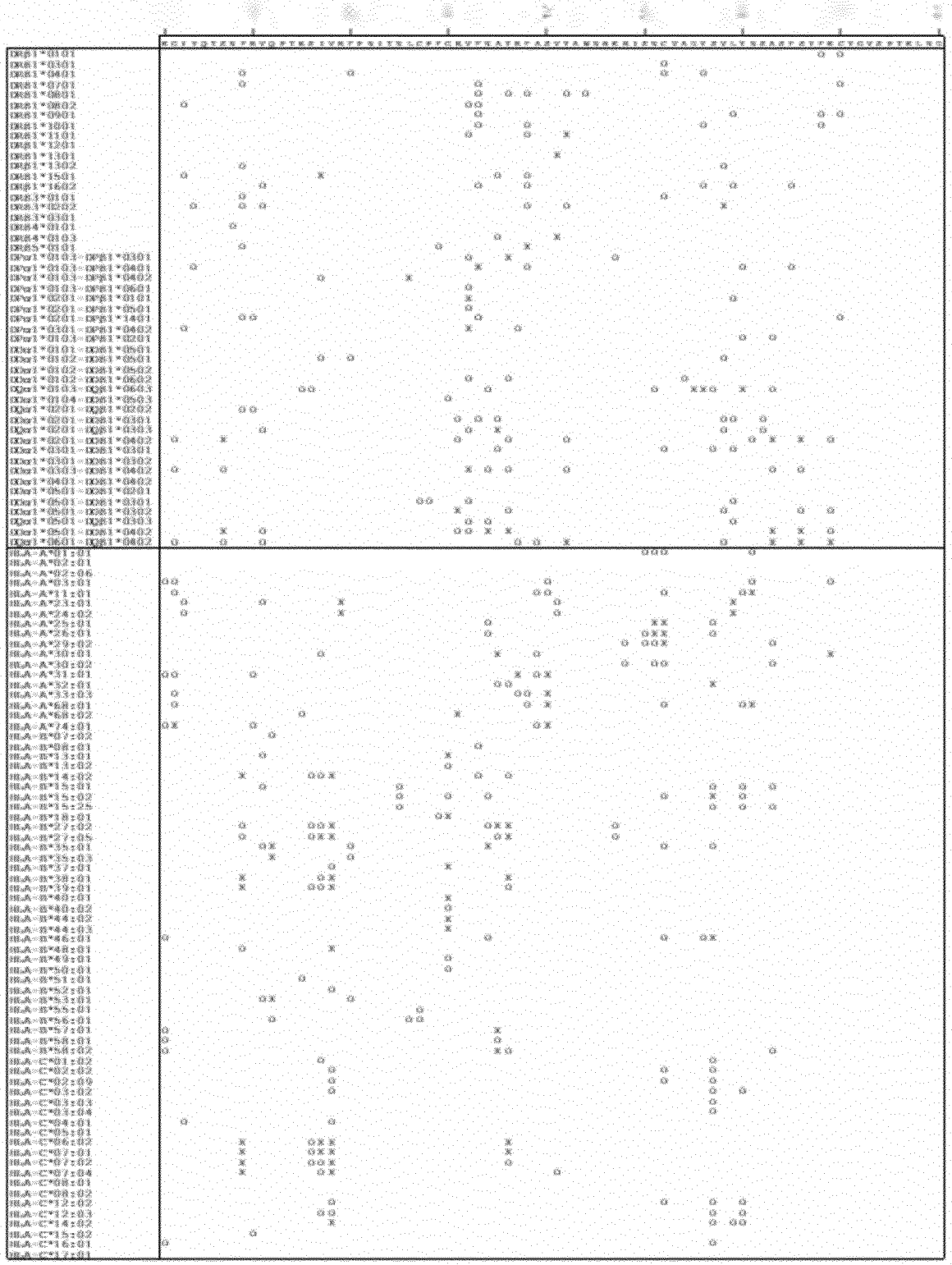
Фиг. 46

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 345



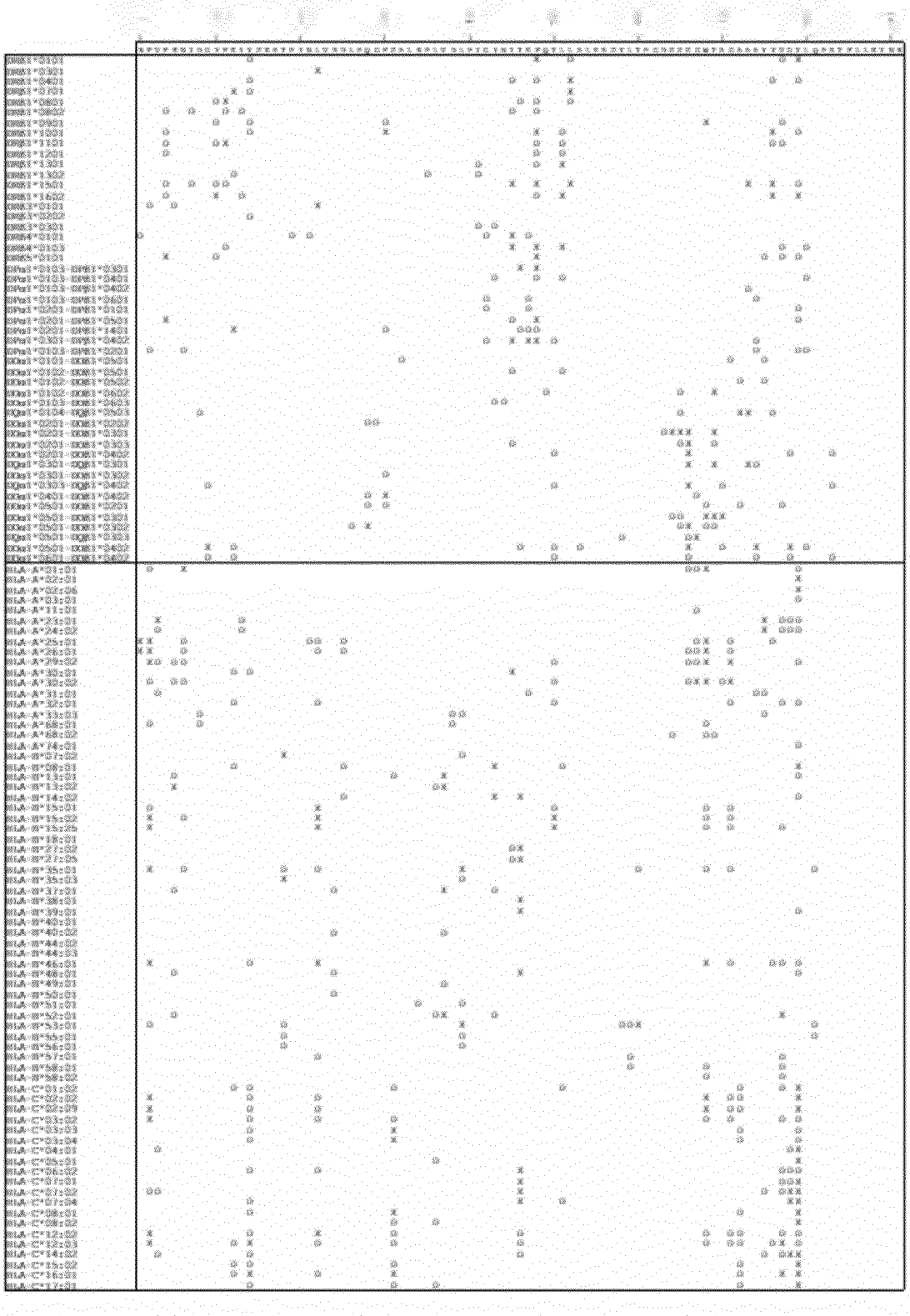
Фиг. 47

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 346



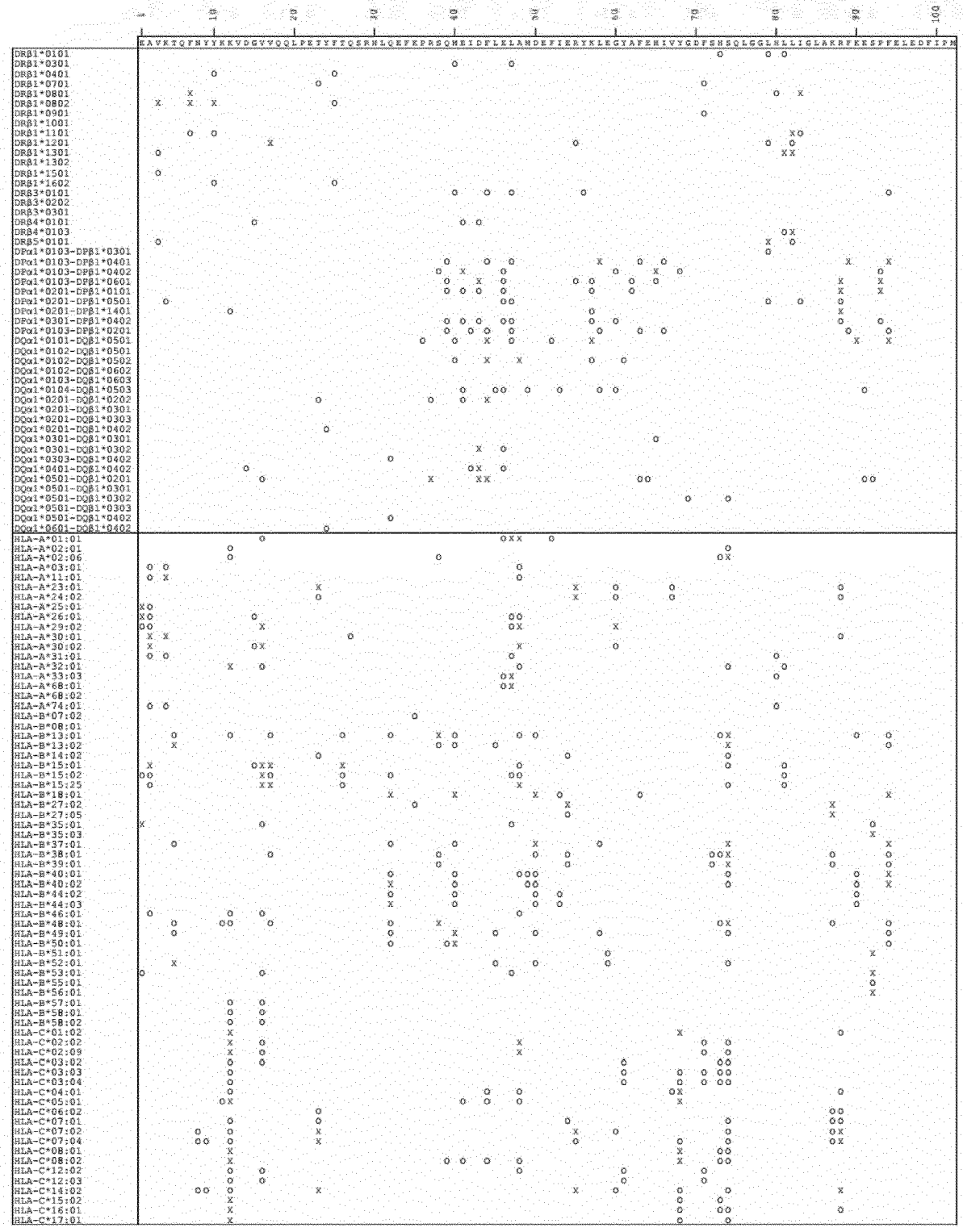
Фиг. 48

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 347



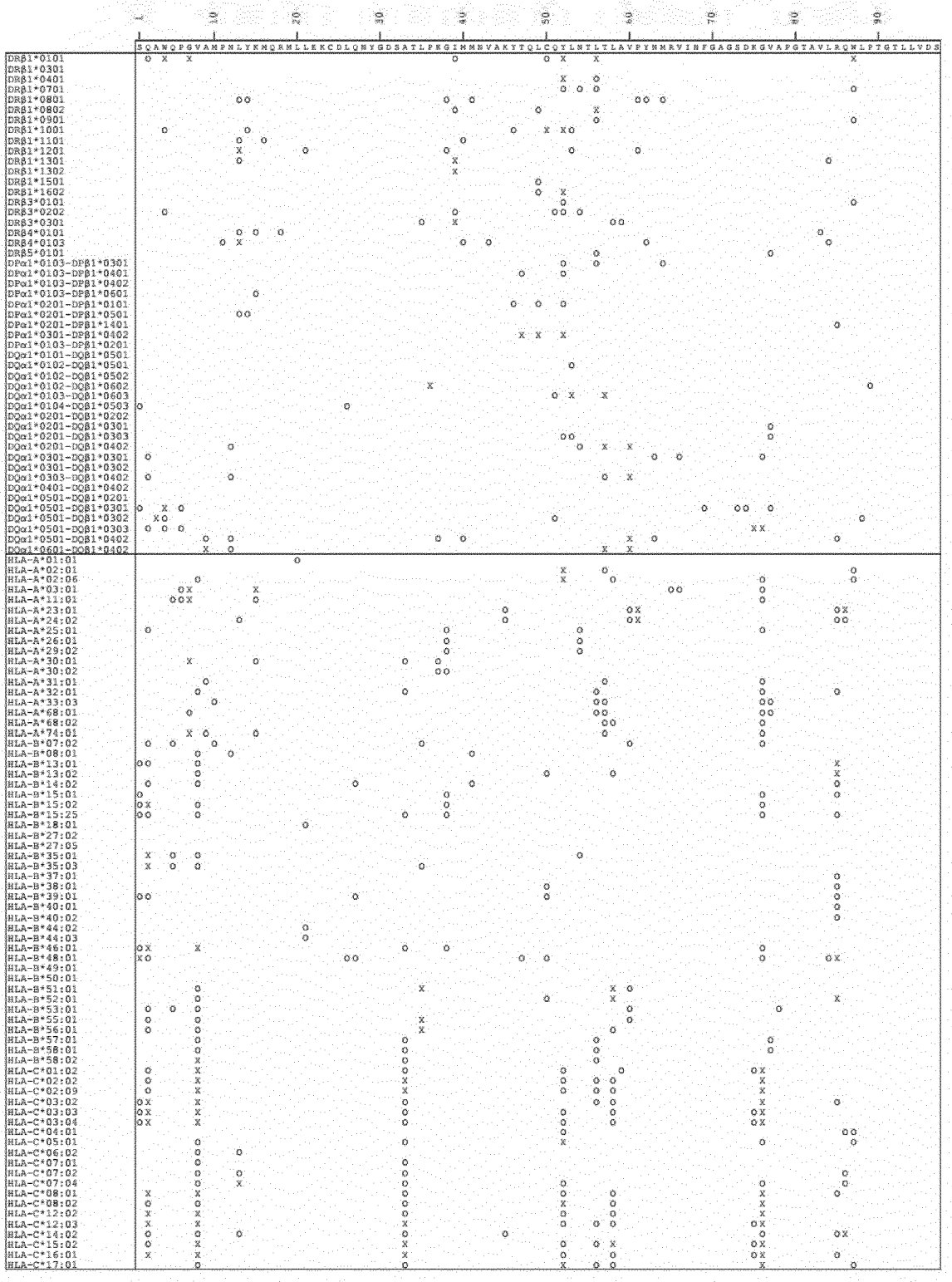
Фиг. 49

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 348



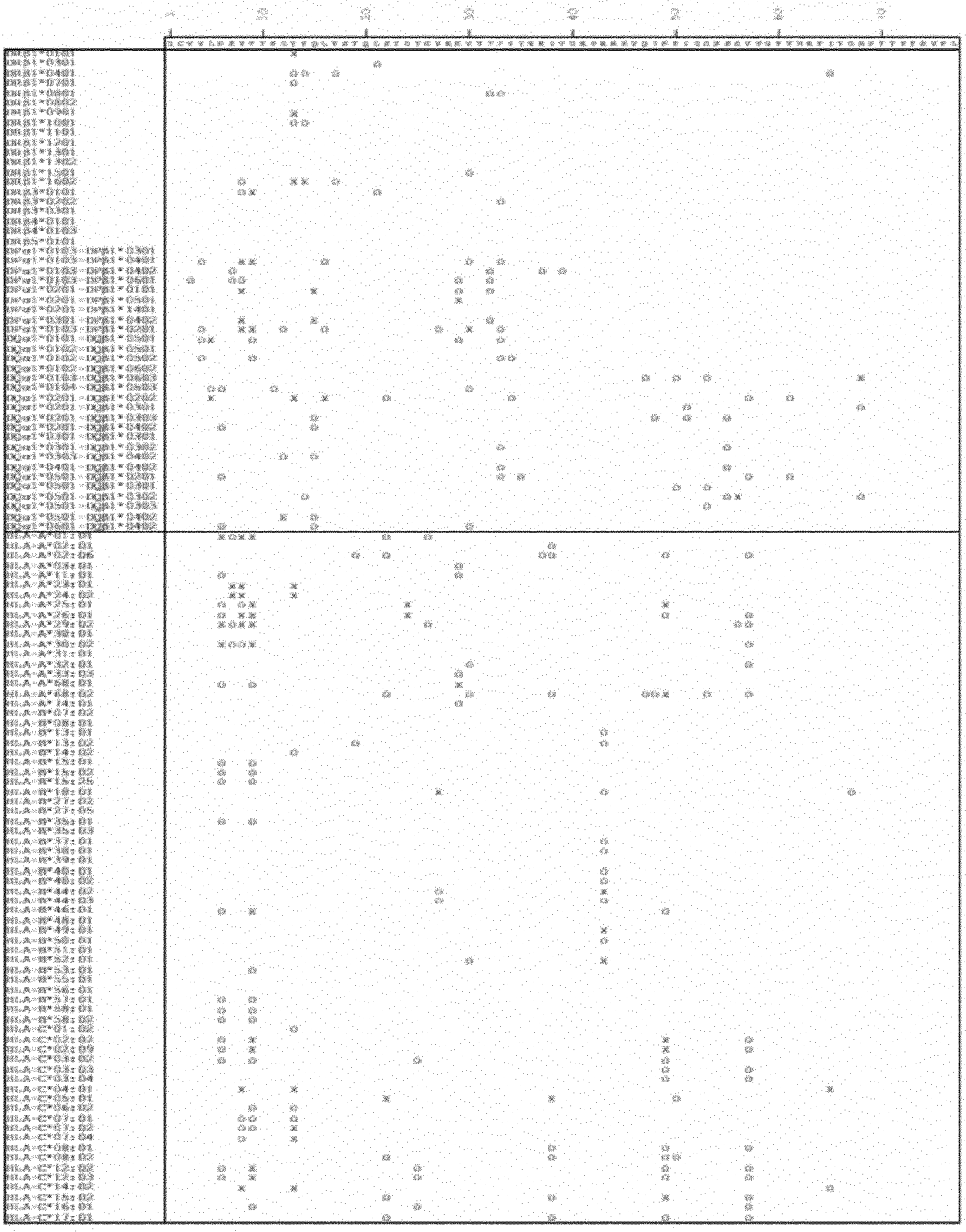
Фиг. 50

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 349



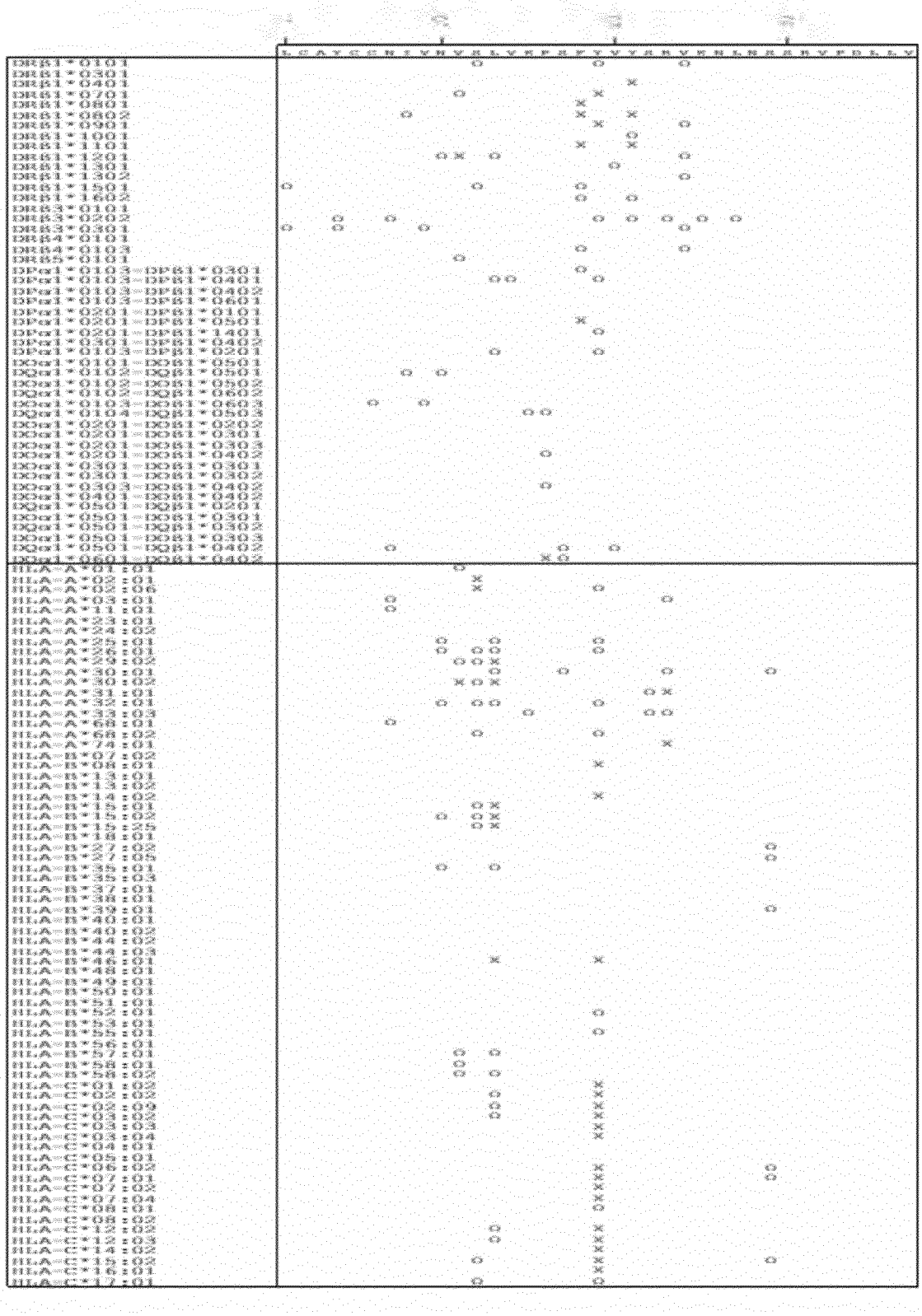
Фиг. 51

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 350



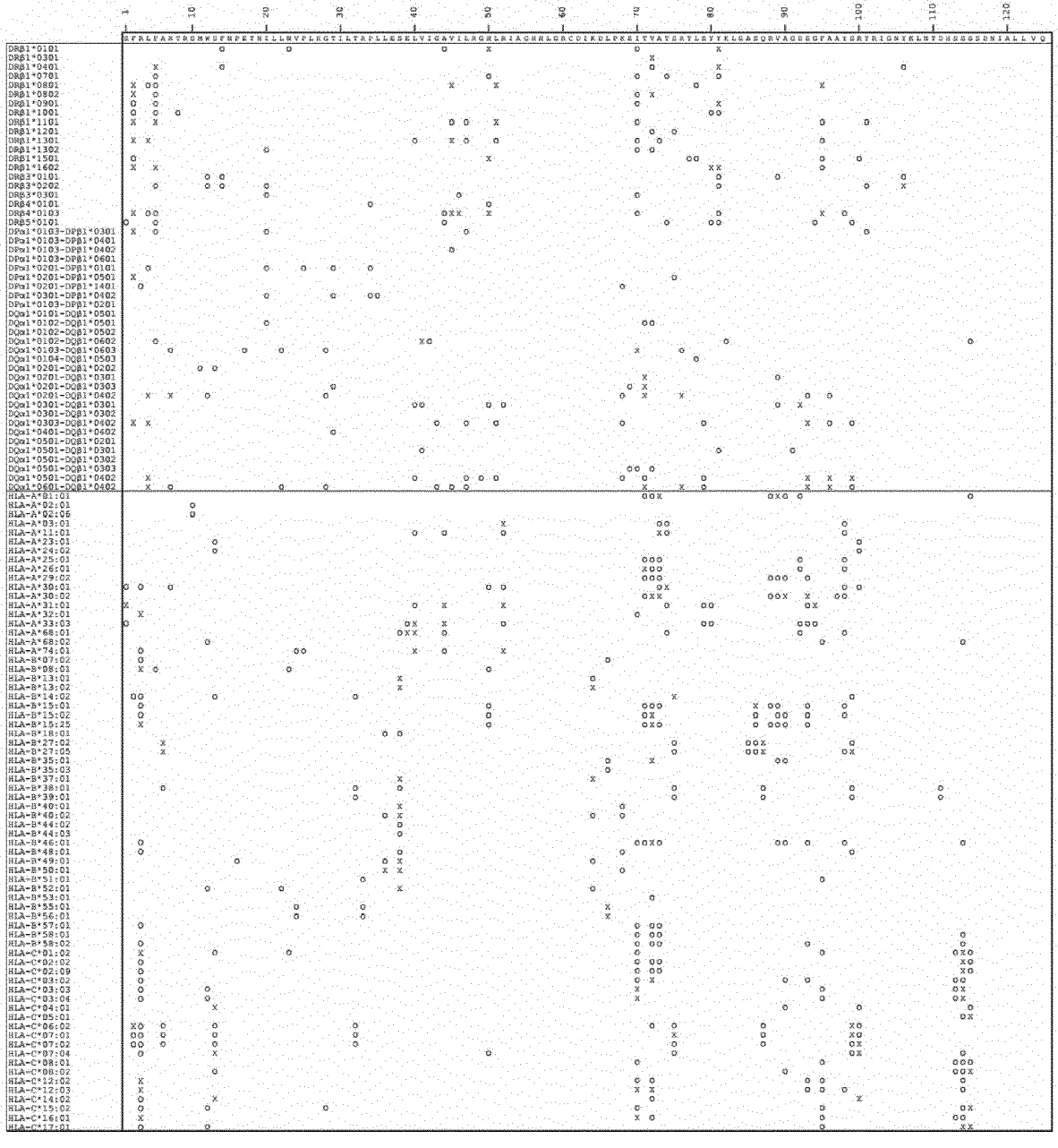
Фиг. 52

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 351



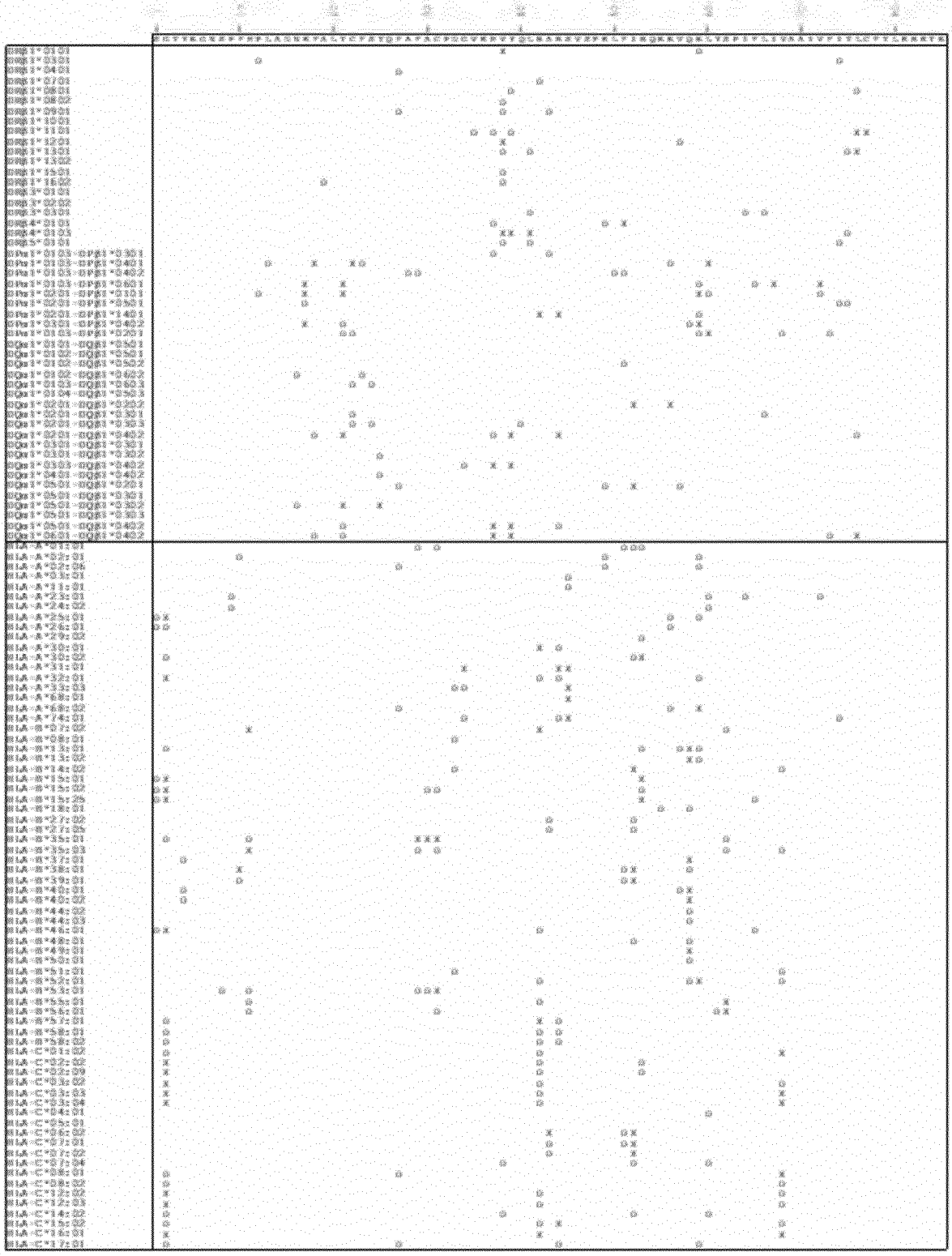
Фиг. 53

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 352



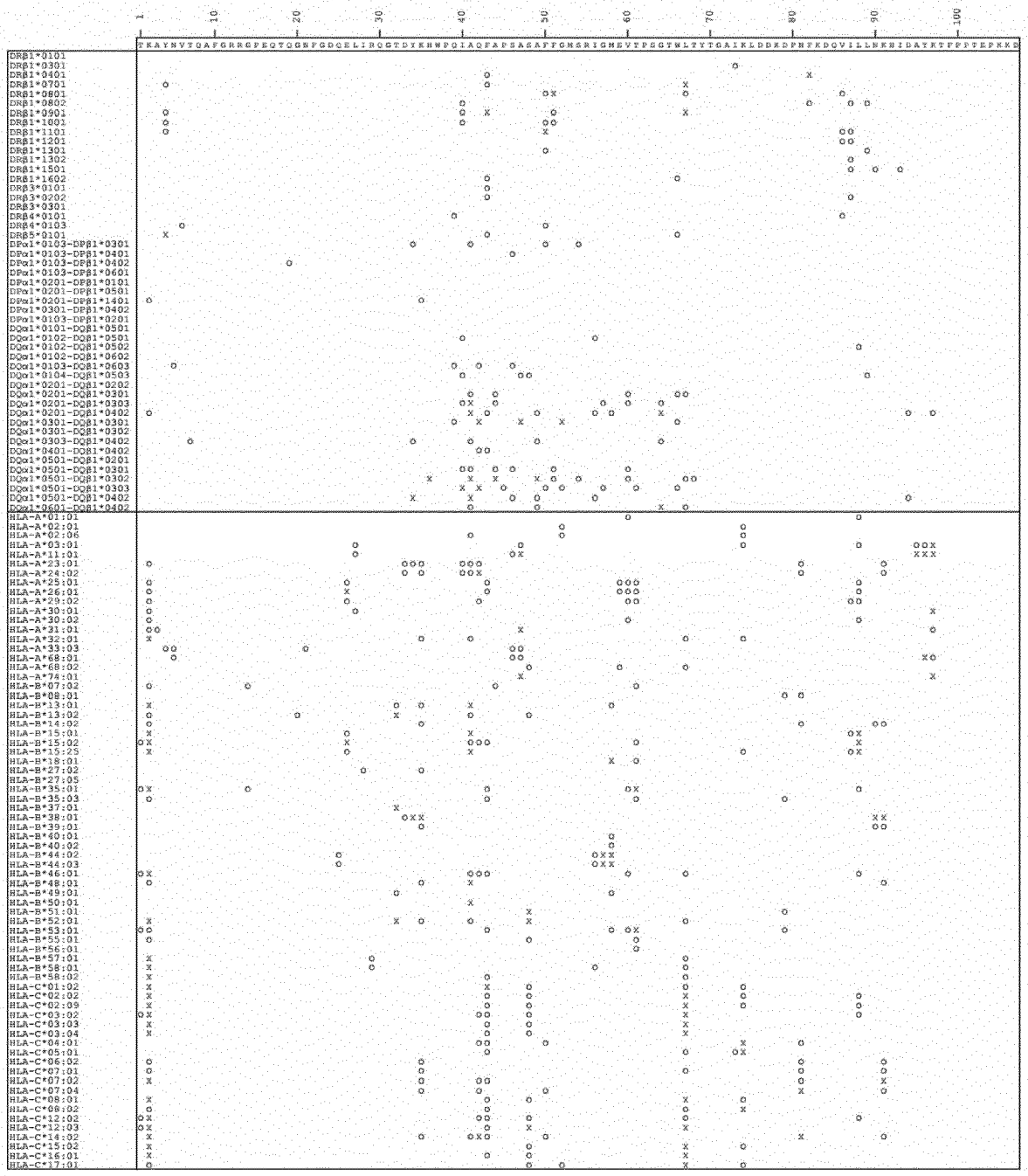
Фиг. 54

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 353



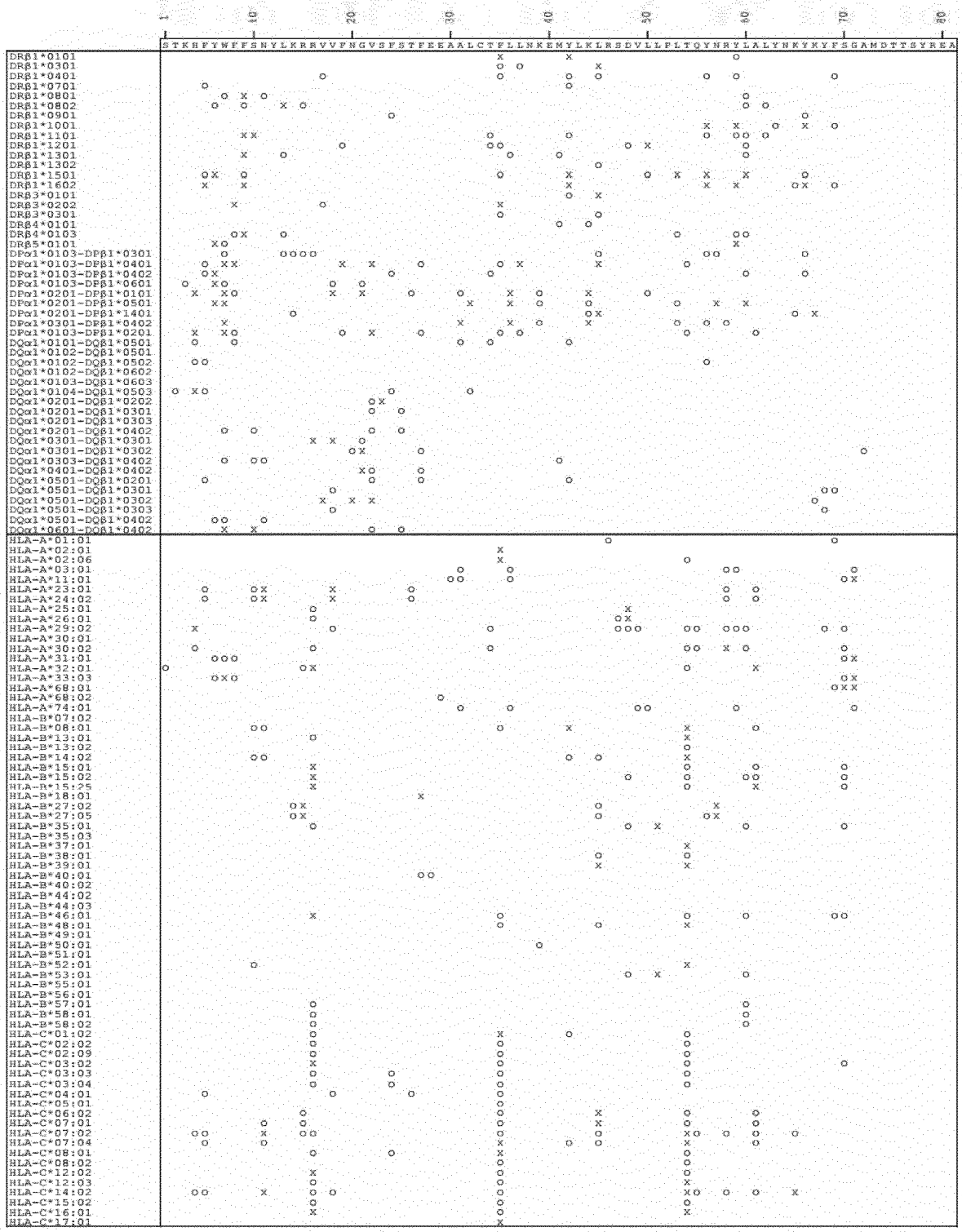
Фиг. 55

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 354



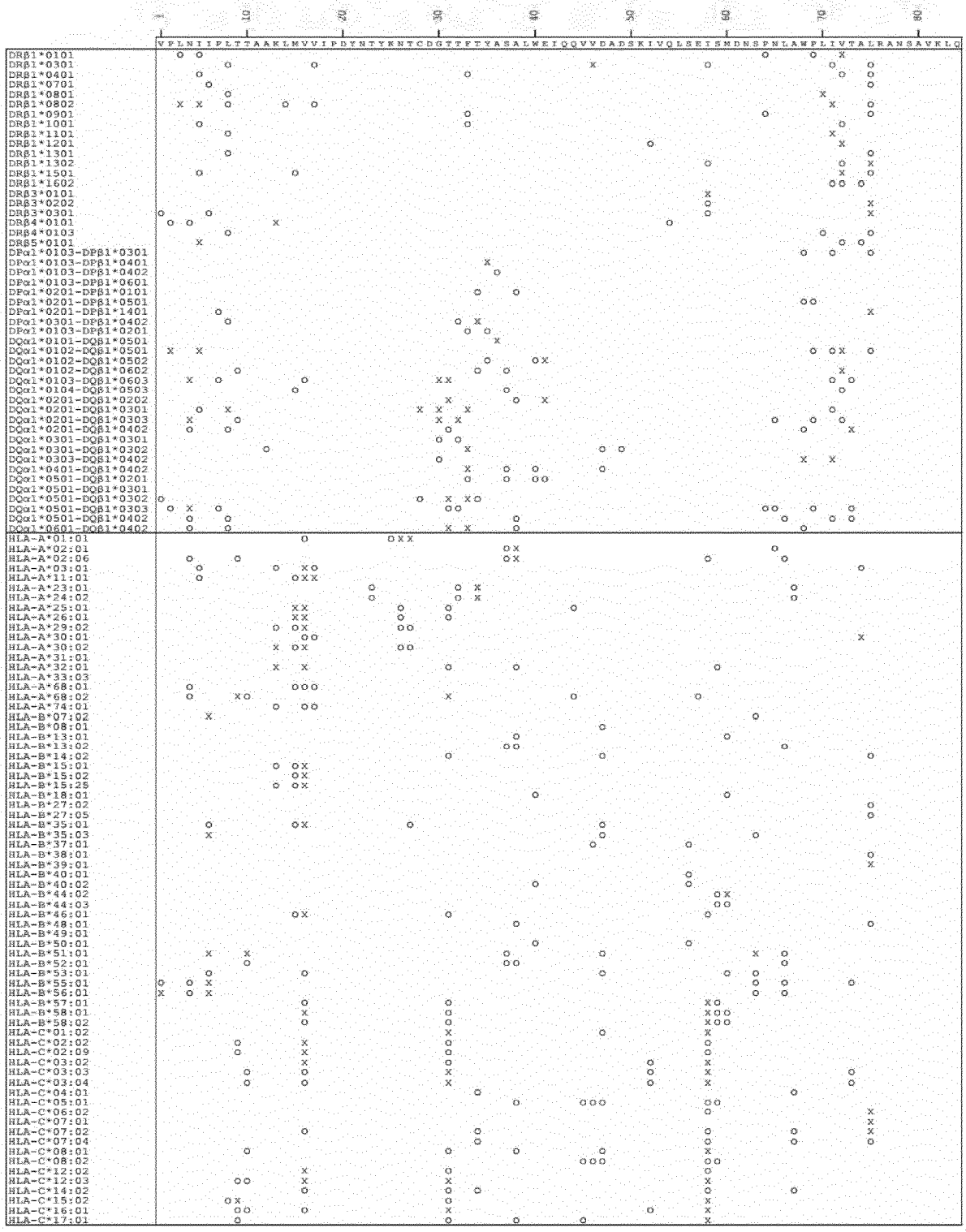
Фиг. 56

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 355



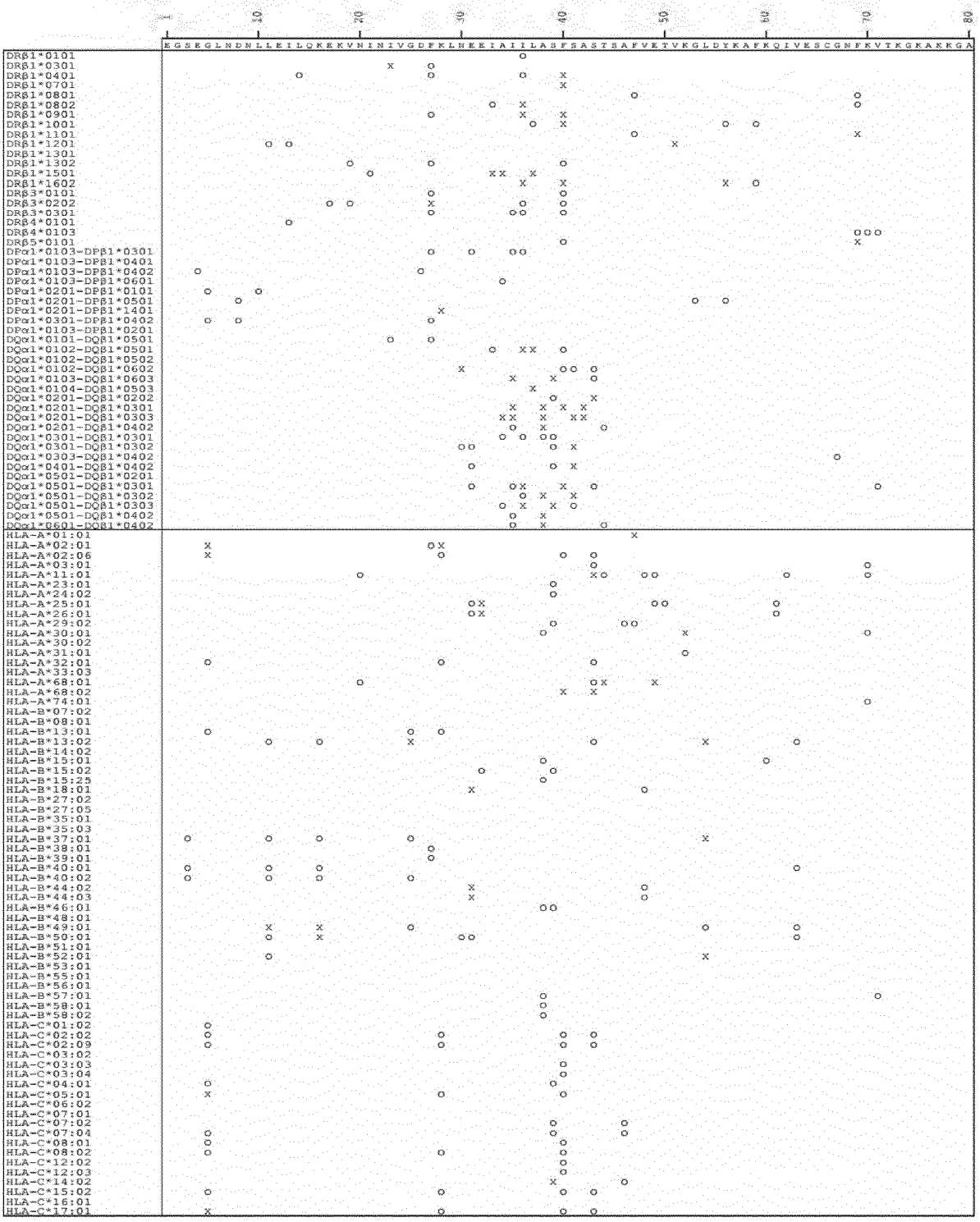
Фиг. 57

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 356



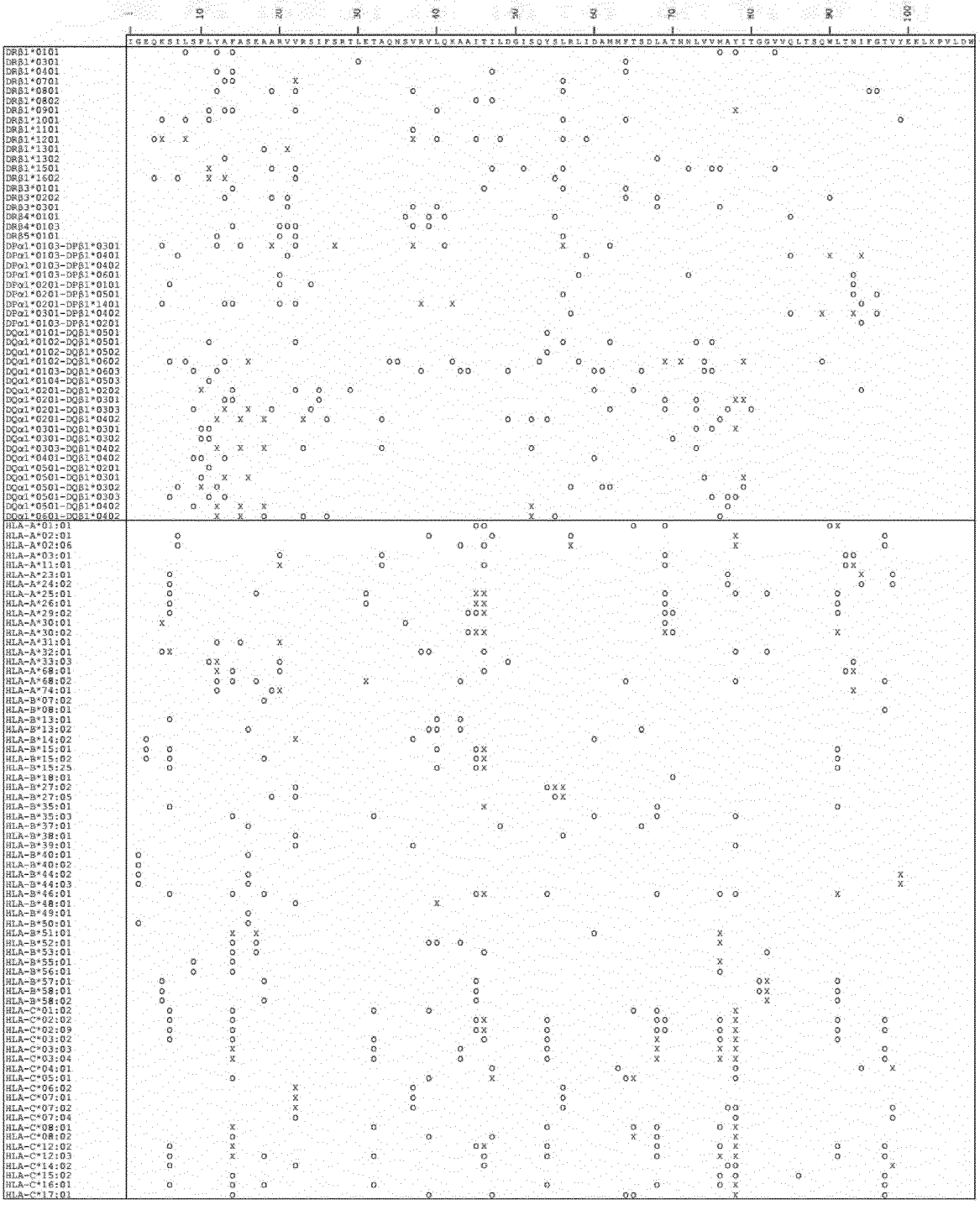
Фиг. 58

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 357



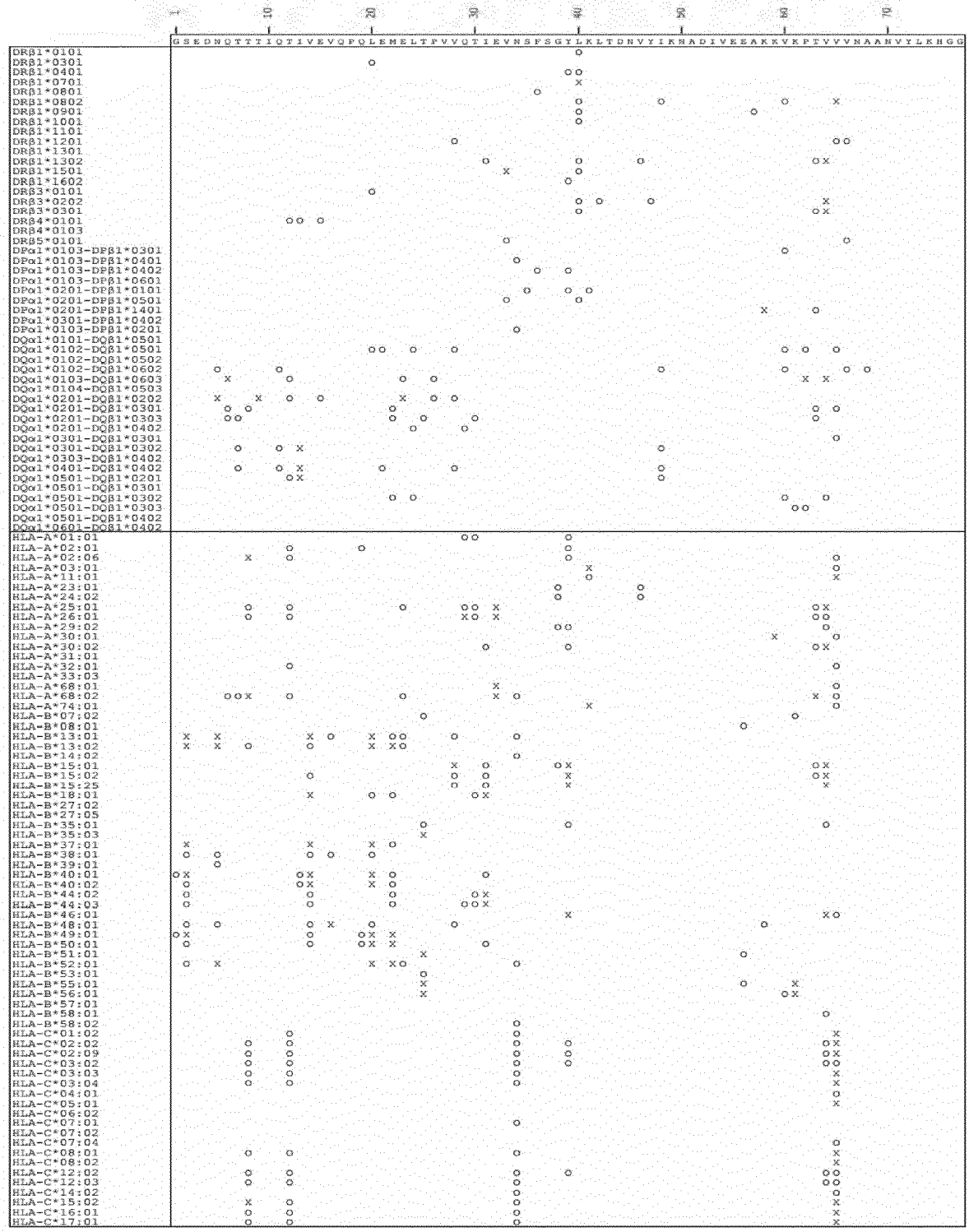
Фиг. 59

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 358



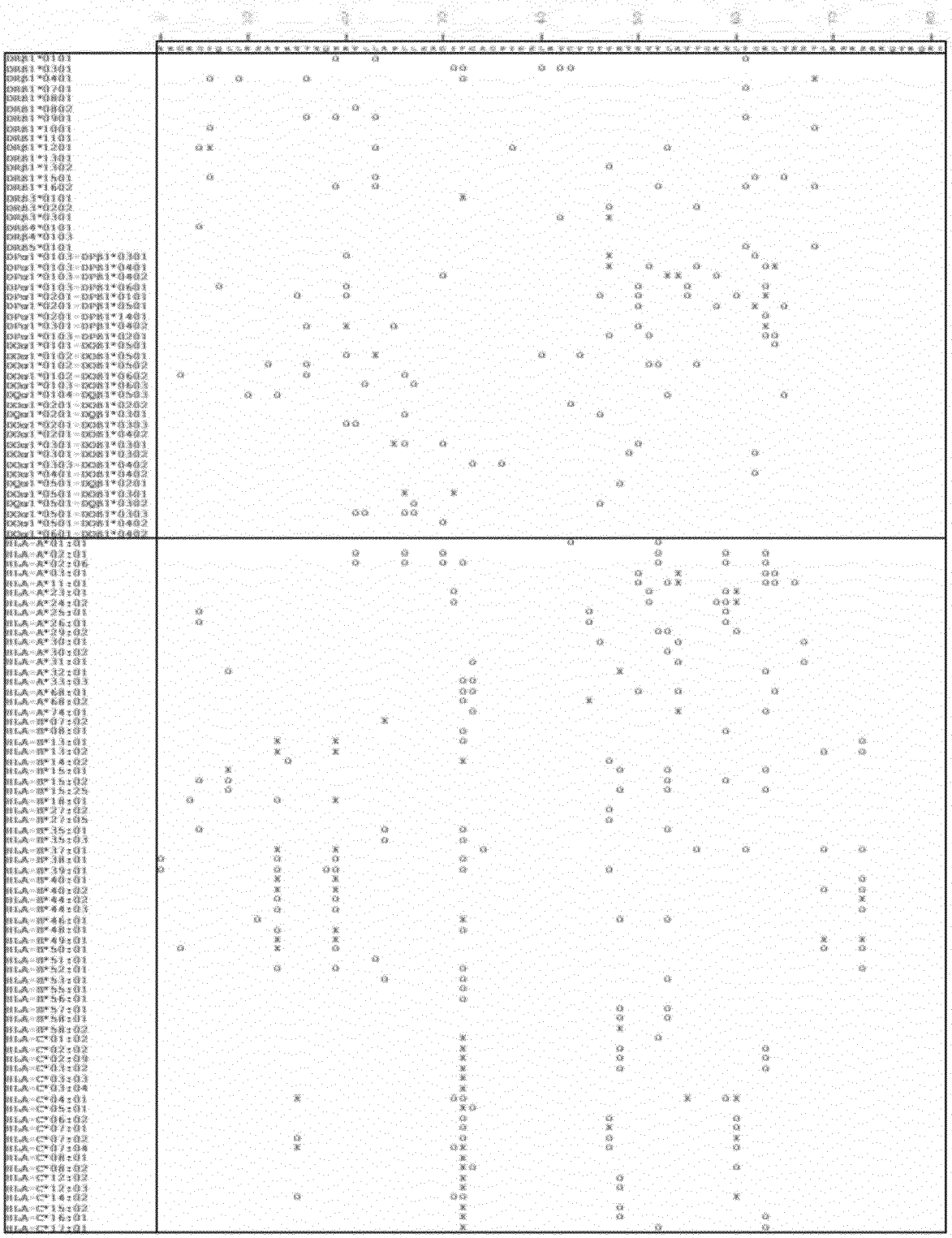
Фиг. 60

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 359



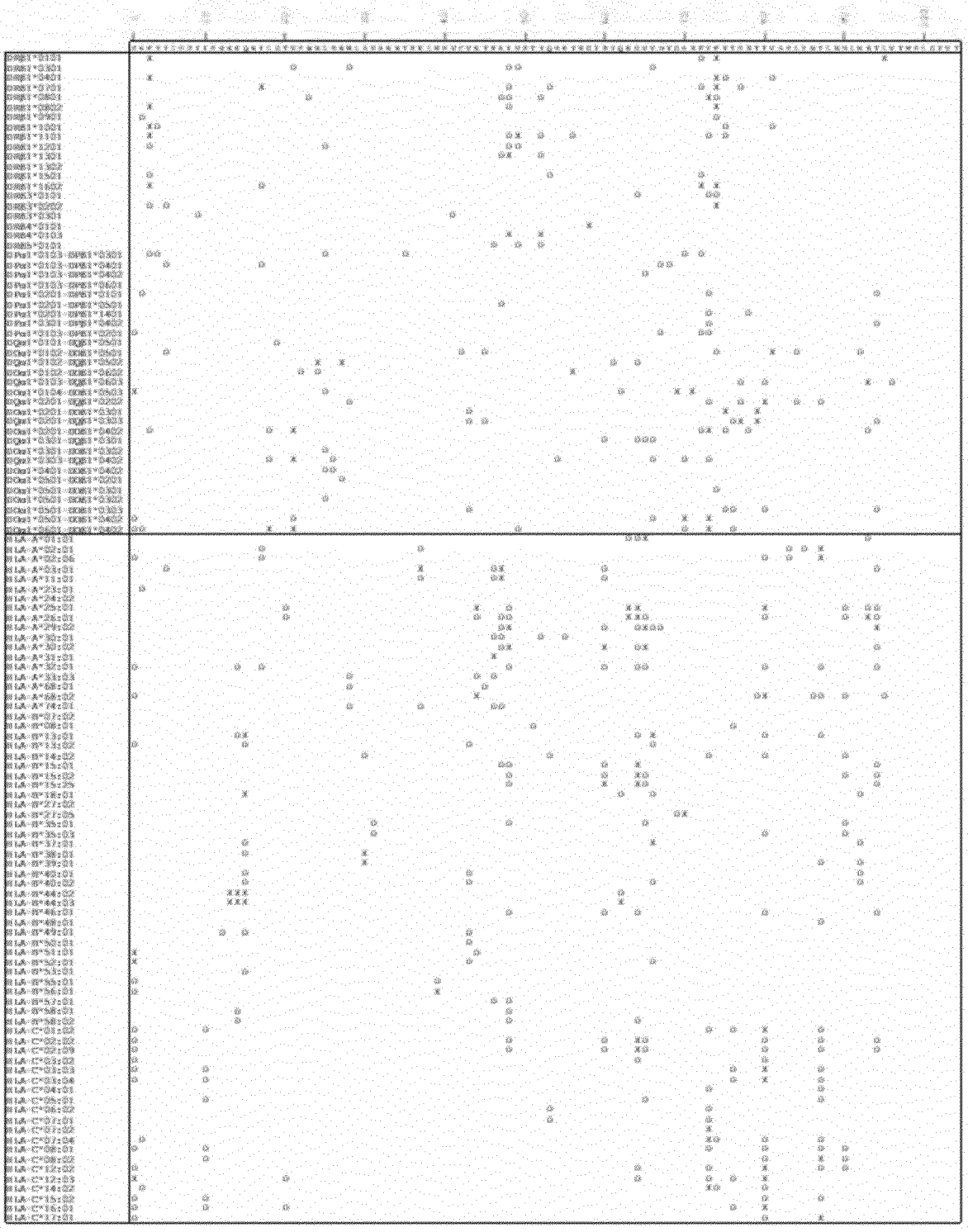
Фиг. 61

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 360



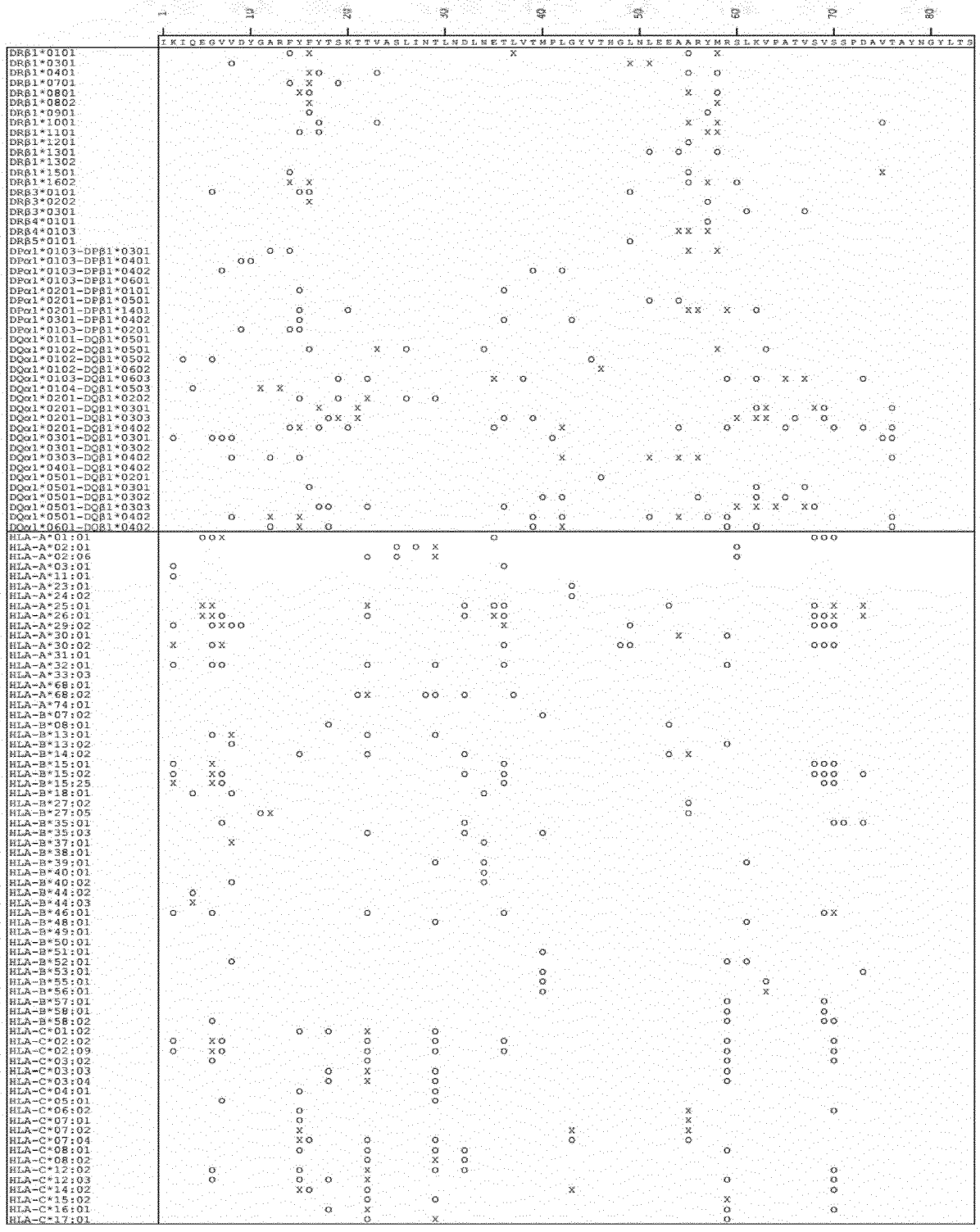
Фиг. 62

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 361



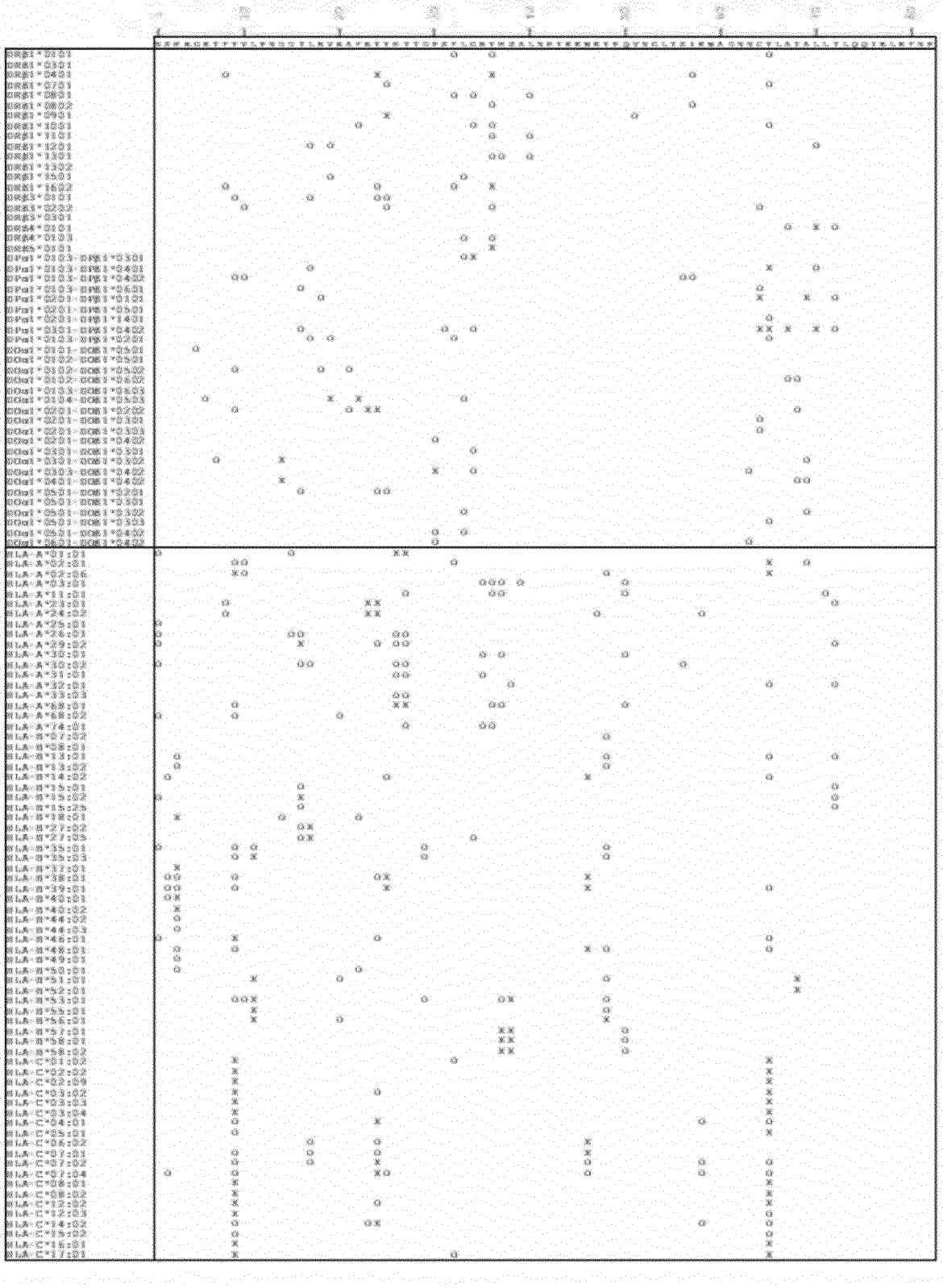
Фиг. 63

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 362



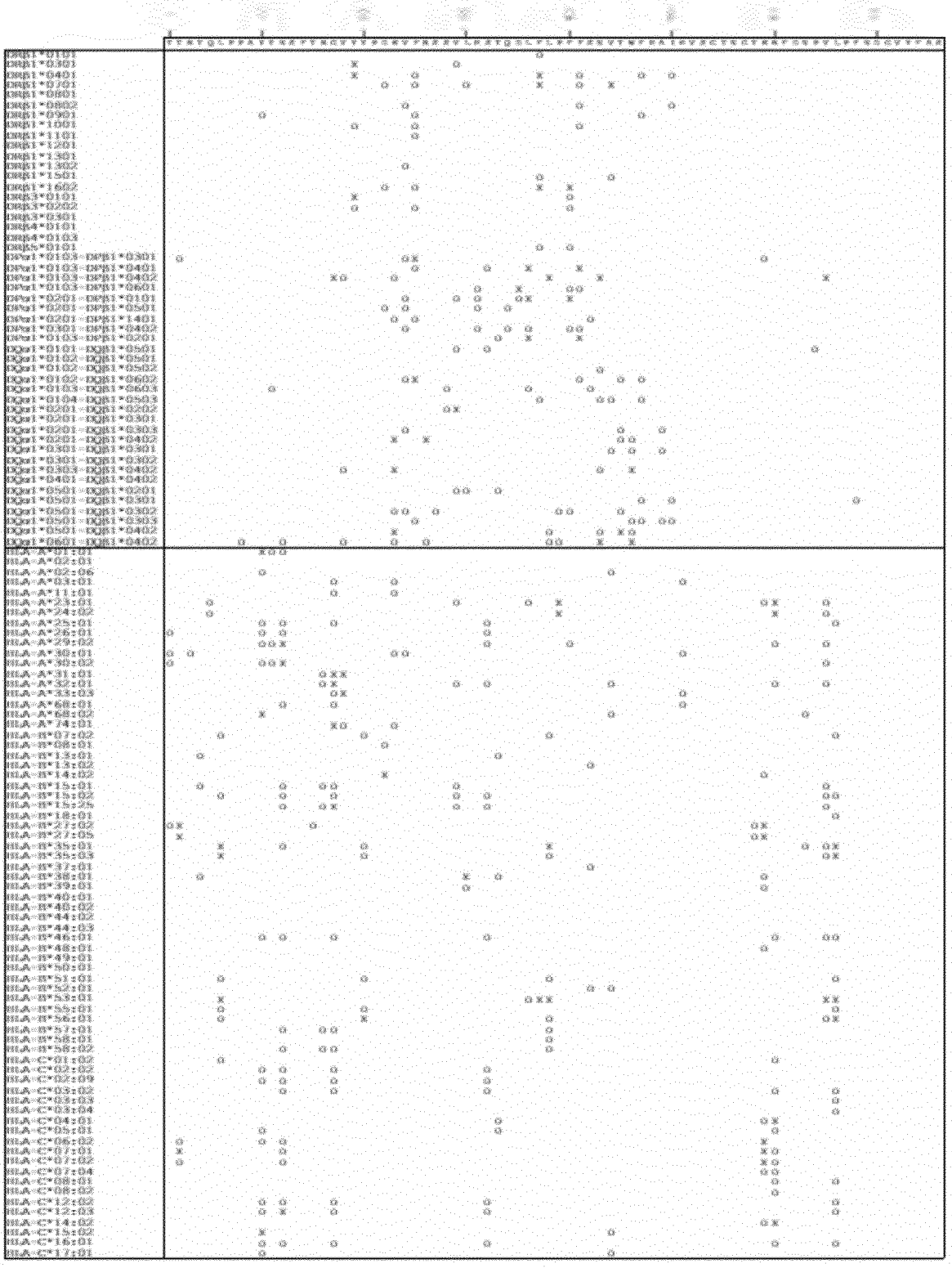
Фиг. 64

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 363



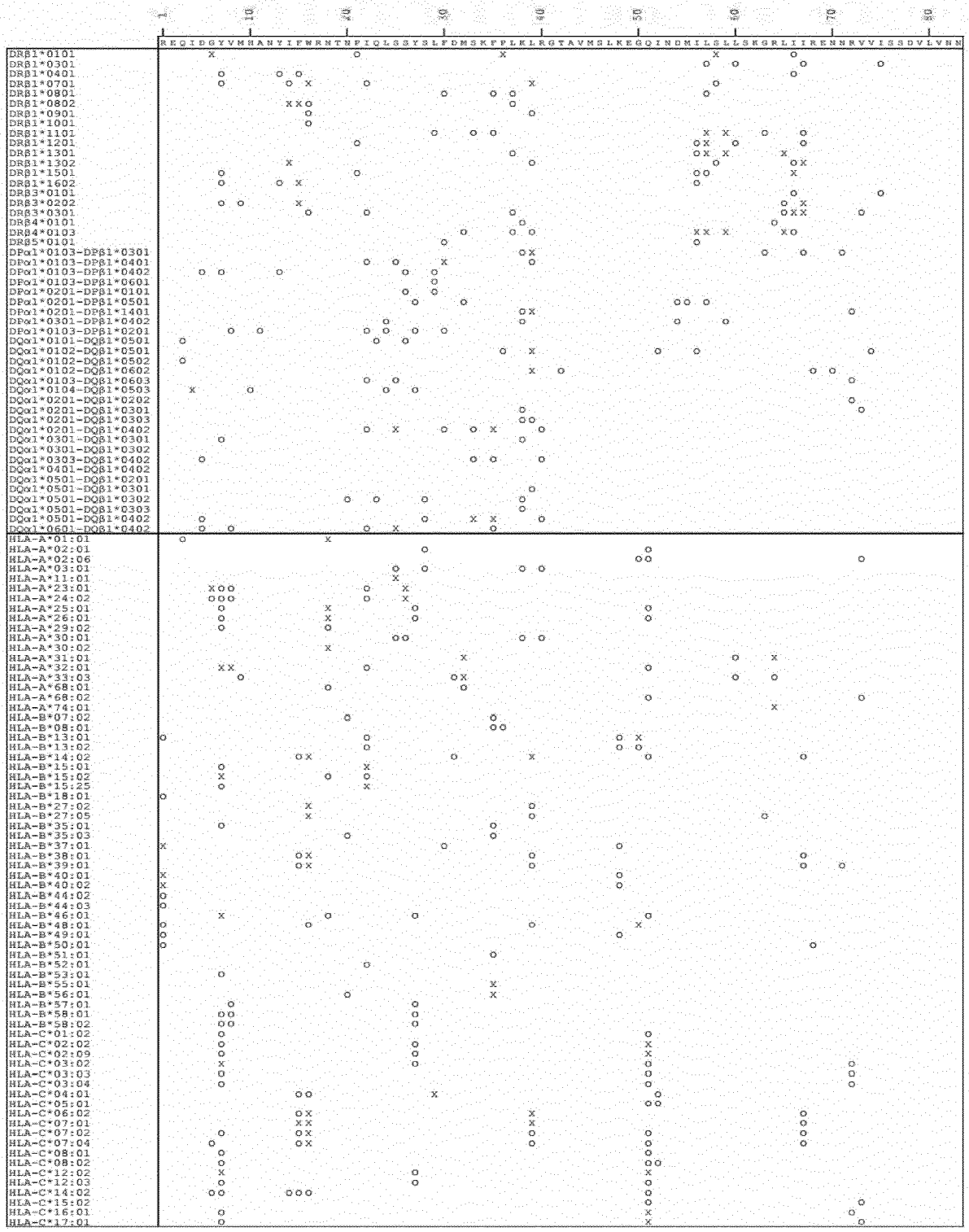
Фиг. 65

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 364



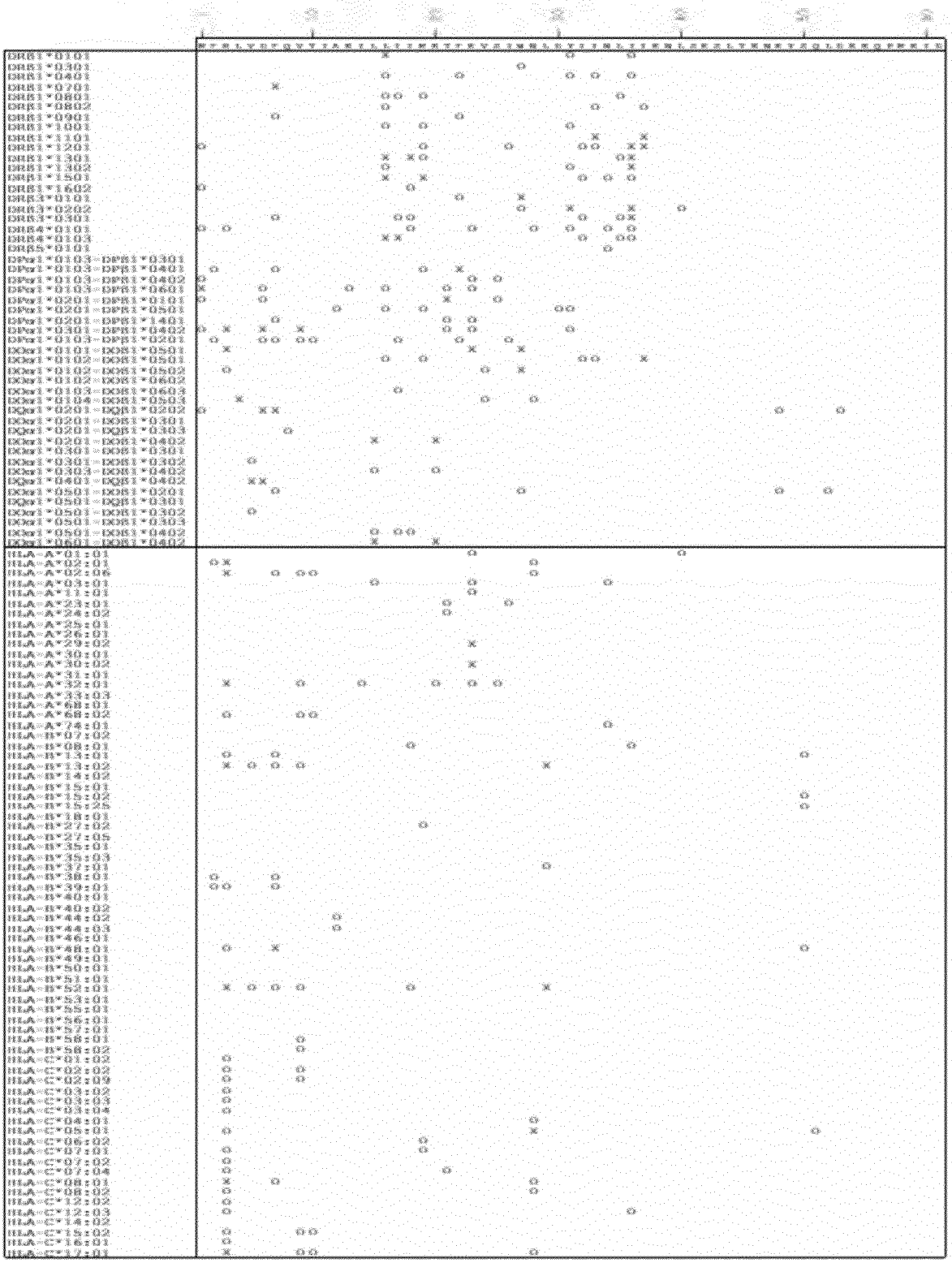
Фиг. 66

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 365



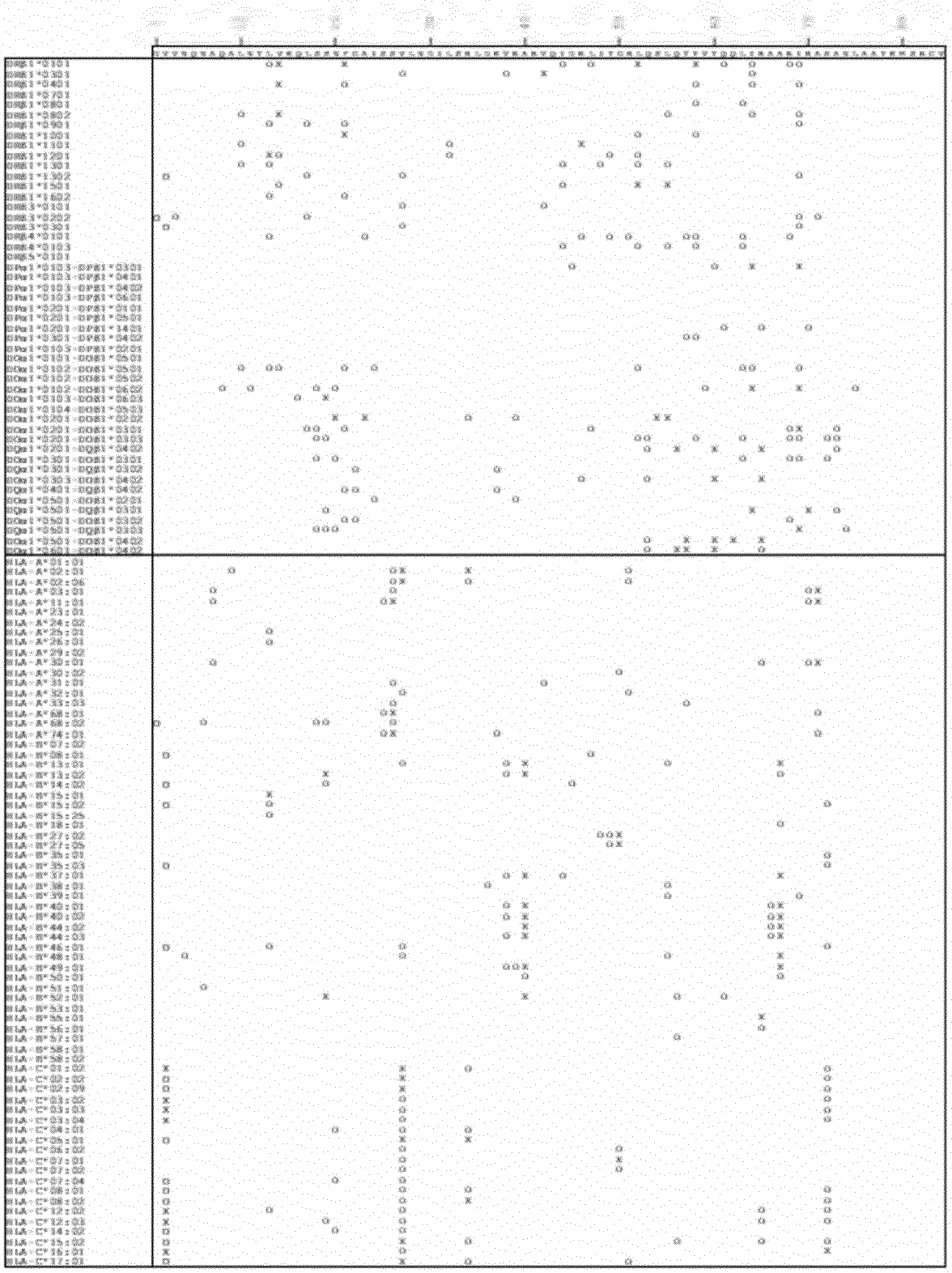
Фиг. 67

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 366



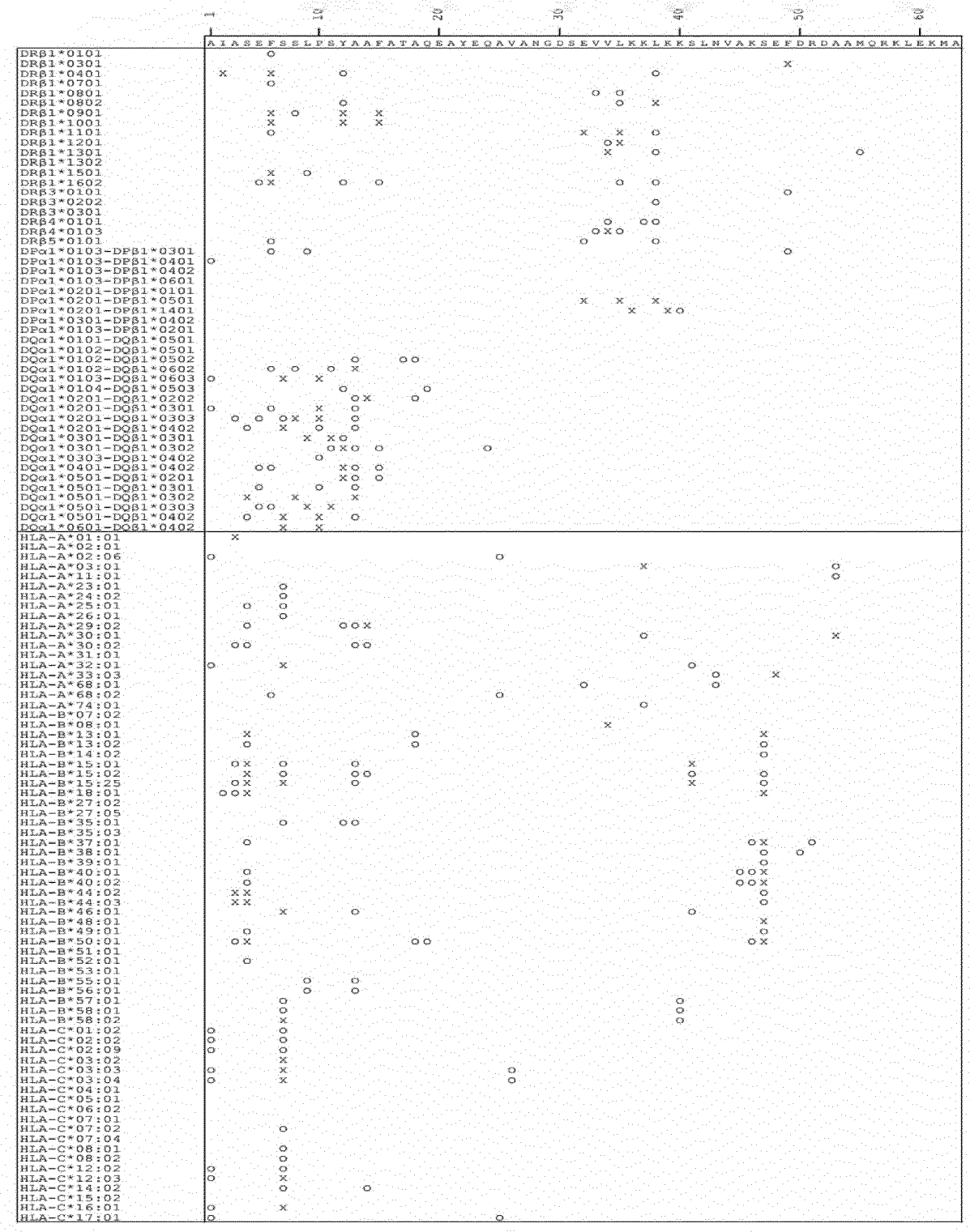
Фиг. 68

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 367



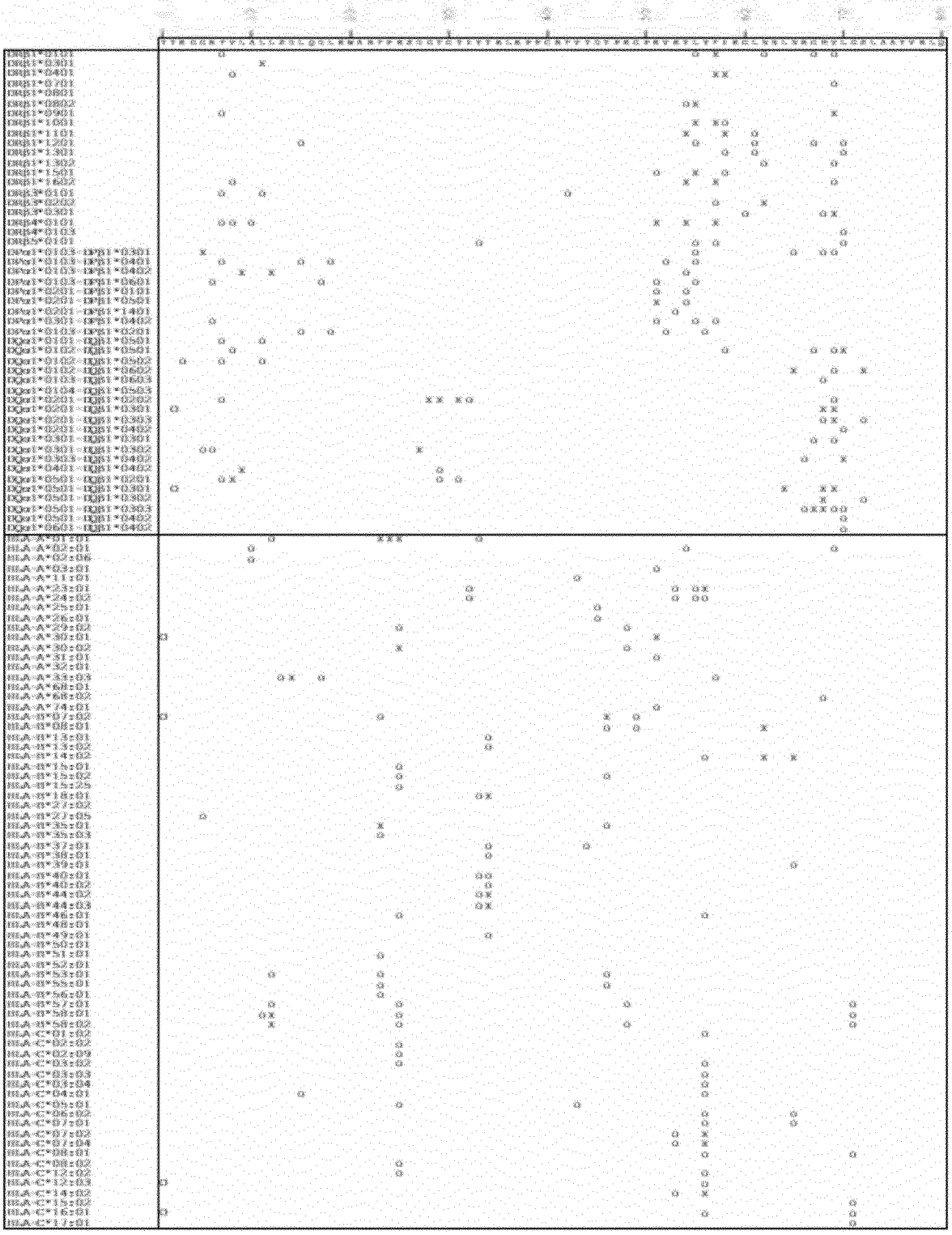
Фиг. 69

Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 368

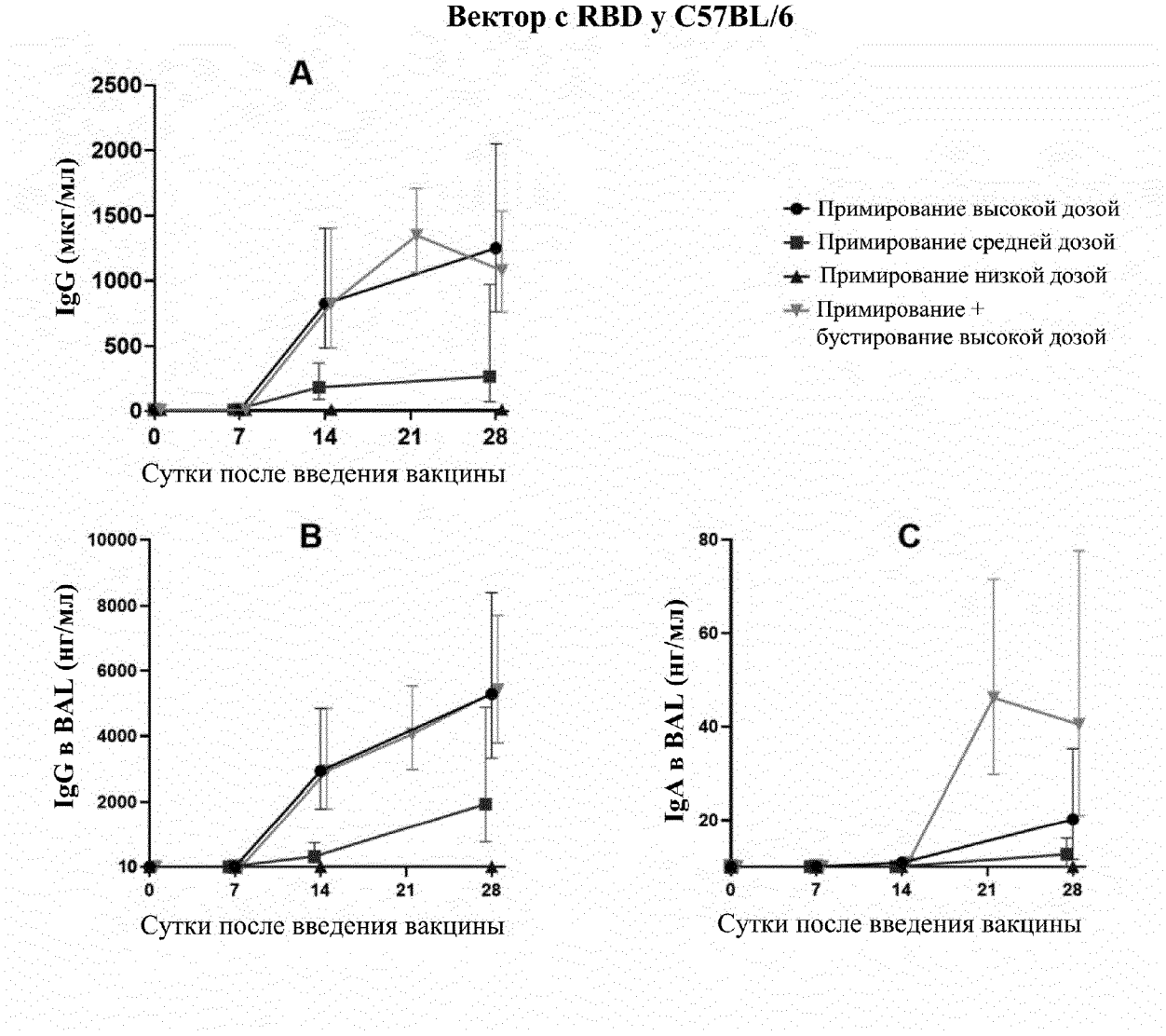


Фиг. 70

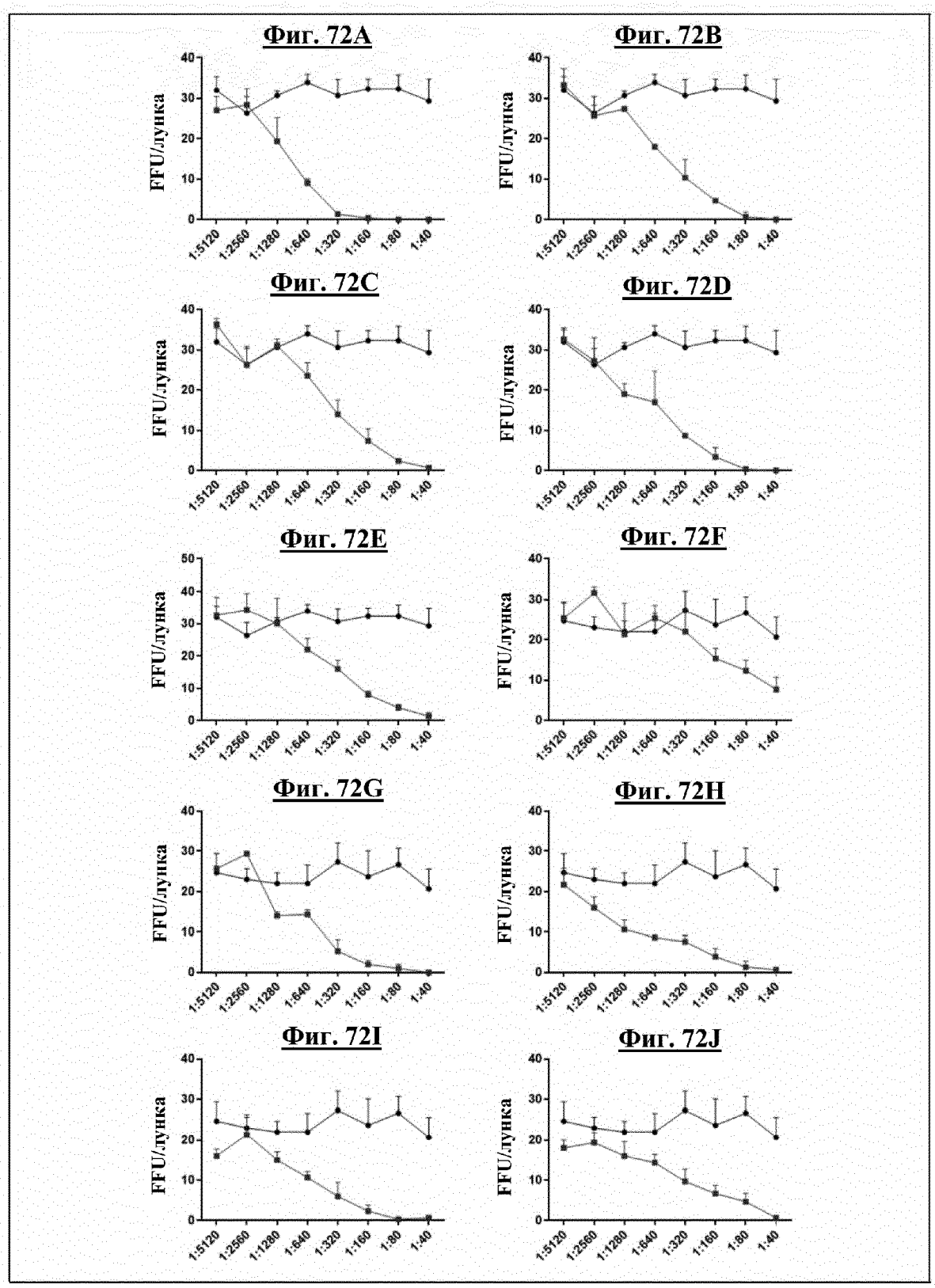
Карта связывающих мотивов для HLA класса I и HLA класса II для SEQ ID NO: 369



Фиг. 71

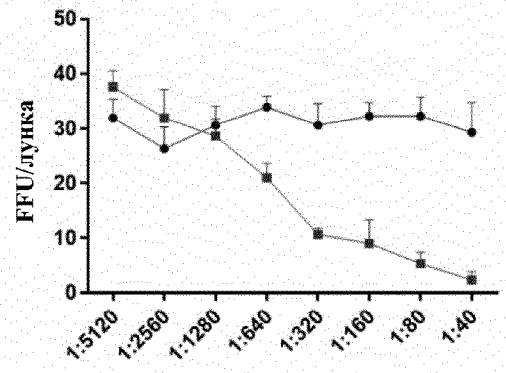

Вектор с RBD у C57BL/6
A
IgG (мкг/мл)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
Сутки после введения вакцины
Примирование высокой дозой
Примирование средней дозой
Примирование низкой дозой
Примирование + бустирование высокой дозой
B
IgG в BAL (нг/мл)
10000
8000
6000
4000
2000
10
Сутки после введения вакцины
C
IgA в BAL (нг/мл)
80
60
40
20
Сутки после введения вакцины

Фиг. 72

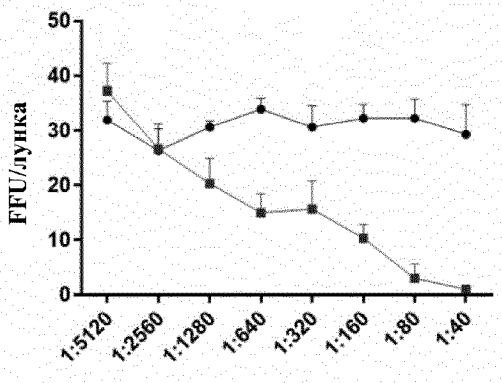

Фиг. 72A
Фиг. 72B
Фиг. 72C
Фиг. 72D
Фиг. 72E
Фиг. 72F
Фиг. 72G
Фиг. 72H
Фиг. 72I
Фиг. 72J
FFU/лунка
1:5120
1:2560
1:1280
1:640
1:320
1:160
1:80
1:40

Фиг. 73

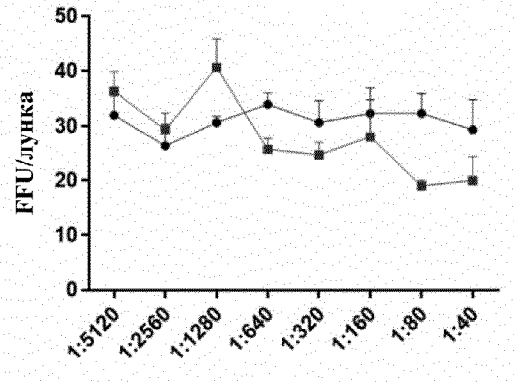
Фиг. 73A



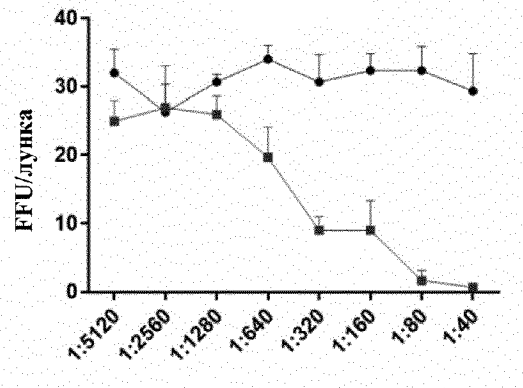
Фиг. 73B



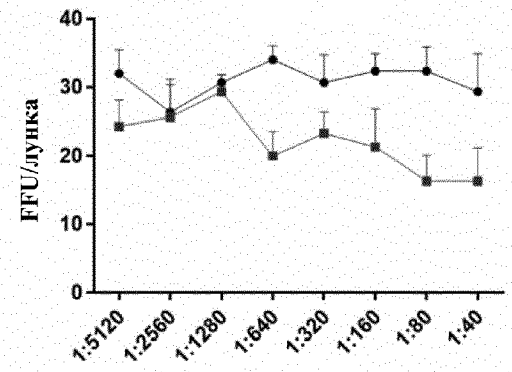
Фиг. 73C



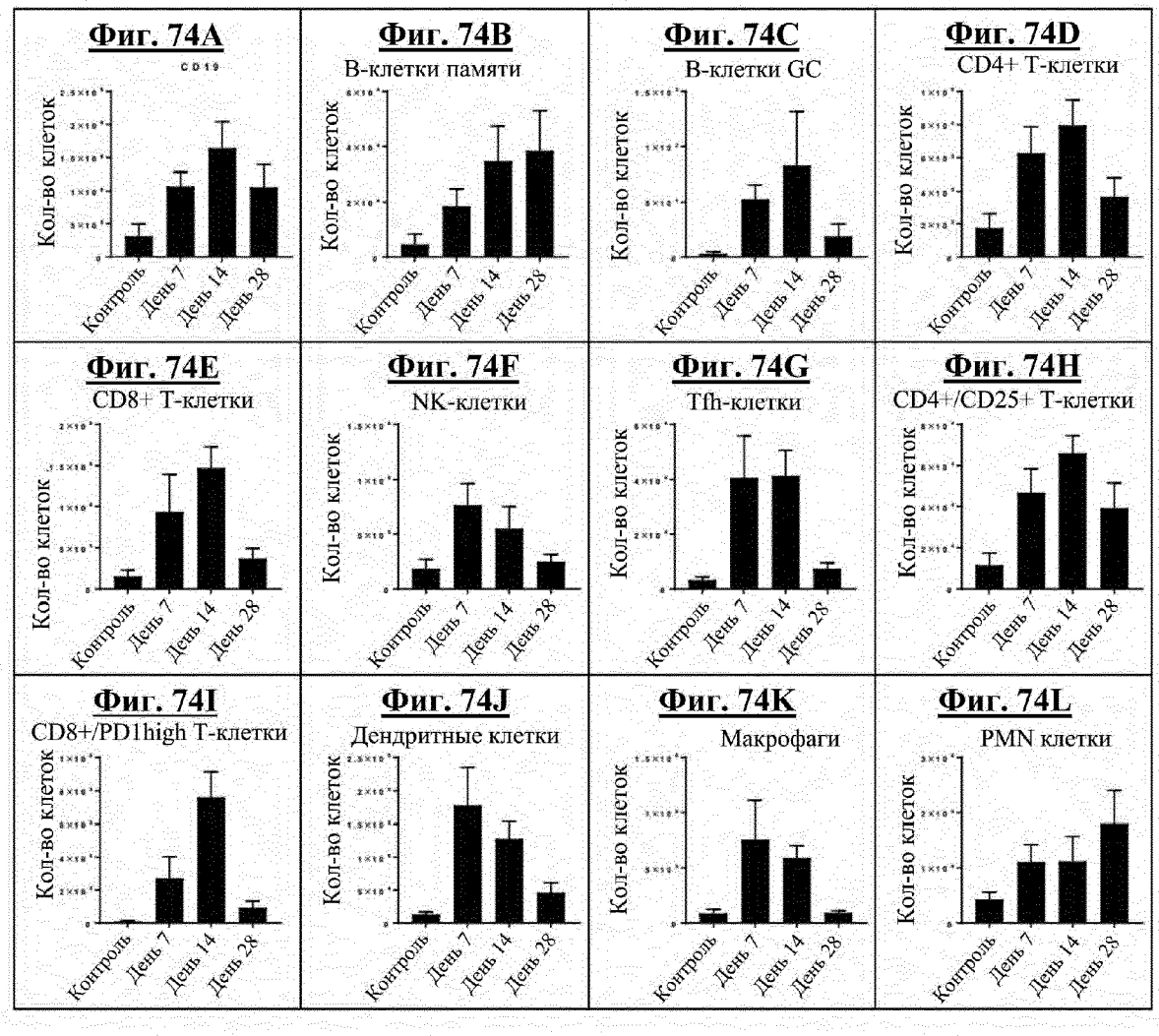
Фиг. 73D



Фиг. 73E

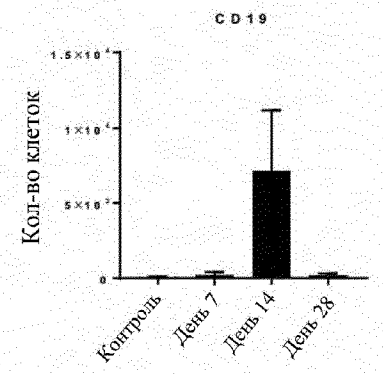


Фиг. 74

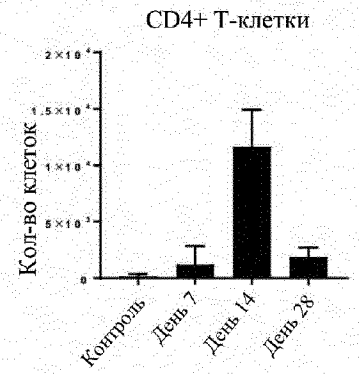

Фиг. 74A
CD19
Кол-во клеток
Контроль
День 7
День 14
День 28
Фиг. 74B
B-клетки памяти
Фиг. 74C
B-клетки GC
Фиг. 74D
CD4+ T-клетки
Фиг. 74E
CD8+ T-клетки
Фиг. 74F
NK-клетки
Фиг. 74G
Tfh-клетки
Фиг. 74H
CD4+/CD25+ T-клетки
Фиг. 74I
CD8+/PD1high T-клетки
Фиг. 74J
Дендритные клетки
Фиг. 74K
Макрофаги
Фиг. 74L
PMN клетки

Фиг. 75

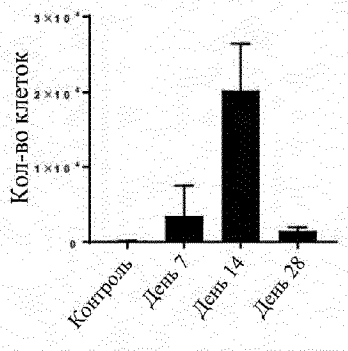
Фиг. 75A



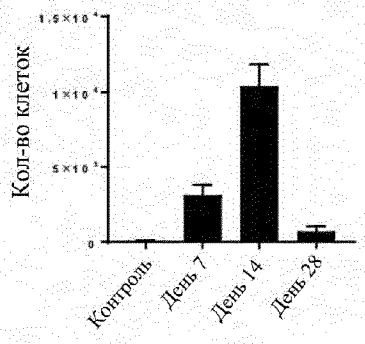
Фиг. 75B



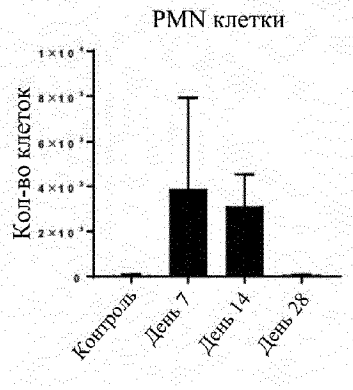
Фиг. 75C



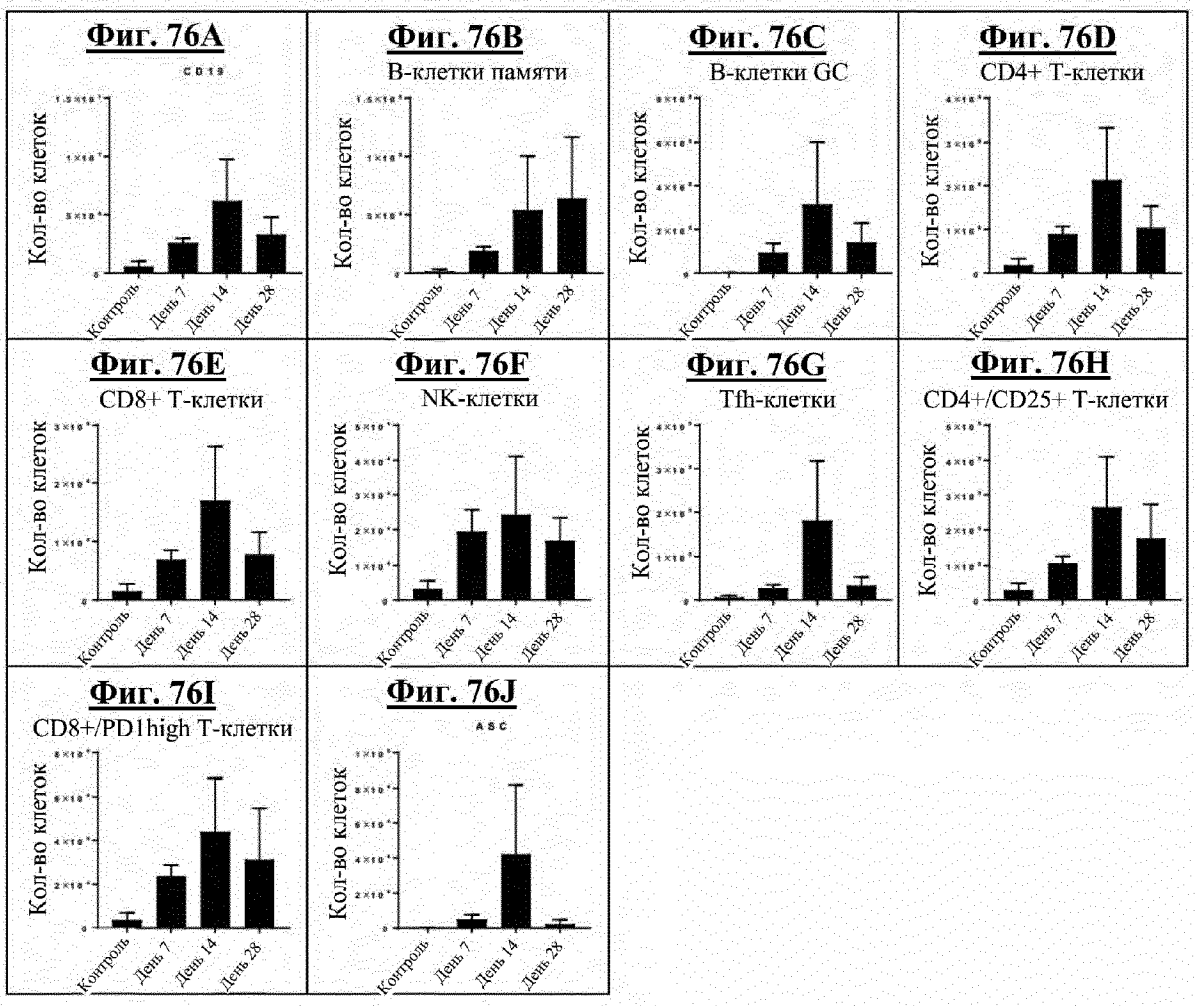
Фиг. 75D



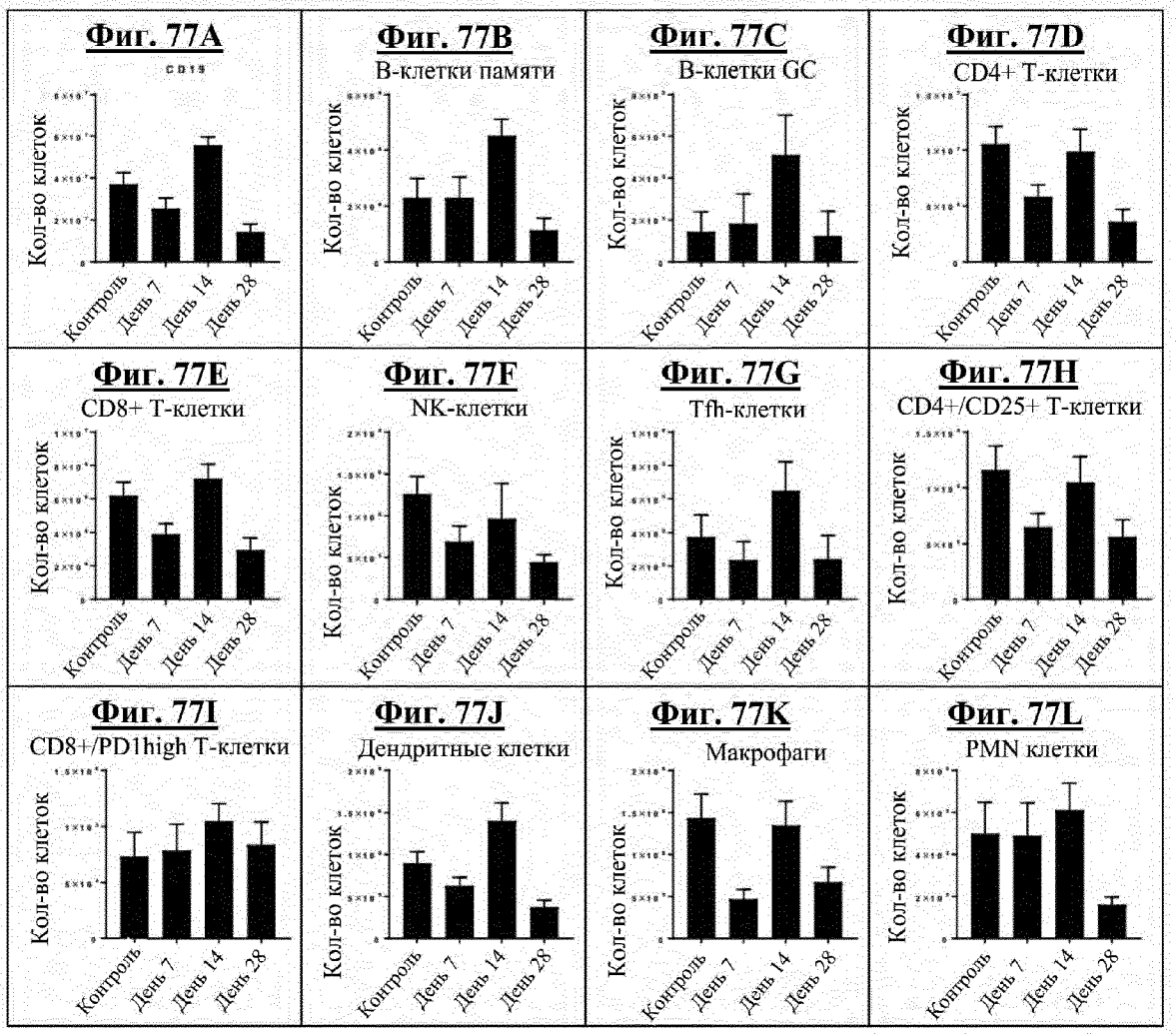
Фиг. 75E



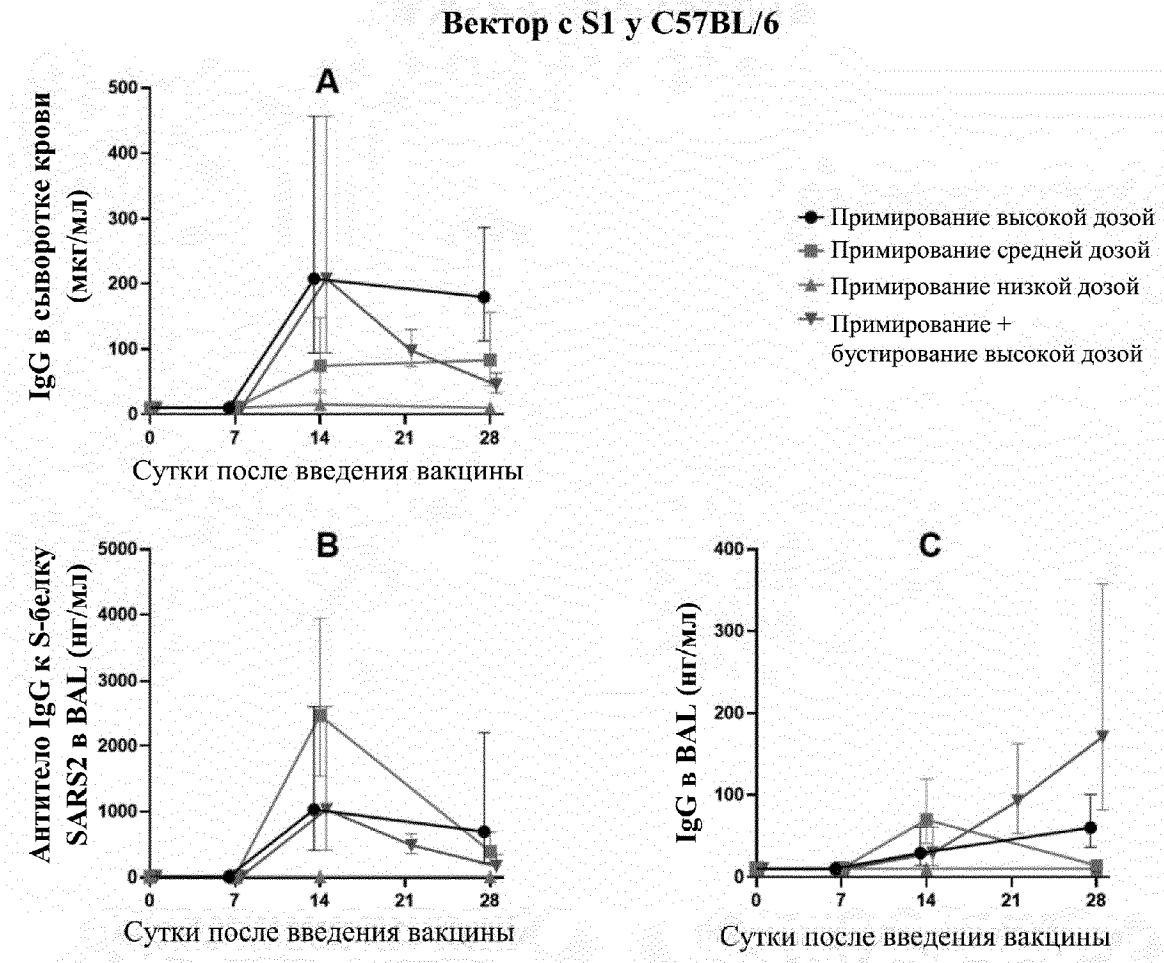
Фиг. 76


Фиг. 76A
CD19
Фиг. 76B
B-клетки памяти
Фиг. 76C
B-клетки GC
Фиг. 76D
CD4+ T-клетки
Фиг. 76E
CD8+ T-клетки
Фиг. 76F
NK-клетки
Фиг. 76G
Tfh-клетки
Фиг. 76H
CD4+/CD25+ T-клетки
Фиг. 76I
CD8+/PD1high T-клетки
Фиг. 76J
ASC
Кол-во клеток
Контроль
День 7
День 14
День 28

Фиг. 77

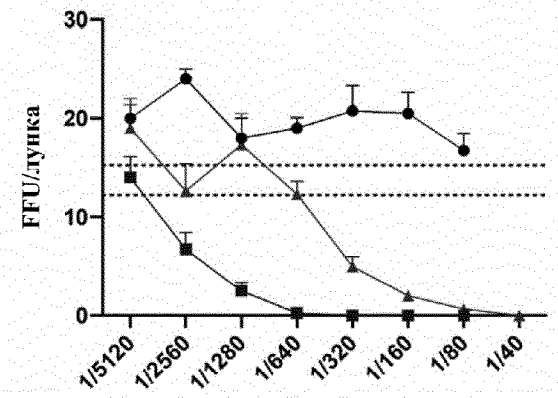

Фиг. 77A
CD19
Фиг. 77B
B-клетки памяти
Фиг. 77C
B-клетки GC
Фиг. 77D
CD4+ T-клетки
Фиг. 77E
CD8+ T-клетки
Фиг. 77F
NK-клетки
Фиг. 77G
Tfh-клетки
Фиг. 77H
CD4+/CD25+ T-клетки
Фиг. 77I
CD8+/PD1high T-клетки
Фиг. 77J
Дендритные клетки
Фиг. 77K
Макрофаги
Фиг. 77L
PMN клетки
Кол-во клеток
Контроль
День 7
День 14
День 28

Фиг. 78

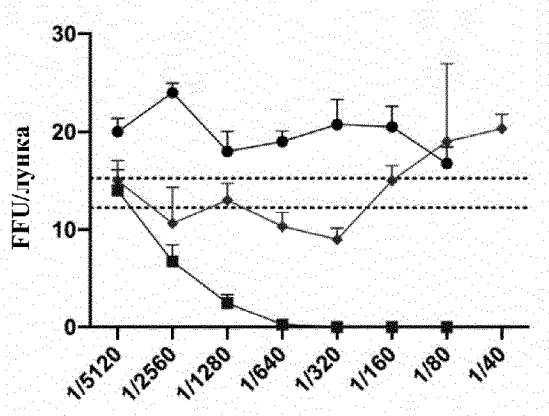

Вектор с S1 у C57BL/6
A
IgG в сыворотке крови (мкг/мл)
500
400
300
200
100
0
0
7
14
21
28
Сутки после введения вакцины
Примирование высокой дозой
Примирование средней дозой
Примирование низкой дозой
Примирование + бустирование высокой дозой
B
Антитело IgG к S-белку SARS2 в BAL (нг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
Сутки после введения вакцины
C
IgG в BAL (нг/мл)
400
300
200
100
0
Сутки после введения вакцины

Фиг. 79

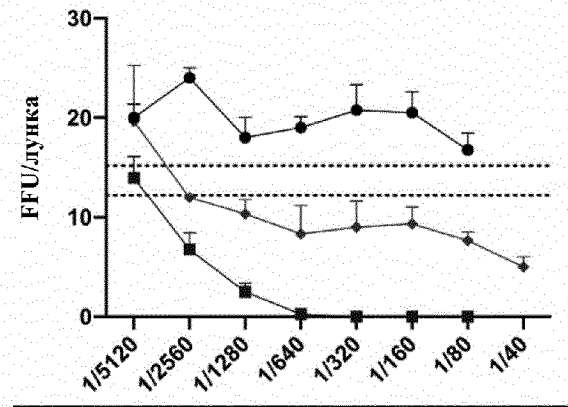
Фиг. 79A
V1A_V1A.1



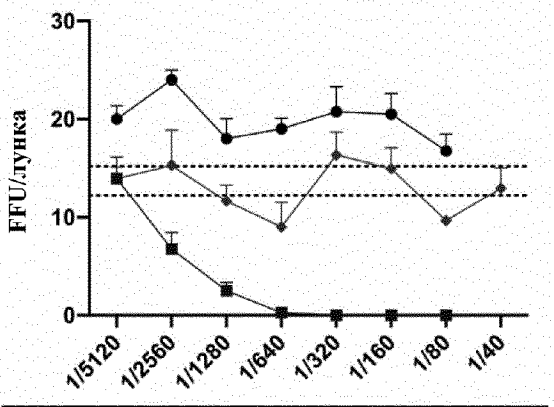
Фиг. 79B
V1A_V1A.2



Фиг. 79C
V1A_V1A.3

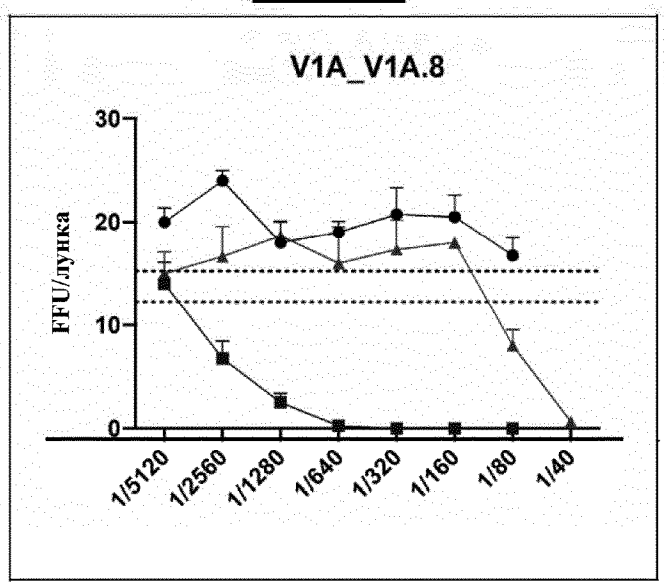


Фиг. 79D
V1A_V1A.7



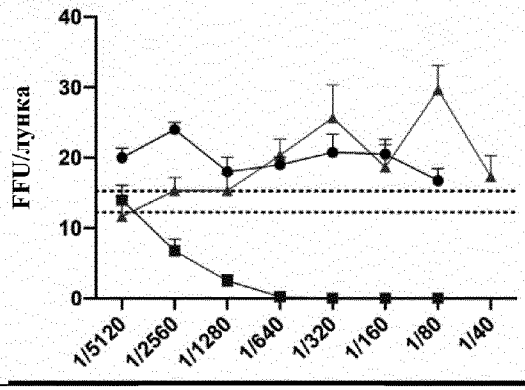
Фиг. 79 (продолжение)

Фиг. 79E

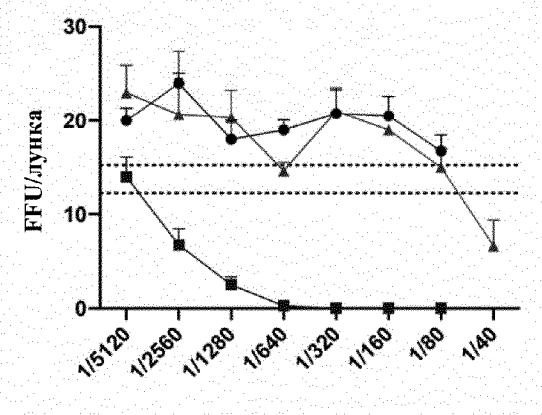


Фиг. 80

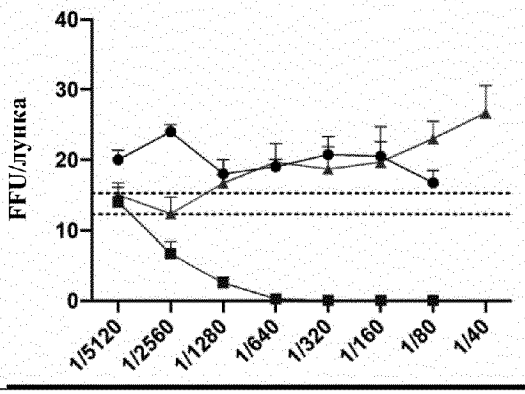
Фиг. 80A
V2B_V1B.1



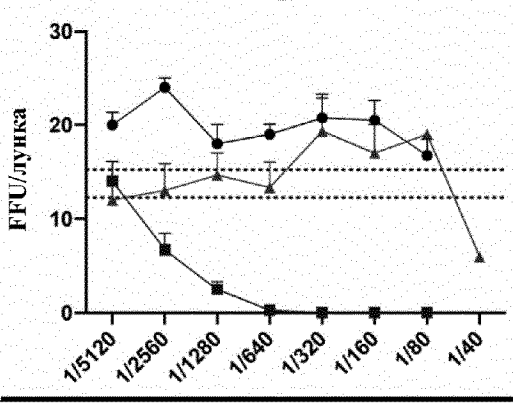
Фиг. 80B
V1B_V1B.2



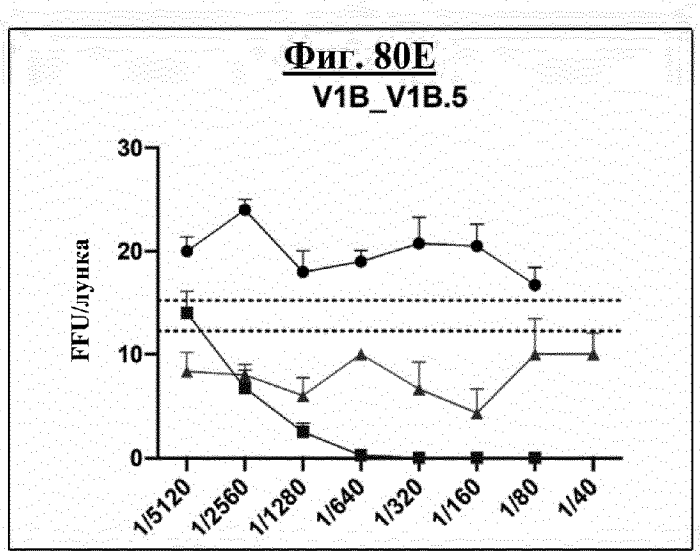
Фиг. 80C
V1B_V1B.3



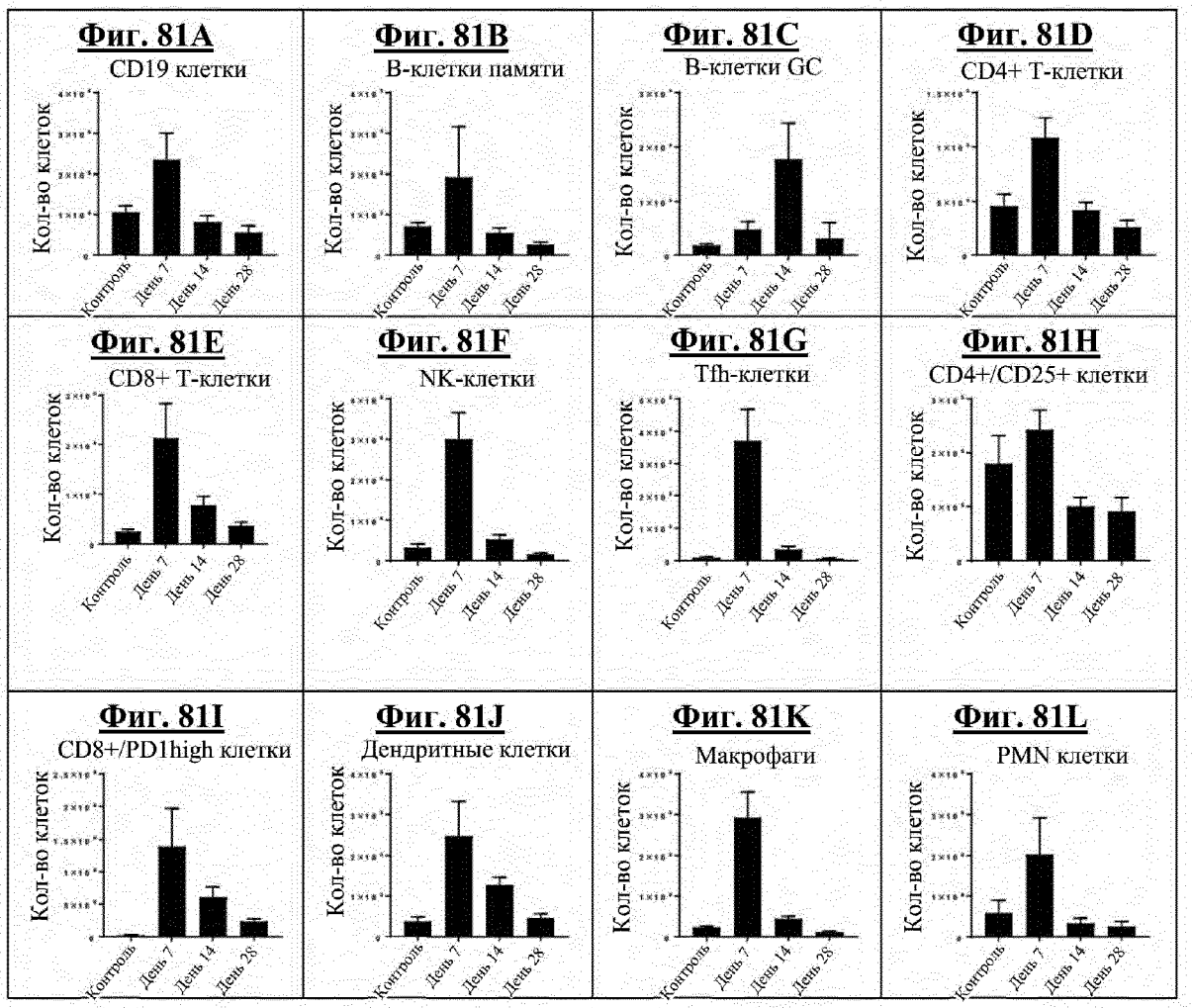
Фиг. 80D
V1B_V1B.4



Фиг. 80 (продолжение)



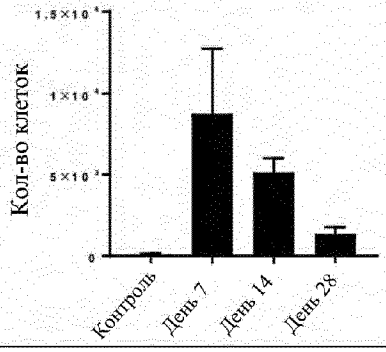
Фиг. 81


Фиг. 81A
CD19 клетки
Фиг. 81B
B-клетки памяти
Фиг. 81C
B-клетки GC
Фиг. 81D
CD4+ T-клетки
Фиг. 81E
CD8+ T-клетки
Фиг. 81F
NK-клетки
Фиг. 81G
Tfh-клетки
Фиг. 81H
CD4+/CD25+ клетки
Фиг. 81I
CD8+/PD1high клетки
Фиг. 81J
Дендритные клетки
Фиг. 81K
Макрофаги
Фиг. 81L
PMN клетки
Кол-во клеток
Контроль
День 7
День 14
День 28

Фиг. 82

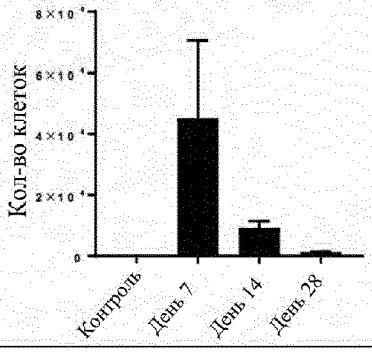
Фиг. 82A

CD4+ Т-клетки



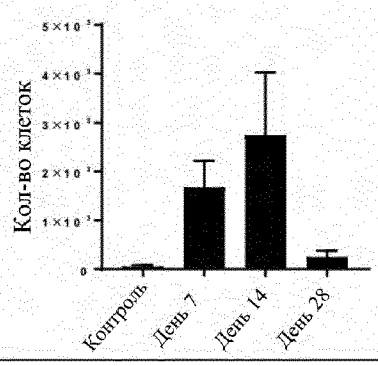
Фиг. 82B

CD8+ Т-клетки



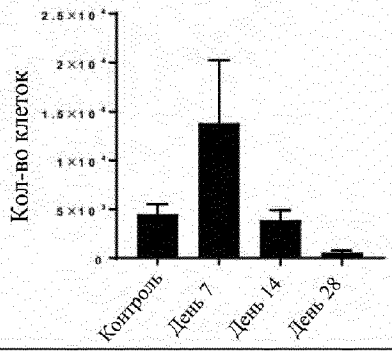
Фиг. 82C

CD19 клетки



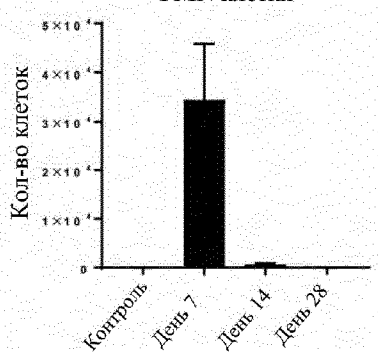
Фиг. 82D

Макрофаги

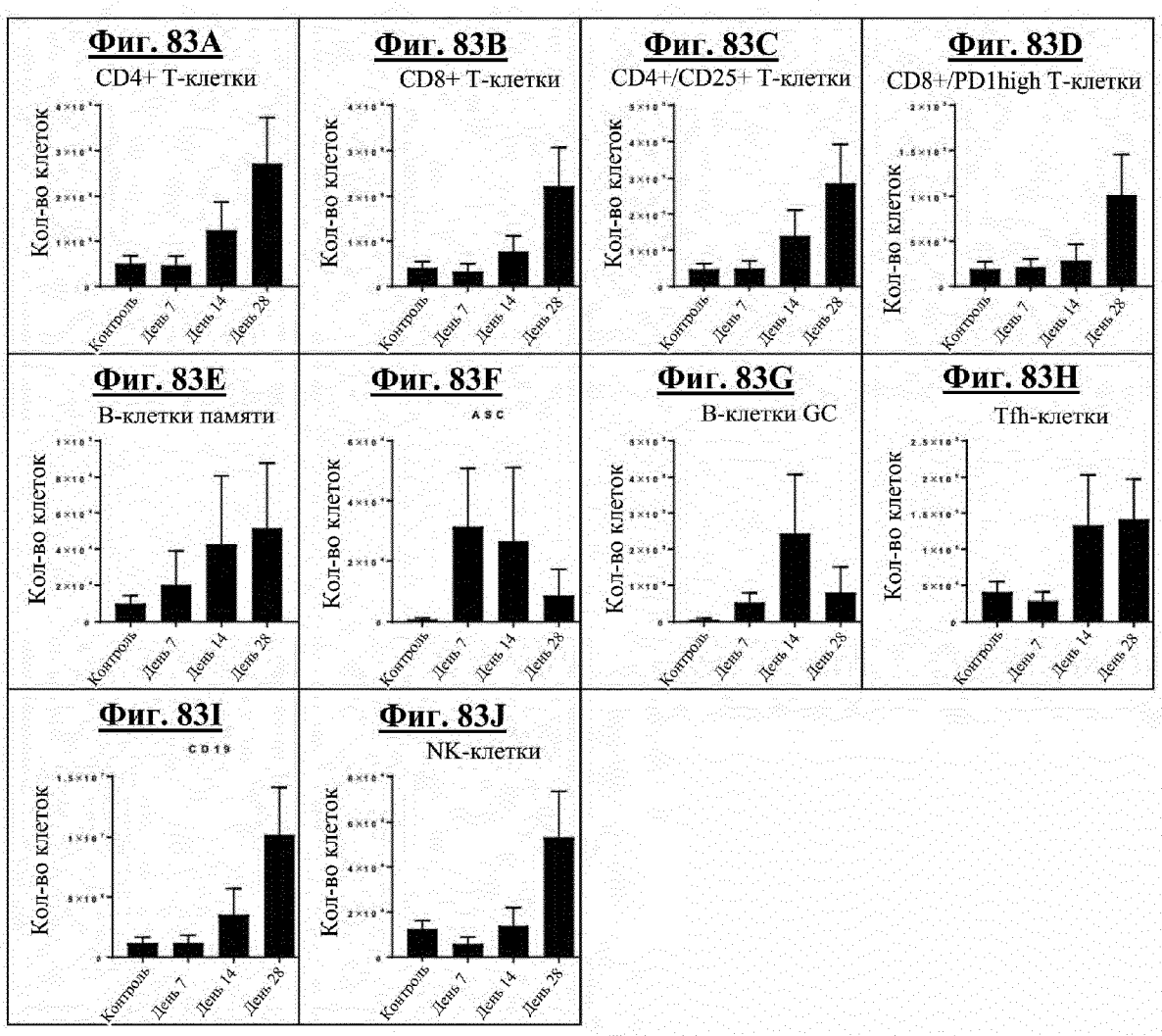


Фиг. 82E

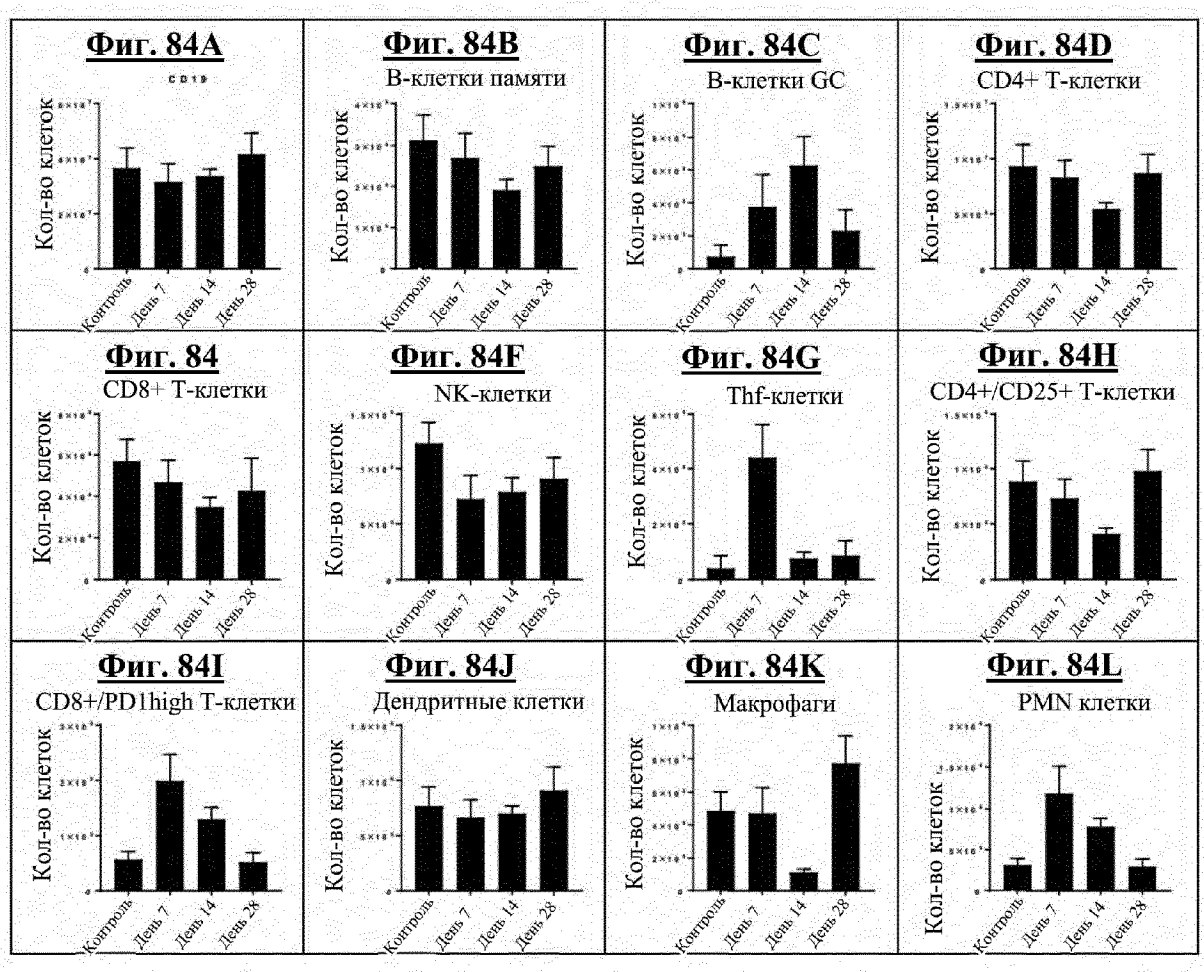
PMN клетки



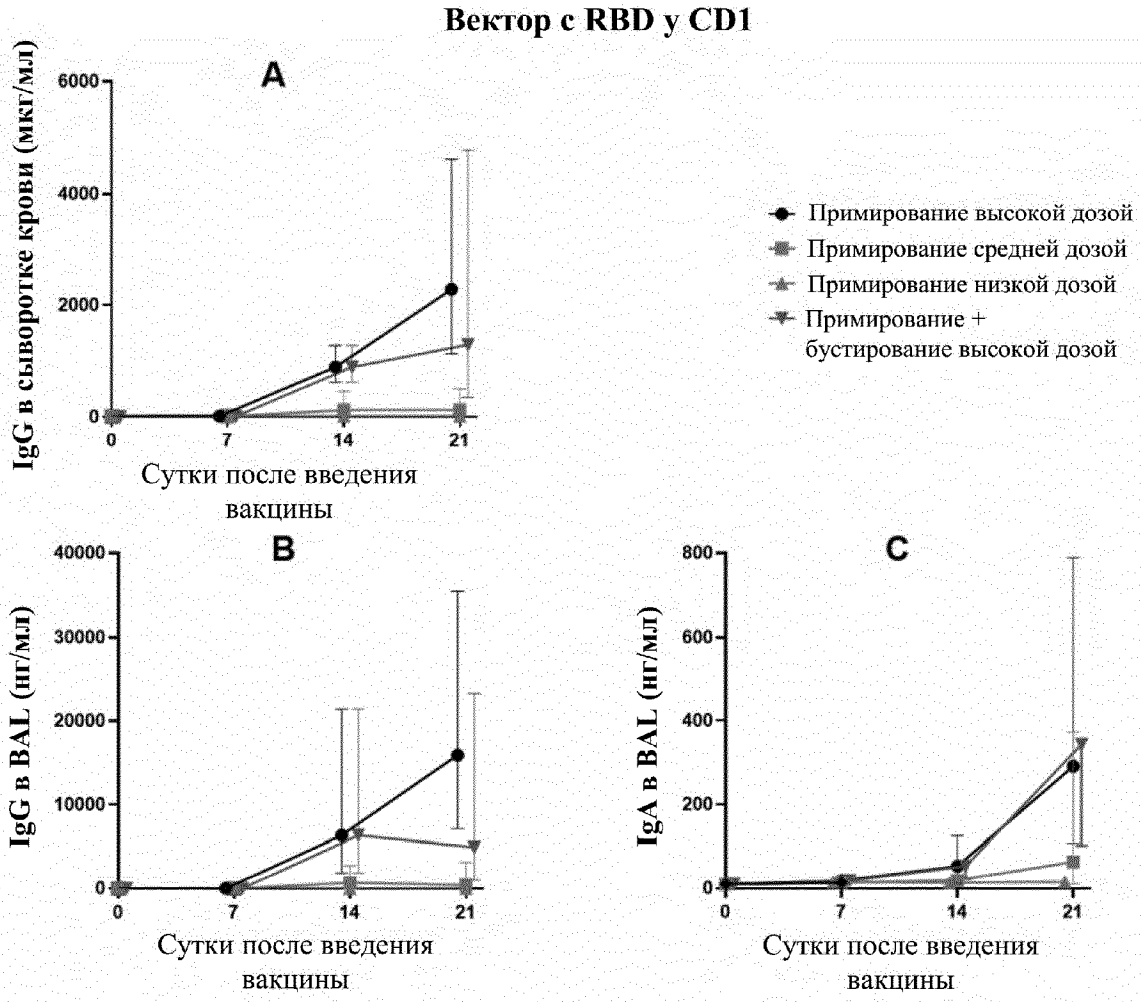
Фиг. 83


Фиг. 83A
CD4+ T-клетки
Фиг. 83B
CD8+ T-клетки
Фиг. 83C
CD4+/CD25+ T-клетки
Фиг. 83D
CD8+/PD1high T-клетки
Фиг. 83E
B-клетки памяти
Фиг. 83F
ASC
Фиг. 83G
B-клетки GC
Фиг. 83H
Tfh-клетки
Фиг. 83I
CD19
Фиг. 83J
NK-клетки
Кол-во клеток
Контроль
День 7
День 14
День 28

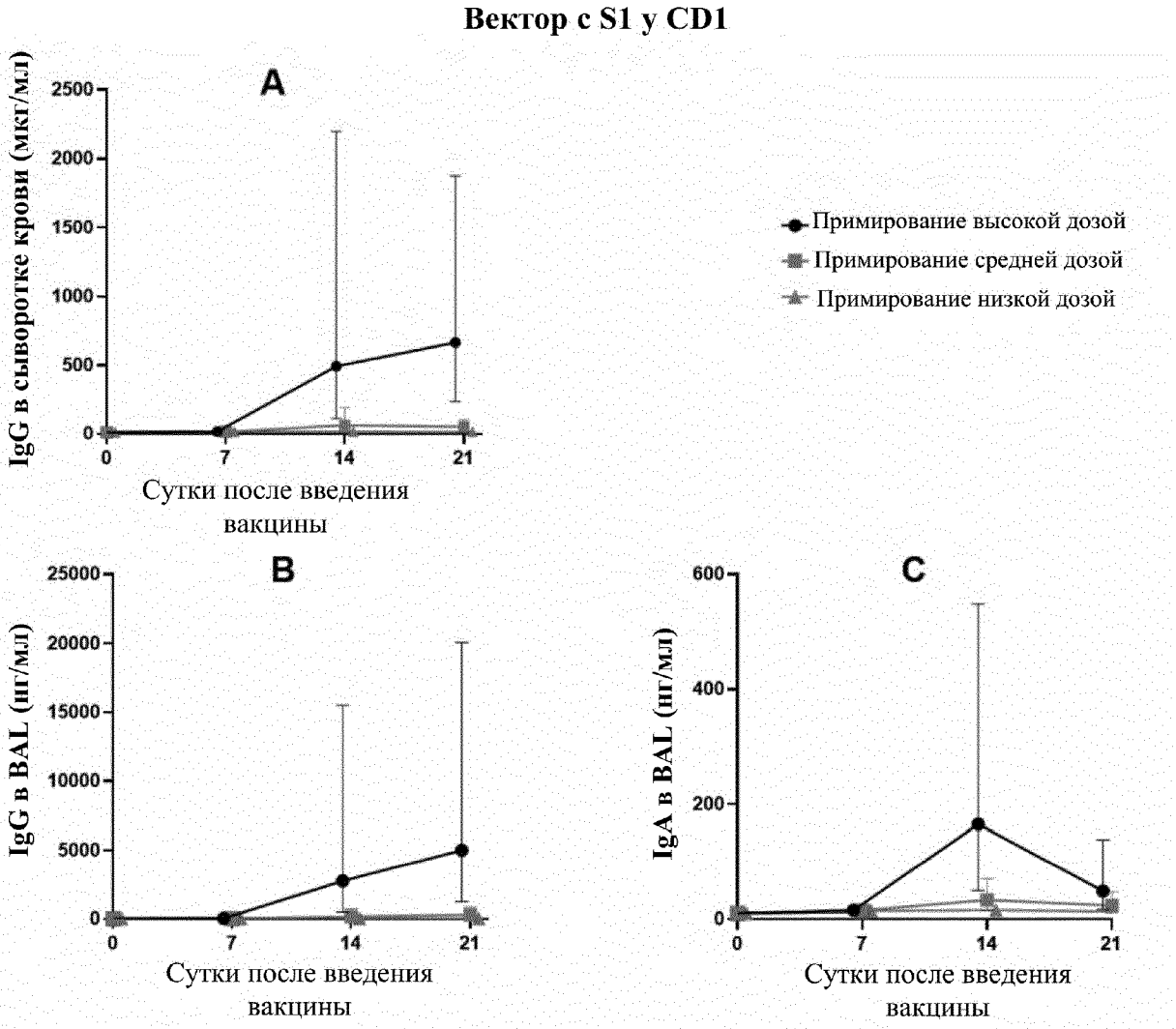
Фиг. 84


Фиг. 84A
CD19
Фиг. 84B
B-клетки памяти
Фиг. 84C
B-клетки GC
Фиг. 84D
CD4+ T-клетки
Фиг. 84
CD8+ T-клетки
Фиг. 84F
NK-клетки
Фиг. 84G
Thf-клетки
Фиг. 84H
CD4+/CD25+ T-клетки
Фиг. 84I
CD8+/PD1high T-клетки
Фиг. 84J
Дендритные клетки
Фиг. 84K
Макрофаги
Фиг. 84L
PMN клетки
Кол-во клеток
Контроль
День 7
День 14
День 28

Фиг. 85


Вектор с RBD у CD1
A
IgG в сыворотке крови (мкг/мл)
6000
4000
2000
0
0
7
14
21
Сутки после введения вакцины
Примирование высокой дозой
Примирование средней дозой
Примирование низкой дозой
Примирование + бустирование высокой дозой
B
IgG в BAL (нг/мл)
40000
30000
20000
10000
0
0
7
14
21
Сутки после введения вакцины
C
IgA в BAL (нг/мл)
800
600
400
200
0
0
7
14
21
Сутки после введения вакцины

Фиг. 86


Вектор с S1 у CD1
A
IgG в сыворотке крови (мкг/мл)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
Сутки после введения вакцины
Примирование высокой дозой
Примирование средней дозой
Примирование низкой дозой
B
IgG в BAL (нг/мл)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
7
14
21
Сутки после введения вакцины
C
IgA в BAL (нг/мл)
600
400
200
0
0
7
14
21
Сутки после введения вакцины

Фиг. 87A

SEQ ID NO: 410

(соединенный полипротеин SARS-CoV-2; полученный из SEQ ID NO: 1 (GenBank: MN908947.3)

MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVRDVLVRGFGDSVEEVLSEARQHLKDGTCGLVEVEKGVLPQLEQPYVFIKRS

DARTAPHGHVMVELVAELEGIQYGRSGETLGVLVPHVGEIPVAYRKVLLRKNGNKGAGGHSYGADLKSFDLGDE

LGTDPYEDFQENWNTKHSSGVTRELMRELNGGAYTRYVDNNFCGPDGYPLECIKDLLARAGKASCTLSEQLDFI

DTKRGVYCCREHEHEIAWYTERSEKSYELQTPFEIKLAKKFDTFNGECPNFVFPLNSIIKTIQPRVEKKKLDGF

MGRIRSVYPVASPNECNQMCLSTLMKCDHCGETSWQTGDFVKATCEFCGTENLTKEGATTCGYLPQNAVVKIYC

PACHNSEVGPEHSLAEYHNESGLKTILRKGGRTIAFGGCVFSYVGCHNKCAYWVPRASANIGCNHTGVVGEGSE

GLNDNLLEILQKEKVNINIVGDFKLNEEIAIILASFSASTSAFVETVKGLDYKAFKQIVESCGNFKVTKGKAKK

GAWNIGEQKSILSPLYAFASEAARVVRSIFSRTLETAQNSVRVLQKAAITILDGISQYSLRLIDAMMFTSDLAT

NNLVVMAYITGGVVQLTSQWLTNIFGTVYEKLKPVLDWLEEKFKEGVEFLRDGWEIVKFISTCACEIVGGQIVT

CAKEIKESVQTFFKLVNKFLALCADSIIIGGAKLKALNLGETFVTHSKGLYRKCVKSREETGLLMPLKAPKEII

FLEGETLPTEVLTEEVVLKTGDLQPLEQPTSEAVEAPLVGTPVCINGLMLLEIKDTEKYCALAPNMMVTNNTFT

LKGGAPTKVTFGDDTVIEVQGYKSVNITFELDERIDKVLNEKCSAYTVELGTEVNEFACVVADAVIKTLQPVSE

LLTPLGIDLDEWSMATYYLFDESGEFKLASHMYCSFYPPDEDEEEGDCEEEEFEPSTQYEYGTEDDYQGKPLEF

GATSAALQPEEEQEEDWLDDDSQQTVGQQDGSEDNQTTTIQTIVEVQPQLEMELTPVVQTIEVNSFSGYLKLTD

NVYIKNADIVEEAKKVKPTVVVNAANVYLKHGGGVAGALNKATNNAMQVESDDYIATNGPLKVGGSCVLSGHNL

AKHCLHVVGPNVNKGEDIQLLKSAYENFNQHEVLLAPLLSAGIFGADPIHSLRVCVDTVRTNVYLAVFDKNLYD

KLVSSFLEMKSEKQVEQKIAEIPKEEVKPFITESKPSVEQRKQDDKKIKACVEEVTTTLEETKFLTENLLLYID

INGNLHPDSATLVSDIDITFLKKDAPYIVGDVVQEGVLTAVVIPTKKAGGTTEMLAKALRKVPTDNYITTYPGQ

GLNGYTVEEAKTVLKKCKSAFYILPSIISNEKQEILGTVSWNLREMLAHAEETRKLMPVCVETKAIVSTIQRKY

KGIKIQEGVVDYGARFYFYTSKTTVASLINTLNDLNETLVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRSLKVPATVSVSSP

DAVTAYNGYLTSSSKTPEEHFIETISLAGSYKDWSYSGQSTQLGIEFLKRGDKSVYYTSNPTTFHLDGEVITFD

NLKTLLSLREVRTIKVFTTVDNINLHTQVVDMSMTYGQQFGPTYLDGADVTKIKPHNSHEGKTFYVLPNDDTLR

VEAFEYYHTTDPSFLGRYMSALNHTKKWKYPQVNGLTSIKWADNNCYLATALLTLQQIELKFNPPALQDAYYRA

Фиг. 87B

SEQ ID NO: 410 (продолжение)

RAGEAANFCALILAYCNKTVGELGDVRETMSYLFQHANLDSCKRVLNVVCKTCGQQQTTLKGVEAVMYMGTLSY

EQFKKGVQIPCTCGKQATKYLVQQESPFVMMSAPPAQYELKHGTFTCASEYTGNYQCGHYKHITSKETLYCIDG

ALLTKSSEYKGPITDVFYKENSYTTTIKPVTYKLDGVVCTEIDPKLDNYYKKDNSYFTEQPIDLVPNQPYPNAS

FDNFKFVCDNIKFADDLNQLTGYKKPASRELKVTFFPDLNGDVVAIDYKHYTPSFKKGAKLLHKPIVWHVNNAT

NKATYKPNTWCIRCLWSTKPVETSNSFDVLKSEDAQGMDNLACEDLKPVSEEVVENPTIQKDVLECNVKTTEVV

GDIILKPANNSLKITEEVGHTDLMAAYVDNSSLTIKKPNELSRVLGLKTLATHGLAAVNSVPWDTIANYAKPFL

NKVVSTTTNIVTRCLNRVCTNYMPYFFTLLLQLCTFTRSTNSRIKASMPTTIAKNTVKSVGKFCLEASFNYLKS

PNFSKLINIIIWFLLLSVCLGSLIYSTAALGVLMSNLGMPSYCTGYREGYLNSTNVTIATYCTGSIPCSVCLSG

LDSLDTYPSLETIQITISSFKWDLTAFGLVAEWFLAYILFTRFFYVLGLAAIMQLFFSYFAVHFISNSWLMWLI

INLVQMAPISAMVRMYIFFASFYYVWKSYVHVVDGCNSSTCMMCYKRNRATRVECTTIVNGVRRSFYVYANGGK

GFCKLHNWNCVNCDTFCAGSTFISDEVARDLSLQFKRPINPTDQSSYIVDSVTVKNGSIHLYFDKAGQKTYERH

SLSHFVNLDNLRANNTKGSLPINVIVFDGKSKCEESSAKSASVYYSQLMCQPILLLDQALVSDVGDSAEVAVKM

FDAYVNTFSSTFNVPMEKLKTLVATAEAELAKNVSLDNVLSTFISAARQGFVDSDVETKDVVECLKLSHQSDIE

VTGDSCNNYMLTYNKVENMTPRDLGACIDCSARHINAQVAKSHNIALIWNVKDFMSLSEQLRKQIRSAAKKNNL

PFKLTCATTRQVVNVVTTKIALKGGKIVNNWLKQLIKVTLVFLFVAAIFYLITPVHVMSKHTDFSSEIIGYKAI

DGGVTRDIASTDTCFANKHADFDTWFSQRGGSYTNDKACPLIAAVITREVGFVVPGLPGTILRTTNGDFLHFLP

RVFSAVGNICYTPSKLIEYTDFATSACVLAAECTIFKDASGKPVPYCYDTNVLEGSVAYESLRPDTRYVLMDGS

IIQFPNTYLEGSVRVVTTFDSEYCRHGTCERSEAGVCVSTSGRWVLNNDYYRSLPGVFCGVDAVNLLTNMFTPL

IQPIGALDISASIVAGGIVAIVVTCLAYYFMRFRRAFGEYSHVVAFNTLLFLMSFTVLCLTPVYSFLPGVYSVI

YLYLTFYLTNDVSFLAHIQWMVMFTPLVPFWITIAYIICISTKHFYWFFSNYLKRRVVFNGVSFSTFEEAALCT

FLLNKEMYLKLRSDVLLPLTQYNRYLALYNKYKYFSGAMDTTSYREAACCHLAKALNDFSNSGSDVLYQPPQTS

ITSAVLQSGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDVVYCPRHVICTSEDMLNPNYEDLLIRKSNHNFL

VQAGNVQLRVIGHSMQNCVLKLKVDTANPKTPKYKFVRIQPGQTFSVLACYNGSPSGVYQCAMRPNFTIKGSFL

NGSCGSVGFNIDYDCVSFCYMHHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVING

DRWFLNRFTTTLNDFNLVAMKYNYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILGSALLED

EFTPFDVVRQCSGVTFQSAVKRTIKGTHHWLLLTILTSLLVLVQSTQWSLFFFLYENAFLPFAMGIIAMSAFAM

MFVKHKHAFLCLFLLPSLATVAYFNMVYMPASWVMRIMTWLDMVDTSLSGFKLKDCVMYASAVVLLILMTARTV

Фиг. 87C

SEQ ID NO: 410 (продолжение)

YDDGARRVWTLMNVLTLVYKVYYGNALDQAISMWALIISVTSNYSGVVTTVMFLARGIVFMCVEYCPIFFITGN

TLQCIMLVYCFLGYFCTCYFGLFCLLNRYFRLTLGVYDYLVSTQEFRYMNSQGLLPPKNSIDAFKLNIKLLGVG

GKPCIKVATVQSKMSDVKCTSVVLLSVLQQLRVESSSKLWAQCVQLHNDILLAKDTTEAFEKMVSLLSVLLSMQ

GAVDINKLCEEMLDNRATLQAIASEFSSLPSYAAFATAQEAYEQAVANGDSEVVLKKLKKSLNVAKSEFDRDAA

MQRKLEKMADQAMTQMYKQARSEDKRAKVTSAMQTMLFTMLRKLDNDALNNIINNARDGCVPLNIIPLTTAAKL

MVVIPDYNTYKNTCDGTTFTYASALWEIQQVVDADSKIVQLSEISMDNSPNLAWPLIVTALRANSAVKLQNNEL

SPVALRQMSCAAGTTQTACTDDNALAYYNTTKGGRFVLALLSDLQDLKWARFPKSDGTGTIYTELEPPCRFVTD

TPKGPKVKYLYFIKGLNNLNRGMVLGSLAATVRLQAGNATEVPANSTVLSFCAFAVDAAKAYKDYLASGGQPIT

NCVKMLCTHTGTGQAITVTPEANMDQESFGGASCCLYCRCHIDHPNPKGFCDLKGKYVQIPTTCANDPVGFTLK

NTVCTVCGMWKGYGCSCDQLREPMLQSADAQSFLNRVCGVSAARLTPCGTGTSTDVVYRAFDIYNDKVAGFAKF

LKTNCCRFQEKDEDDNLIDSYFVVKRHTFSNYQHEETIYNLLKDCPAVAKHDFFKFRIDGDMVPHISRQRLTKY

TMADLVYALRHFDEGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKKDWYDFVENPDILRVYANLGERVRQALLKTVQFCDAM

RNAGIVGVLTLDNQDLNGNWYDFGDFIQTTPGSGVPVVDSYYSLLMPILTLTRALTAESHVDTDLTKPYIKWDL

LKYDFTEERLKLFDRYFKYWDQTYHPNCVNCLDDRCILHCANFNVLFSTVFPPTSFGPLVRKIFVDGVPFVVST

GYHFRELGVVHNQDVNLHSSRLSFKELLVYAADPAMHAASGNLLLDKRTTCFSVAALTNNVAFQTVKPGNFNKD

FYDFAVSKGFFKEGSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYYRYNLPTMCDIRQLLFVVEVVDKYFDCYDGGCINANQ

VIVNNLDKSAGFPFNKWGKARLYYDSMSYEDQDALFAYTKRNVIPTITQMNLKYAISAKNRARTVAGVSICSTM

TNRQFHQKLLKSIAATRGATVVIGTSKFYGGWHNMLKTVYSDVENPHLMGWDYPKCDRAMPNMLRIMASLVLAR

KHTTCCSLSHRFYRLANECAQVLSEMVMCGGSLYVKPGGTSSGDATTAYANSVFNICQAVTANVNALLSTDGNK

IADKYVRNLQHRLYECLYRNRDVDTDFVNEFYAYLRKHFSMMILSDDAVVCFNSTYASQGLVASIKNFKSVLYY

QNNVFMSEAKCWTETDLTKGPHEFCSQHTMLVKQGDDYVYLPYPDPSRILGAGCFVDDIVKTDGTLMIERFVSL

AIDAYPLTKHPNQEYADVFHLYLQYIRKLHDELTGHMLDMYSVMLTNDNTSRYWEPEFYEAMYTPHTVLQAVGA

CVLCNSQTSLRCGACIRRPFLCCKCCYDHVISTSHKLVLSVNPYVCNAPGCDVTDVTQLYLGGMSYYCKSHKPP

ISFPLCANGQVFGLYKNTCVGSDNVTDFNAIATCDWTNAGDYILANTCTERLKLFAAETLKATEETFKLSYGIA

TVREVLSDRELHLSWEVGKPRPPLNRNYVFTGYRVTKNSKVQIGEYTFEKGDYGDAVVYRGTTTYKLNVGDYFV

LTSHTVMPLSAPTLVPQEHYVRITGLYPTLNISDEFSSNVANYQKVGMQKYSTLQGPPGTGKSHFAIGLALYYP

SARIVYTACSHAAVDALCEKALKYLPIDKCSRIIPARARVECFDKFKVNSTLEQYVFCTVNALPETTADIVVFD

Фиг. 87D

SEQ ID NO: 410 (продолжение)

EISMATNYDLSVVNARLRAKHYVYIGDPAQLPAPRTLLTKGTLEPEYFNSVCRLMKTIGPDMFLGTCRRCPAEI

VDTVSALVYDNKLKAHKDKSAQCFKMFYKGVITHDVSSAINRPQIGVVREFLTRNPAWRKAVFISPYNSQNAVA

SKILGLPTQTVDSSQGSEYDYVIFTQTTETAHSCNVNRFNVAITRAKVGILCIMSDRDLYDKLQFTSLEIPRRN

VATLQAENVTGLFKDCSKVITGLHPTQAPTHLSVDTKFKTEGLCVDIPGIPKDMTYRRLISMMGFKMNYQVNGY

PNMFITREEAIRHVRAWIGFDVEGCHATREAVGTNLPLQLGFSTGVNLVAVPTGYVDTPNNTDFSRVSAKPPPG

DQFKHLIPLMYKGLPWNVVRIKIVQMLSDTLKNLSDRVVFVLWAHGFELTSMKYFVKIGPERTCCLCDRRATCF

STASDTYACWHHSIGFDYVYNPFMIDVQQWGFTGNLQSNHDLYCQVHGNAHVASCDAIMTRCLAVHECFVKRVD

WTIEYPIIGDELKINAACRKVQHMVVKAALLADKFPVLHDIGNPKAIKCVPQADVEWKFYDAQPCSDKAYKIEE

LFYSYATHSDKFTDGVCLFWNCNVDRYPANSIVCRFDTRVLSNLNLPGCDGGSLYVNKHAFHTPAFDKSAFVNL

KQLPFFYYSDSPCESHGKQVVSDIDYVPLKSATCITRCNLGGAVCRHHANEYRLYLDAYNMMISAGFSLWVYKQ

FDTYNLWNTFTRLQSLENVAFNVVNKGHFDGQQGEVPVSIINNTVYTKVDGVDVELFENKTTLPVNVAFELWAK

RNIKPVPEVKILNNLGVDIAANTVIWDYKRDAPAHISTIGVCSMTDIAKKPTETICAPLTVFFDGRVDGQVDLF

RNARNGVLITEGSVKGLQPSVGPKQASLNGVTLIGEAVKTQFNYYKKVDGVVQQLPETYFTQSRNLQEFKPRSQ

MEIDFLELAMDEFIERYKLEGYAFEHIVYGDFSHSQLGGLHLLIGLAKRFKESPFELEDFIPMDSTVKNYFITD

AQTGSSKCVCSVIDLLLDDFVEIIKSQDLSVVSKVVKVTIDYTEISFMLWCKDGHVETFYPKLQSSQAWQPGVA

MPNLYKMQRMLLEKCDLQNYGDSATLPKGIMMNVAKYTQLCQYLNTLTLAVPYNMRVIHFGAGSDKGVAPGTAV

LRQWLPTGTLLVDSDLNDFVSDADSTLIGDCATVHTANKWDLIISDMYDPKTKNVTKENDSKEGFFTYICGFIQ

QKLALGGSVAIKITEHSWNADLYKLMGHFAWWTAFVTNVNASSSEAFLIGCNYLGKPREQIDGYVMHANYIFWR

NTNPIQLSSYSLFDMSKFPLKLRGTAVMSLKEGQINDMILSLLSKGRLIIRENNRVVISSDVLVNNMFVFLVLL

PLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNP

VLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESE

FRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLP

IGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLK

SFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFK

CYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYL

YRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCG

PKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITP

Фиг. 87E

SEQ ID NO: 410 (продолжение)

GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASY

QTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTE

CSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLL

FNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQI

PFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNF

GAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCG

KGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTD

NTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKN

LNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLK

GVKLHYTMDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPSDFVRATATIPIQASLPFGWLIVGVALLAVFQSASKIITLKK

RWQLALSKGVHFVCNLLLLFVTVYSHLLLVAAGLEAPFLYLYALVYFLQSINFVRIIMRLWLCWKCRSKNPLLY

DANYFLCWHTNCYDYCIPYNSVTSSIVITSGDGTTSPISEHDYQIGGYTEKWESGVKDCVVLHSYFTSDYYQLY

STQLSTDTGVEHVTFFIYNKIVDEPEEHVQIHTIDGSSGVVNPVMEPIYDEPTTTTSVPLMYSFVSEETGTLIV

NSVLLFLAFVVFLLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVSLVKPSFYVYSRVKNLNSSRVPDLLVMADSNGTITVEEL

KKLLEQWNLVIGFLFLTWICLLQFAYANRNRFLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAVYRINWITGGIAIAMACL

VGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDI

KDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLNTDHSSSSDNIALLVQMFHLVDFQVTIAE

ILLIIMRTFKVSIWNLDYIINLIIKNLSKSLTENKYSQLDEEQPMEIDMKIILFLALITLATCELYHYQECVRG

TTVLLKEPCSSGTYEGNSPFHPLADNKFALTCFSTQFAFACPDGVKHVYQLRARSVSPKLFIRQEEVQELYSPI

FLIVAAIVFITLCFTLKRKTEMIELSLIDFYLCFLAFLLFLVLIMLIIFWFSLELQDHNETCHAMKFLVFLGII

TTVAAFHQECSLQSCTQHQPYVVDDPCPIHFYSKWYIRVGARKSAPLIELCVDEAGSKSPIQYIDIGNYTVSCL

PFTINCQEPKLGSLVVRCSFYEDFLEYHDVRVVLDFIMSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARS

KQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSPRWYFY

YLGTGPEAGLPYGANKDGIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSR

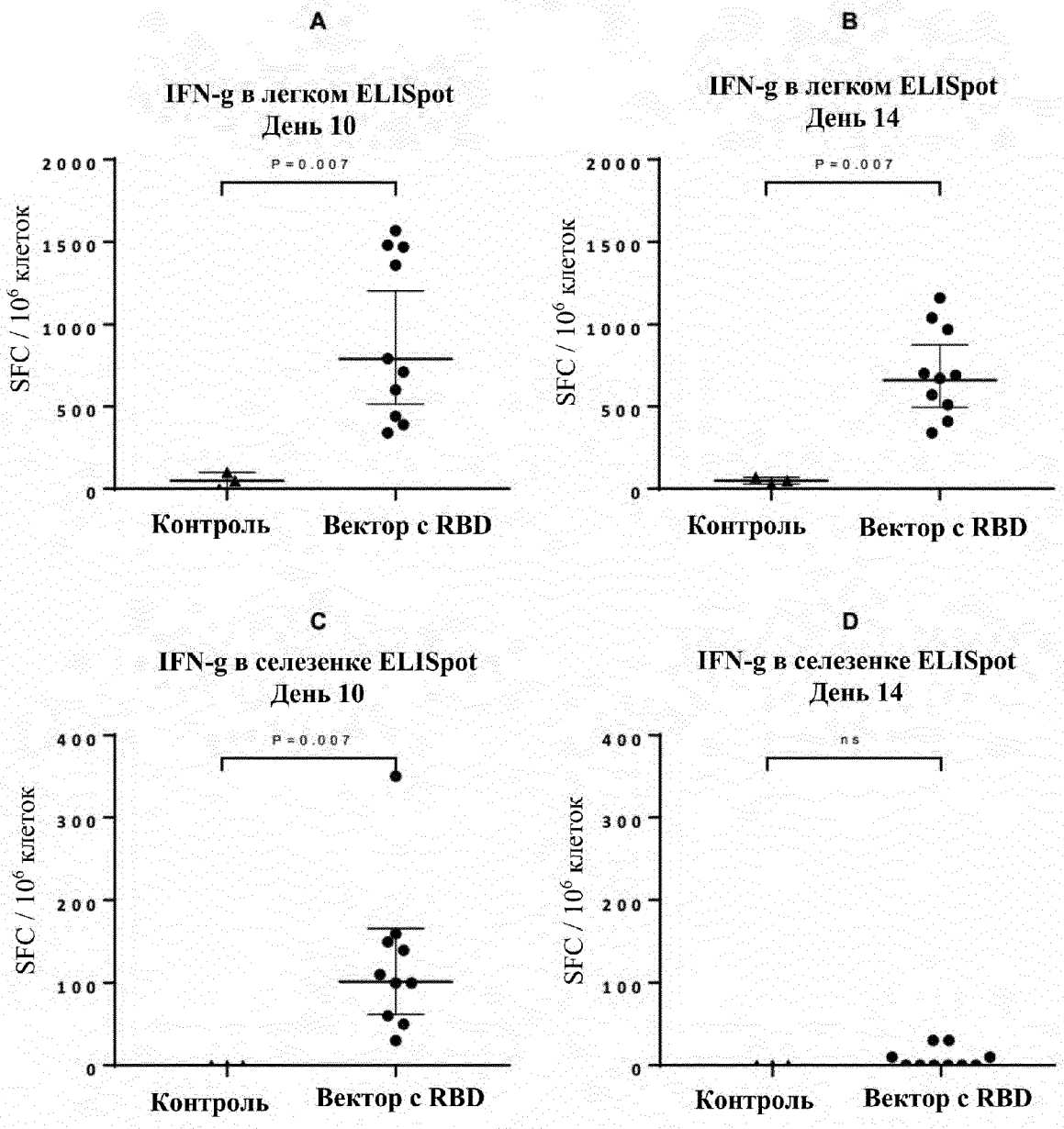
SSSRSRNSSRNSTPGSSRGTSPARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPR

QKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTY

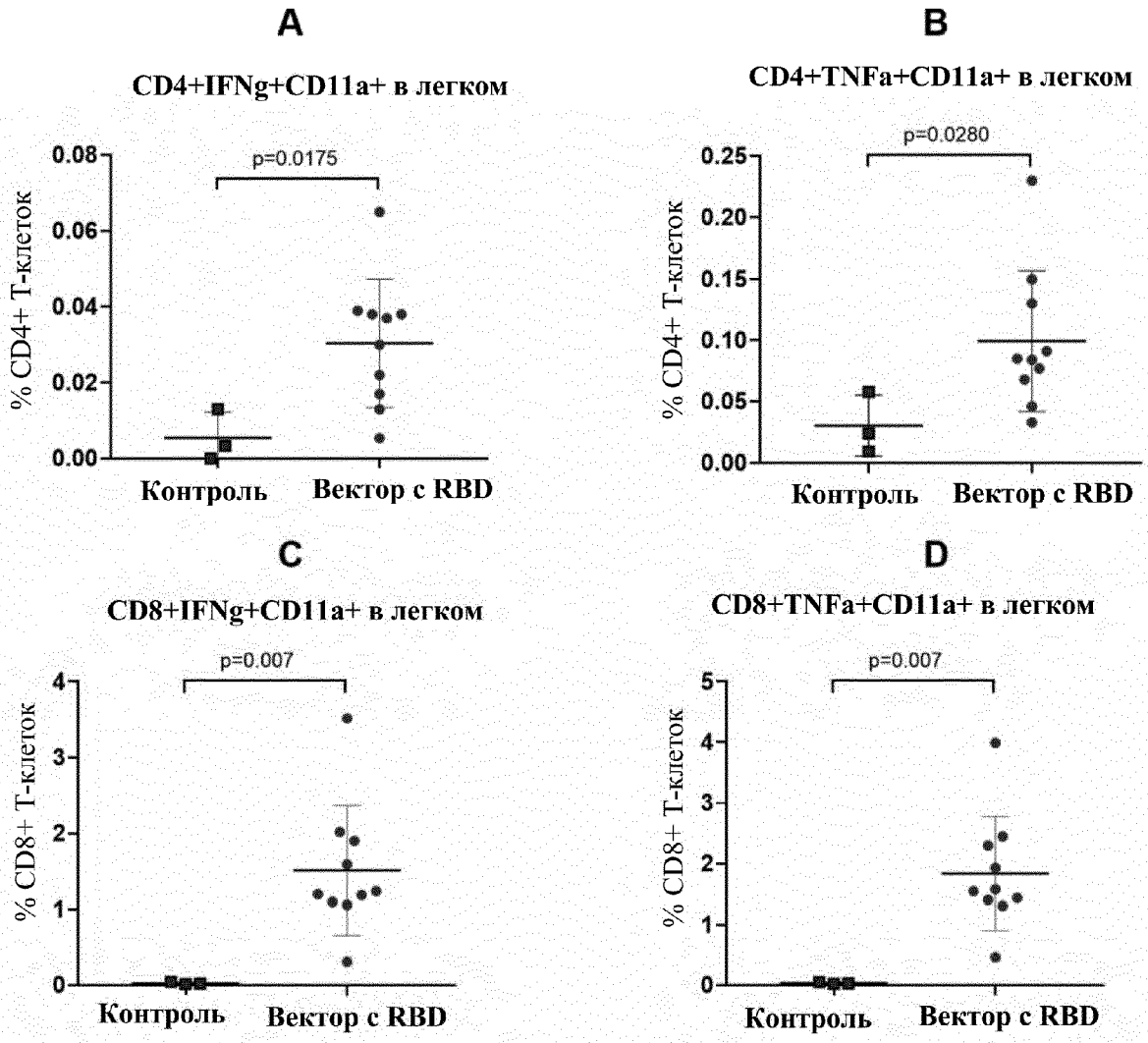
TGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQL

QQSMSSADSTQAMGYINVFAFPFTIYSLLLCRMNSRNYIAQVDVVNFNLT

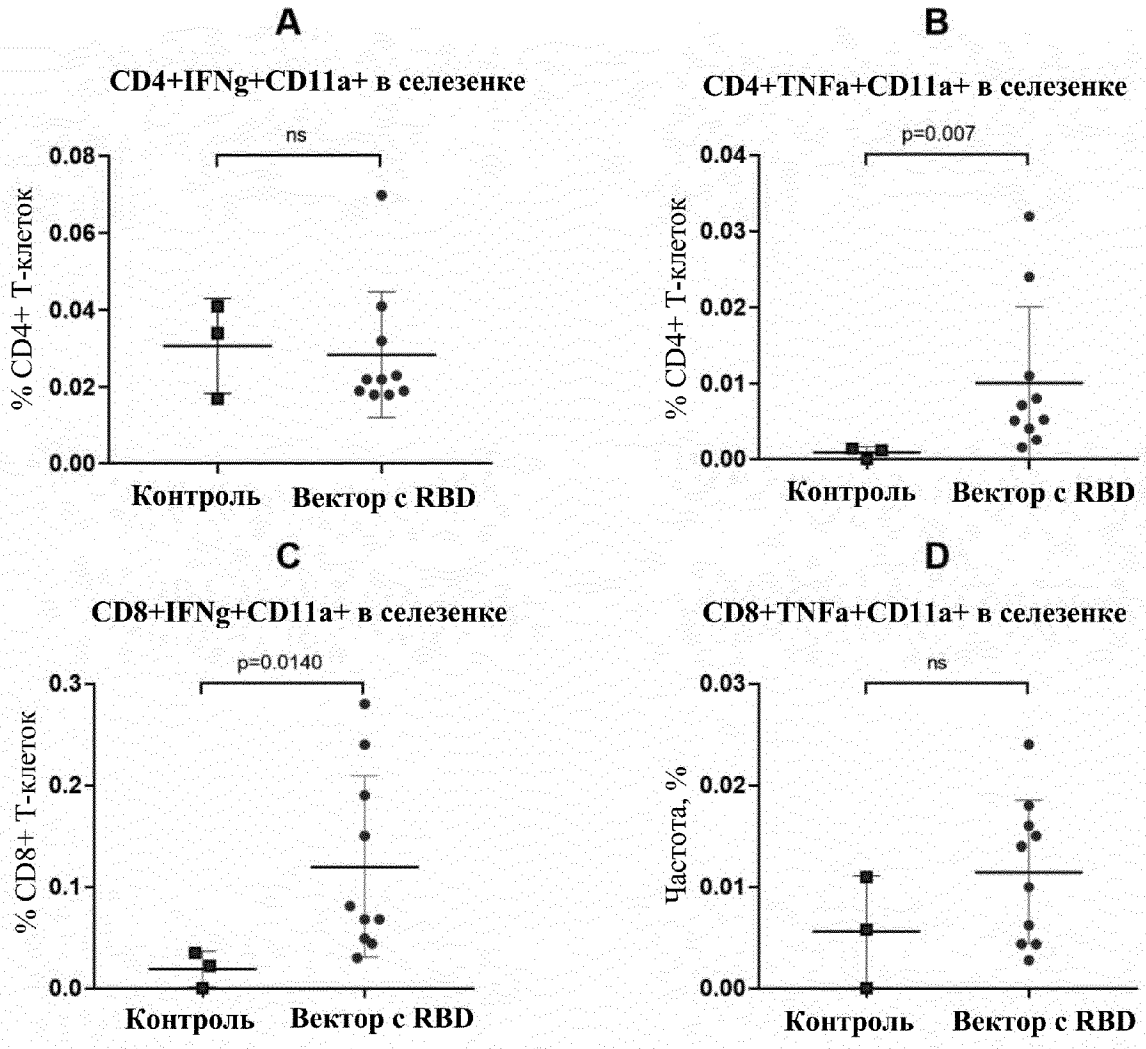
Фиг. 88


A
IFN-g в легком ELISpot
День 10
SFC / 10^6 клеток
2000
1500
1000
500
0
P = 0.007
Контроль
Вектор с RBD
B
IFN-g в легком ELISpot
День 14
SFC / 10^6 клеток
2000
1500
1000
500
0
P = 0.007
Контроль
Вектор с RBD
C
IFN-g в селезенке ELISpot
День 10
SFC / 10^6 клеток
400
300
200
100
0
P = 0.007
Контроль
Вектор с RBD
D
IFN-g в селезенке ELISpot
День 14
SFC / 10^6 клеток
400
300
200
100
0
ns
Контроль
Вектор с RBD

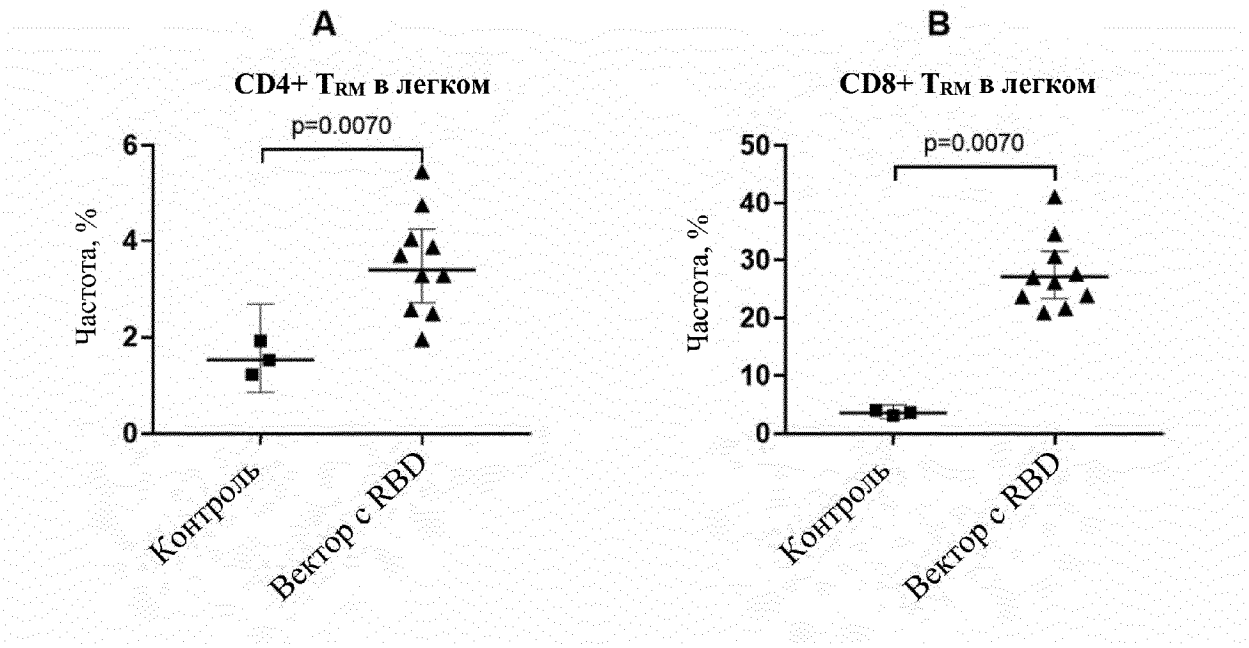
Фиг. 89


A
CD4+IFNg+CD11a+ в легком
% CD4+ Т-клеток
p=0.0175
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Контроль
Вектор с RBD
B
CD4+TNFa+CD11a+ в легком
% CD4+ Т-клеток
p=0.0280
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Контроль
Вектор с RBD
C
CD8+IFNg+CD11a+ в легком
% CD8+ Т-клеток
p=0.007
4
3
2
1
0
Контроль
Вектор с RBD
D
CD8+TNFa+CD11a+ в легком
% CD8+ Т-клеток
p=0.007
5
4
3
2
1
0
Контроль
Вектор с RBD

Фиг. 90

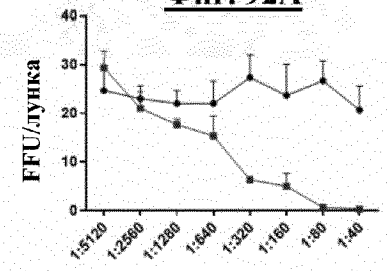

A
CD4+IFNg+CD11a+ в селезенке
ns
% CD4+ Т-клеток
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
Контроль
Вектор с RBD
B
CD4+TNFa+CD11a+ в селезенке
p=0.007
% CD4+ Т-клеток
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Контроль
Вектор с RBD
C
CD8+IFNg+CD11a+ в селезенке
p=0.0140
% CD8+ Т-клеток
0.3
0.2
0.1
0.0
Контроль
Вектор с RBD
D
CD8+TNFa+CD11a+ в селезенке
ns
Частота, %
0.03
0.02
0.01
0.00
Контроль
Вектор с RBD

Фиг. 91

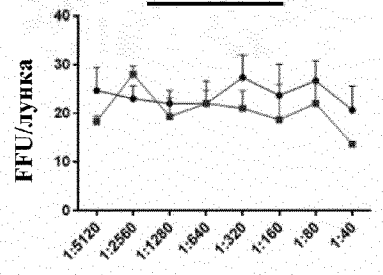

A
CD4+ TRM в легком
p=0.0070
Частота, %
6
4
2
0
Контроль
Вектор с RBD
B
CD8+ TRM в легком
p=0.0070
Частота, %
50
40
30
20
10
0
Контроль
Вектор с RBD

Фиг. 92

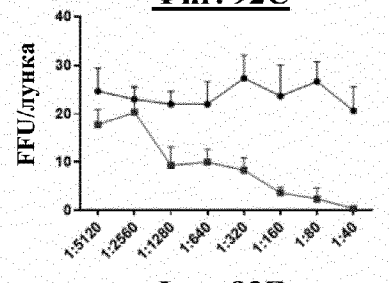
Фиг. 92A



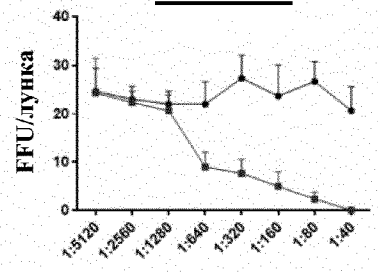
Фиг. 92B



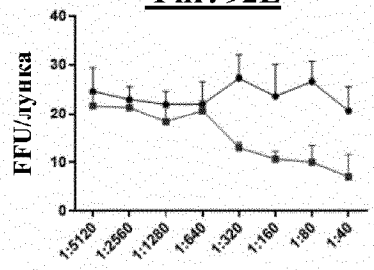
Фиг. 92C



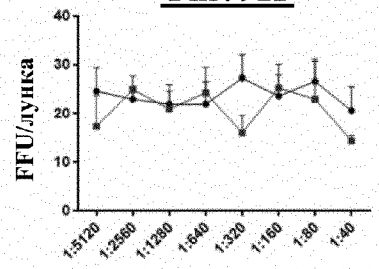
Фиг. 92D



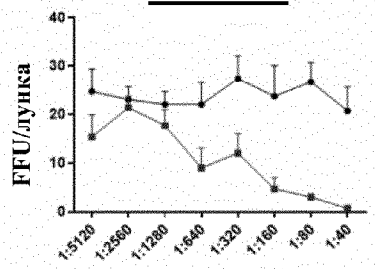
Фиг. 92E



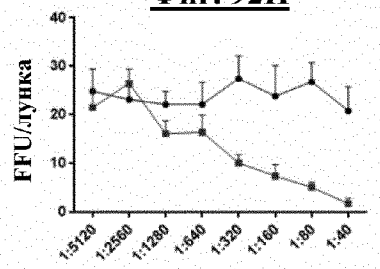
Фиг. 92F



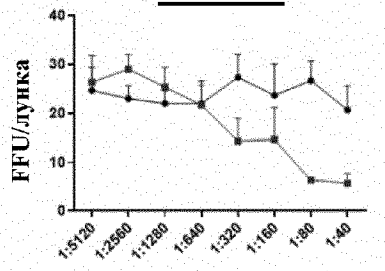
Фиг. 92G



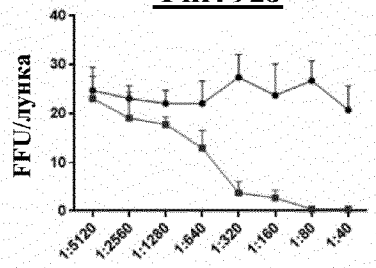
Фиг. 92H



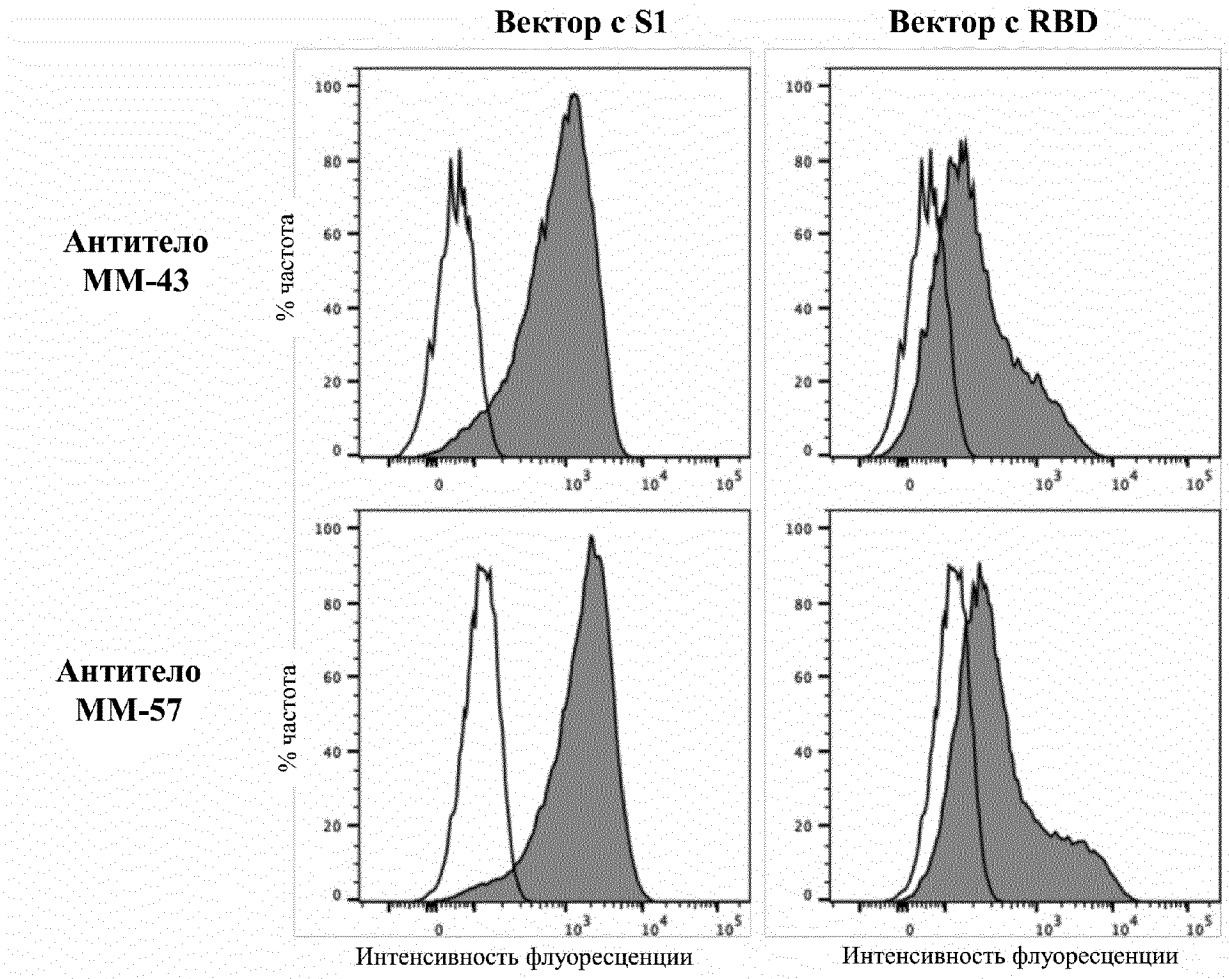
Фиг. 92I



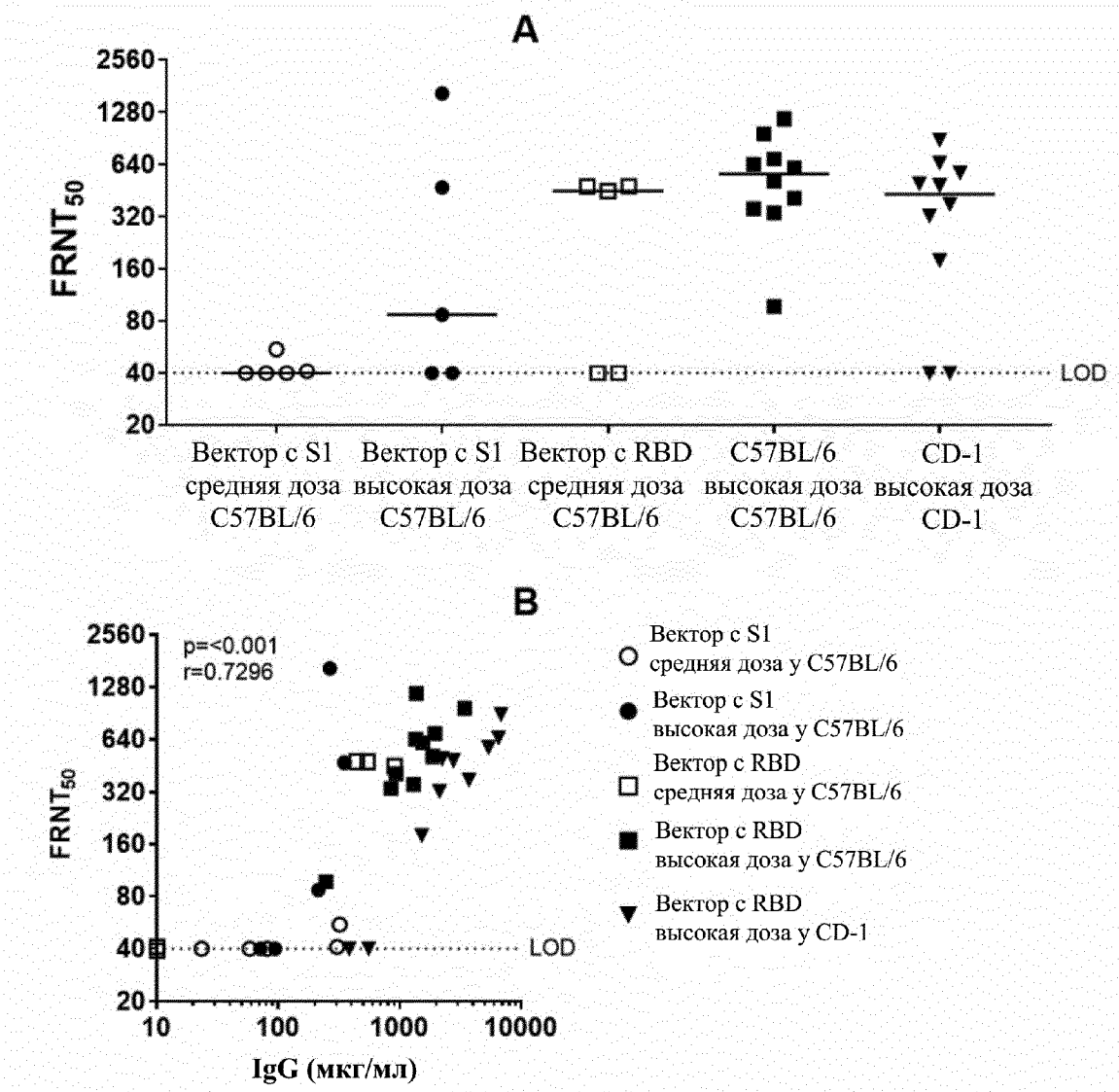
Фиг. 92J



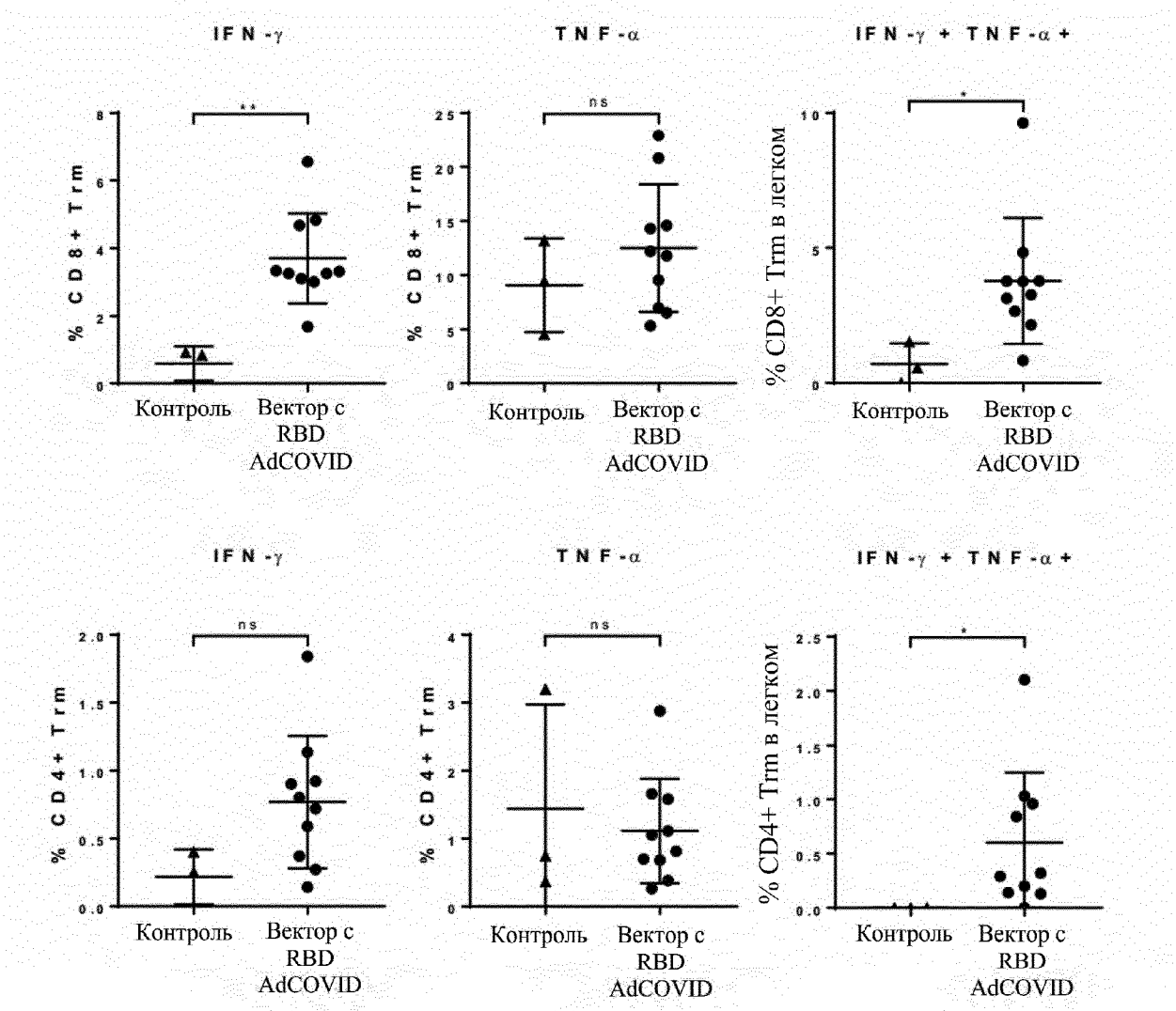
Фиг. 93


Вектор с S1
Вектор с RBD
Антитело MM-43
Антитело MM-57
% частота
% частота
Интенсивность флуоресценции
Интенсивность флуоресценции

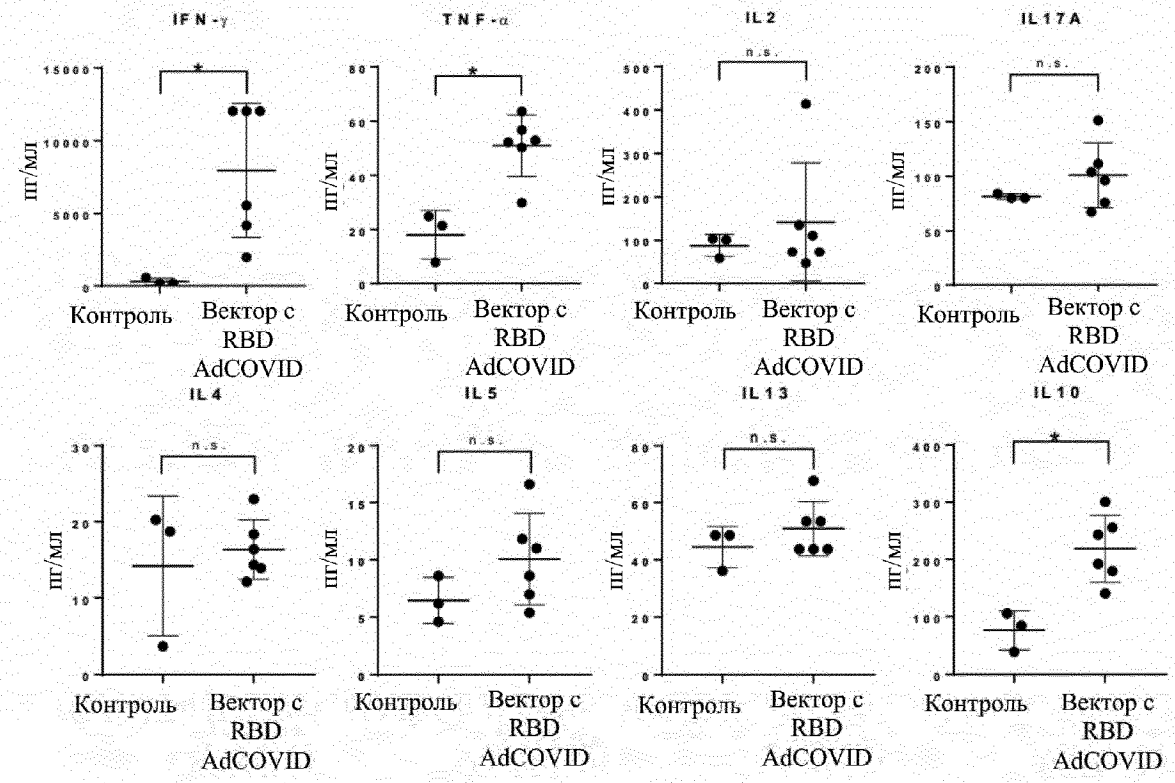
Фиг. 94


A
2560
1280
640
320
160
80
40
20
FRNT50
LOD
Вектор с S1 средняя доза C57BL/6
Вектор с S1 высокая доза C57BL/6
Вектор с RBD средняя доза C57BL/6
C57BL/6 высокая доза C57BL/6
CD-1 высокая доза CD-1
B
p=<0.001
r=0.7296
10
100
1000
10000
IgG (мкг/мл)
Вектор с S1 средняя доза у C57BL/6
Вектор с S1 высокая доза у C57BL/6
Вектор с RBD средняя доза у C57BL/6
Вектор с RBD высокая доза у C57BL/6
Вектор с RBD высокая доза у CD-1

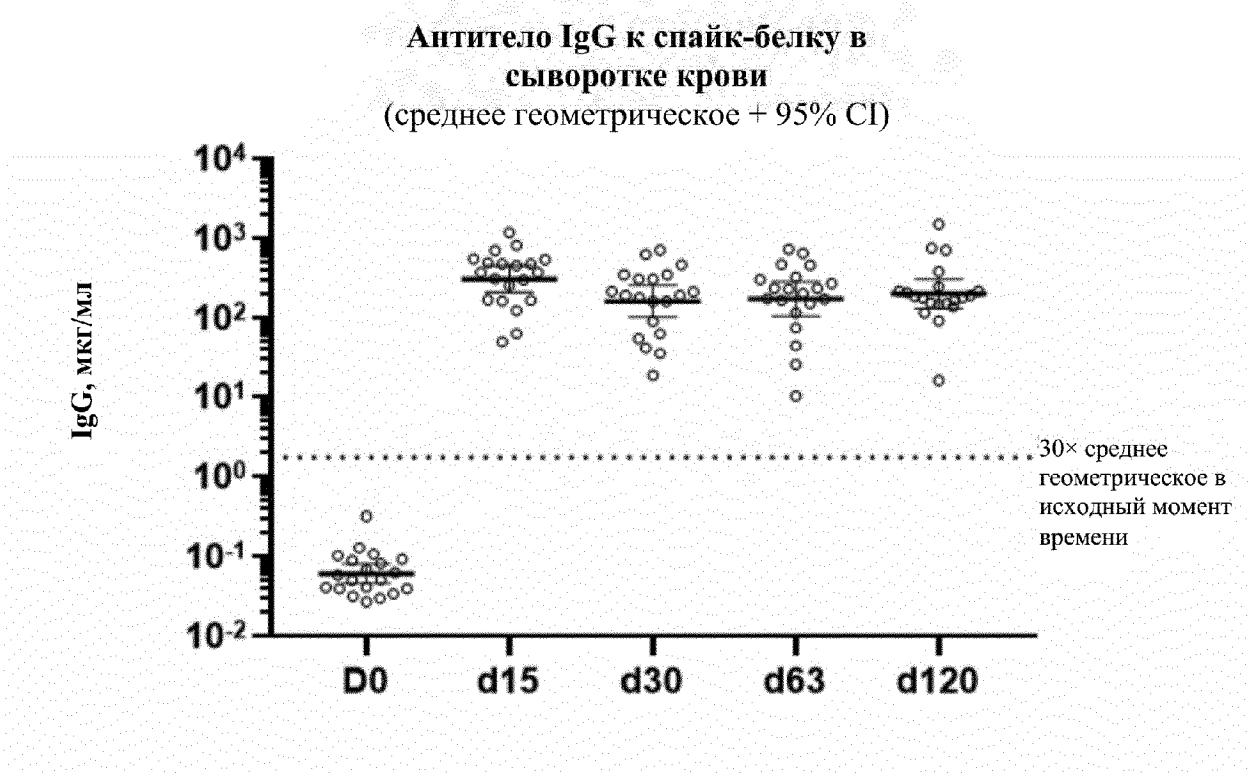
Фиг. 95


IFN-γ
TNF-α
IFN-γ + TNF-α +
% CD8+ Trm
% CD8+ Trm в легком
% CD4+ Trm
% CD4+ Trm в легком
**
ns
*
Контроль
Вектор с RBD AdCOVID

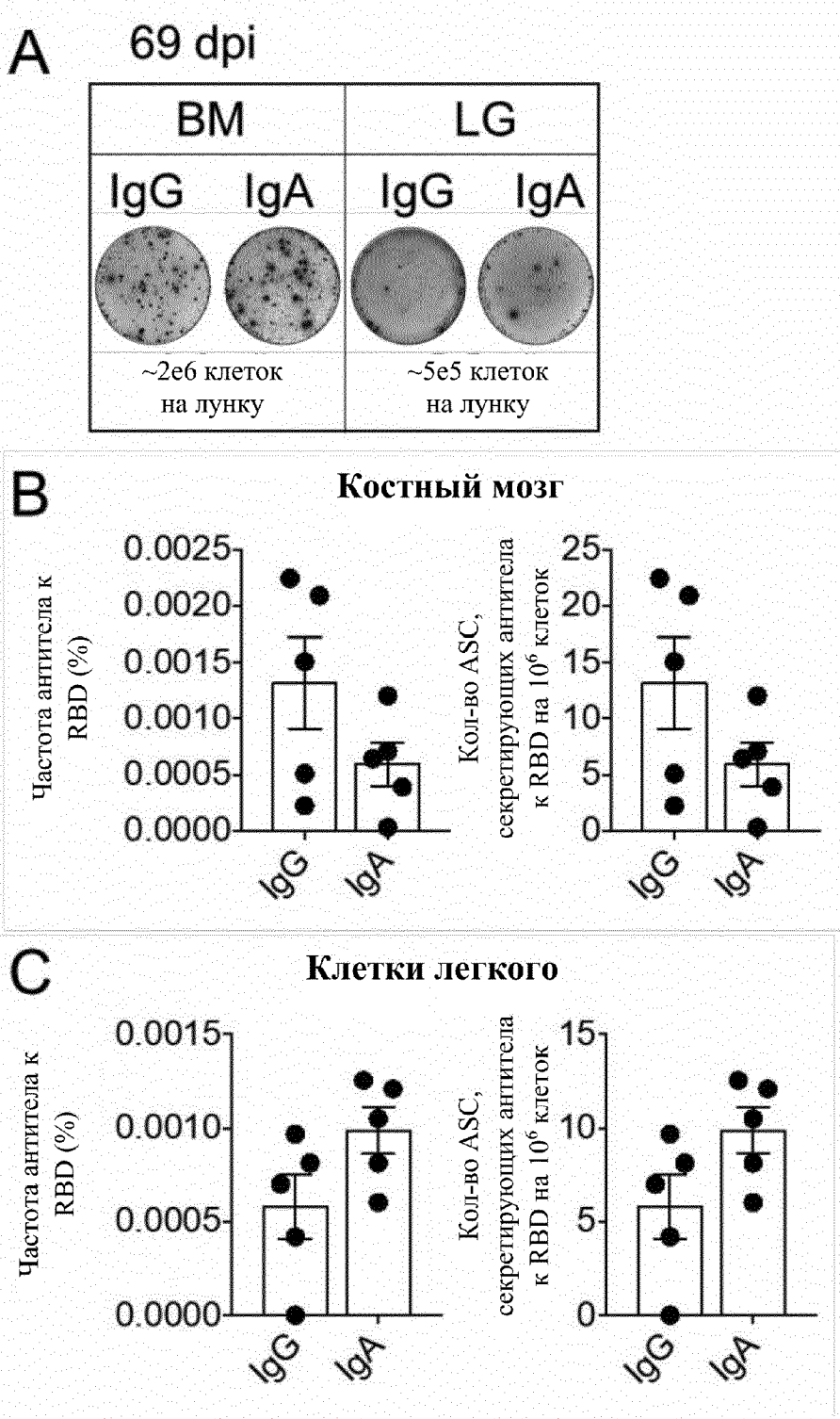
Фиг. 96


IFN-γ
TNF-α
IL2
IL17A
IL4
IL5
IL13
IL10
пг/мл
*
n.s.
Контроль
Вектор с RBD AdCOVID

Фиг. 97

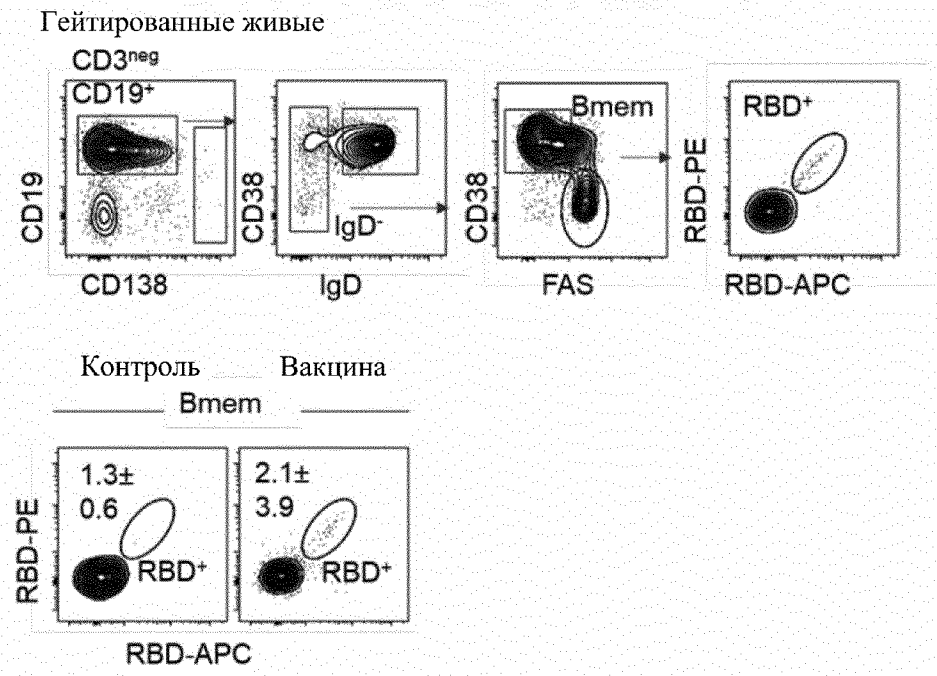

Антитело IgG к спайк-белку в сыворотке крови
(среднее геометрическое + 95% CI)
IgG, мкг/мл
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^-1
10^-2
D0
d15
d30
d63
d120
30× среднее геометрическое в исходный момент времени

Фиг. 98

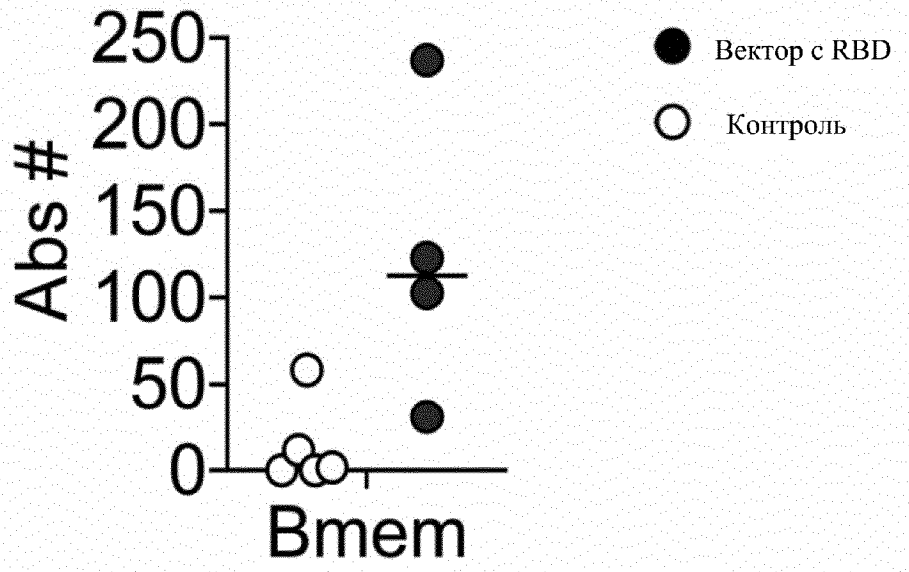

A
69 dpi
BM
LG
IgG
IgA
IgG
IgA
~2e6 клеток
на лунку
~5e5 клеток
на лунку
B
Костный мозг
Частота антитела к RBD (%)
0.0025
0.0020
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
IgG
IgA
Кол-во ASC, секретирующих антитела к RBD на 10^6 клеток
25
20
15
10
5
0
IgG
IgA
C
Клетки легкого
Частота антитела к RBD (%)
0.0015
0.0010
0.0005
0.0000
IgG
IgA
Кол-во ASC, секретирующих антитела к RBD на 10^6 клеток
15
10
5
0
IgG
IgA

Фиг. 99

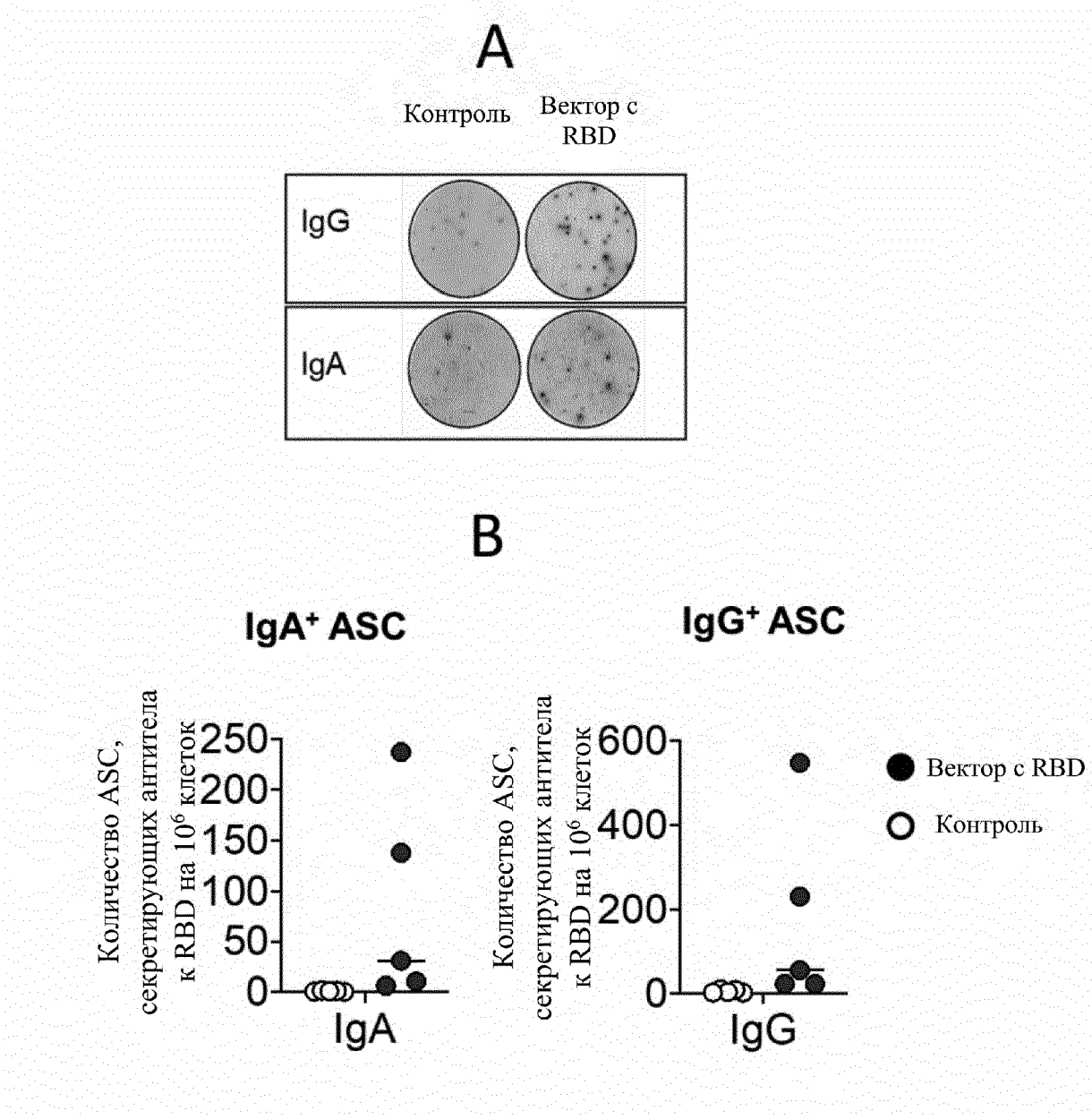
(A) Стратегия гейтирования



(B) Результаты для RBD+ B-клеток памяти



Фиг. 100


A
Контроль
Вектор с RBD
IgG
IgA
B
IgA+ ASC
IgG+ ASC
Количество ASC, секретирующих антитела к RBD на 10^6 клеток
250
200
150
100
50
0
IgA
600
400
200
0
IgG
Вектор с RBD
Контроль