(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292030 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.27

(22) Дата подачи заявки
2021.03.11

(51) Int. Cl. ***A61K 39/12*** (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

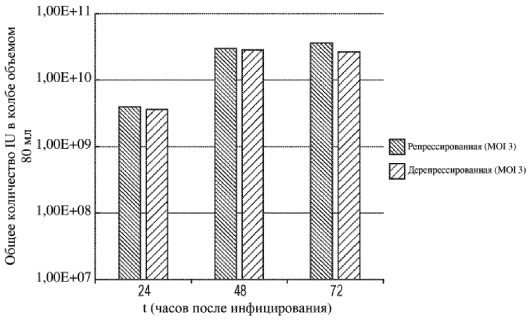
(31) **2003670.3; 2006608.0; 2007062.9; 2009239.1; 2010569.8; 2016922.3; 2017284.7; 2017677.2; 2018410.7; 2018718.3; 2100034.4**
(32) **2020.03.13; 2020.05.05; 2020.05.13; 2020.06.17; 2020.07.09; 2020.10.26; 2020.10.30; 2020.11.09; 2020.11.23; 2020.11.27; 2021.01.04**
(33) **GB**
(86) **PCT/GB2021/050602**
(87) **WO 2021/181100 2021.09.16**

(71) Заявитель:
ОКСФОРД ЮНИВЕРСИТИ ИННОВЕЙШН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Гилберт Сара К., Ламб Тереза, Себастиан Сара (GB)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к композиции, содержащей вирусный вектор, при этом вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, имеющую полинуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок коронавируса SARS-CoV2, отличающейся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса. Настоящее изобретение также относится к вариантам применения такой композиции и способам лечения.



202292030 A1

202292030 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к индуцированию иммунных ответов, предпочтительно защитных иммунных ответов против SARS-CoV2 (nC0V-19).

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Коронавирус 19 (SARS-CoV2; иногда называемый nCoV-19 или COVID-19) представляет собой вирус, вызвавший вспышку коронавирусного заболевания, первые сообщения о котором появились в Ухане, Китай, 31 декабря 2019 года.

Симптомы заболевания включают лихорадку, сухой кашель, мышечную боль и респираторные проблемы, такие как затруднение дыхания/одышка. В более тяжелых случаях инфекция может вызывать пневмонию, тяжелый острый респираторный синдром, почечную недостаточность и даже смерть. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) уровень смертности среди инфицированных индивидуумов составляет вплоть до 3,4%, при этом многие комментаторы согласны с тем, что уровень смертности среди инфицированных индивидуумов составляет прим. 1-2% после корректировки цифр с учетом самых легких случаев, о которых не всегда сообщается (например, если индивидуумы не обращались за лечением или постановкой диагноза).

В соответствии с отчетом Всемирной организации здравоохранения от 7 марта 2020 года число подтвержденных случаев COVID-19 во всем мире превысило 100000 человек.

В настоящее время не имеется каких-либо лицензированных вакцин или способов лечения инфекций, вызванных SARS-CoV2. Текущие стратегии контроля заболевания до сих пор опирались на минимизацию контактов с инфицированными индивидуумами, соблюдение стандартных мер инфекционного контроля для ограничения внутрибольничной передачи инфекции, отслеживание контактов и карантин. Карантинные меры, затронувшие миллионы людей, были приняты во многих странах, в том числе в Китае, являющимся страной происхождения вспышки. Европейские страны, такие как Италия, поместили на карантин до 16 миллионов человек — более четверти населения.

Последствия для здоровья и экономические последствия многочисленных эпидемий были серьезными и продолжают обостряться. В отчете Всемирной организации здравоохранения от 11 марта 2020 г. вспышка охарактеризована как пандемия. Это первая в истории пандемия, вызванная коронавирусом. Отсутствие какого-либо специфического лечения усугубляет экономические последствия и, что более важно, является проблемой,

ведущей к гибели людей. Отсутствие какой-либо вакцины против этого вируса является серьезной проблемой в данной области техники.

Логистические эффекты, обусловленные крупномасштабными изменениями в поведении в ответ на вспышку SARS-CoV2, являются значительными и вызывают вторичные риски для здоровья. Например, 9 марта 2020 года Министерство окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании (DEFRA) было вынуждено ослабить соблюдение ограничений на транспортные средства для доставки, чтобы разрешить дополнительные поставки дефицитных товаров, включая безрецептурные лекарственные препараты, такие как противовоспалительные средства, предметы личной гигиены, такие как туалетная бумага, и основные продукты питания. Это представляет собой дополнительные проблемы, возникающие в результате отсутствия контроля вызванной SARS-CoV2 инфекции/ее передачи.

В WO2018/215766 описана вакцина против коронавируса MERS (ближневосточного респираторного синдрома) (MERS-CoV). Одним из векторов, упомянутых в данном документе, является ChAdOx1. Вакцина содержит полноразмерный шиповидный белок MERS-CoV с лидерной последовательностью tPA человека, добавленной на 5'-конце. В одном варианте осуществления соответствующая часть нуклеотидной последовательности является кодон-оптимизированной для применения у людей. Однако, когда авторы данного изобретения приступили к изготовлению в рамках подготовки к получению согласно GMP (надлежащей производственной практике), они обнаружили, что могут осуществлять его только с использованием клеточной линии с tet-опосредуемой репрессией, что является проблематичным. Авторы данного изобретения столкнулись с многочисленными трудностями при изготовлении этой вакцины в требуемом масштабе.

Настоящее изобретение стремится преодолеть проблему(-ы), ассоциированную(-ые) с предшествующим уровнем техники.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения описывают комбинацию, которая содержит вектор на основе аденовируса обезьян (такой как ChAdOx1), доставляющий антиген SARS-CoV2 (шиповидный белок). Эта комбинация была получена с особым вниманием к нуклеотидным последовательностям, кодирующим антиген, а в частности для решения технических проблем, связанных с генетической стабильностью и перестройками/мутациями последовательностей. Этот подход обеспечил неожиданные технические преимущества, включая эффективное получение с высоким выходом без необходимости Tet-опосредуемой репрессии, а также успешное восстановление интактного вируса с сохранением правильной переносимой последовательностей.

Ключевым преимуществом этой новой комбинации является индуцирование сильных иммунных ответов уже после однократного введения вакцины.

Кроме того, авторы настоящего изобретения описывают необязательное включение лидерной последовательности/последовательности, обеспечивающей секрецию, такой как аминокислотная последовательность тканевого активатора плазминогена (tPA), слитая с N-концом шиповидного белка-антигена SARS-CoV2. Эта тройная комбинация (ChAdOx1 + tPA + шиповидный белок SARS-CoV2) обеспечивает повышенную иммуногенность. Авторы настоящего изобретения предоставляют данные, демонстрирующие, что однократная доза этой комбинированной конструкции обеспечивает значительное усиление соответствующих иммунных ответов – данные, демонстрирующие эти преимущества, представлены в разделе "Примеры" ниже.

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей вирусный вектор, при этом вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, имеющую полинуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок коронавируса SARS-CoV2, отличающейся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса.

Предпочтительно указанный вектор на основе аденовируса представляет собой вектор на основе аденовируса обезьян.

Предпочтительно указанный вектор на основе аденовируса представляет собой ChAdOx 1.

Предпочтительно указанный шиповидный белок содержит рецептор-связывающие домены (RBD).

Предпочтительно указанный шиповидный белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

Предпочтительно указанный шиповидный белок представлен в виде продукта слияния с последовательностью тканевого активатора плазминогена (tPA) в порядке N-конец - tPA - шиповидный белок - C-конец.

Предпочтительно указанный tPA имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

Предпочтительно указанный шиповидный белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно указанная полинуклеотидная последовательность предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно под SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно указанная последовательность вирусного вектора является такой, как представленная в ECACC под номером доступа 12052403.

Предпочтительно введение однократной дозы описанной выше композиции субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунитет у указанного субъекта.

Предпочтительно введение двух доз описанной выше композиции субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунитет у указанного субъекта.

Предпочтительно введение первой дозы описанной выше композиции субъекту-млекопитающему с последующим введением второй дозы указанной композиции указанному субъекту индуцирует защитный иммунитет у указанного субъекта.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции для индуцирования или для применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2.

Предпочтительно указанный иммунный ответ представляет собой иммунный ответ у субъекта-млекопитающего.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для индуцирования или применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, где указанному субъекту вводят однократную дозу указанной композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для индуцирования или применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, где указанному субъекту вводят две дозы указанной композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для индуцирования или применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, где указанному субъекту вводят первую дозу указанной композиции и в последствии указанному субъекту вводят вторую дозу указанной композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для индуцирования или для применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, где указанную композицию вводят один раз.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для индуцирования или для применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, где указанную композицию вводят два раза.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для индуцирования или применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, где указанному субъекту вводят первую дозу указанной композиции и в последствии указанному субъекту вводят вторую дозу указанной композиции.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 12 месяцев.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 60 месяцев.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2.

Предпочтительно предупреждение инфекции, вызываемой SARS-CoV2, представляет собой предупреждение инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, где вводят однократную дозу указанной композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, где указанному субъекту вводят две дозы указанной композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, где указанному субъекту вводят первую дозу указанной композиции и в последствии указанному субъекту вводят вторую дозу указанной композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, где указанную композицию вводят один раз.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, где указанную композицию вводят два раза.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции,

вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, где указанному субъекту вводят первую дозу указанной композиции и в последствии указанному субъекту вводят вторую дозу указанной композиции.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 12 месяцев.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 60 месяцев.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции в медицине.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для применения в медицине. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанной выше композиции для применения в качестве лекарственного препарата.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции в получении лекарственного препарата для предупреждения или для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2.

Предпочтительно предупреждение инфекции, вызываемой SARS-CoV2, представляет собой предупреждение инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает введение указанному субъекту описанной выше композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает введение указанному субъекту дозы описанной выше композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанному выше способу, где указанному субъекту вводят однократную дозу указанной композиции.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанному выше способу, где указанному субъекту вводят две дозы указанной композиции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к описанному выше способу, где указанному субъекту вводят первую дозу указанной композиции и в последствии указанному субъекту вводят вторую дозу указанной композиции.

Предпочтительно указанную композицию вводят два раза.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 12 месяцев.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 60 месяцев.

Предпочтительно указанную композицию вводят посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из интраназального, аэрозольного, внутрикожного и внутримышечного.

Предпочтительно указанное введение является интраназальным или внутримышечным.

Предпочтительно указанное введение является внутримышечным.

Предпочтительно указанный шиповидный белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

Одним примером последовательности шиповидного белка CoV, применимой в настоящем изобретении, является шиповидный белок vCoV-19 из изолята коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома Wuhan-Hu-1, т. е. шиповидный белок, кодируемый вирусным геномом с номером доступа в GenBank MN908947.

Более предпочтительно указанный шиповидный белок имеет аминокислотную последовательность, которая представлена в геноме SARS-CoV2 (или закодирована в нем) с номером доступа в GenBank MG772933.1 (изолят SARS-подобного коронавируса летучей мыши bat-SL-CoVZC45).

Более предпочтительно SARS-CoV2 может представлять собой изолят bat-SL-CoVZC45.

Наиболее предпочтительно указанный шиповидный белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 – аминокислотная последовательность только шиповидного белка SARS-CoV2 (без слияния с tPA)

FVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS
NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIV
NNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMD
LEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSET
KCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISN
CVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIA
DYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGST
PCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN
KCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS
VITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEH
VNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPT
NFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDK
NTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQY

GDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIP
FAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQN
AQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA
EIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKN
FTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVN
NTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLN
ESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCC
KFDEDDSEPVLKGVKLHYT

SEQ ID NO: 11: нуклеотидная последовательность шиповидного белка из генома nCoV 19

(под номером доступа в GenBank MG772933.1)

ATGTTTGTTTTTCTTGTTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACA
ACCAGAACTCAATTACCCCCTGCATACACTAATTCTTTCACACGTGGTGTTTATTACC
CTGACAAAGTTTTCAGATCCTCAGTTTTACATTCAACTCAGGACTTGTTCTTACCTTT
CTTTTCCAATGTTACTTGGTTCCATGCTATACATGTCTCTGGGACCAATGGTACTAAG
AGGTTTGATAACCCTGTCCTACCATTTAATGATGGTGTTTATTTTGCTTCCACTGAGA
AGTCTAACATAATAAGAGGCTGGATTTTTGGTACTACTTTAGATTCGAAGACCCAGT
CCCTACTTATTGTTAATAACGCTACTAATGTTGTTATTAAAGTCTGTGAATTTCAATT
TTGTAATGATCCATTTTTGGGTGTTTATTACCACAAAAACAACAAAAGTTGGATGGA
AAGTGAGTTCAGAGTTTATTCTAGTGCGAATAATTGCACTTTTGAATATGTCTCTCA
GCCTTTTCTTATGGACCTTGAAGGAAAACAGGGTAATTTCAAAAATCTTAGGGAATT
TGTGTTTAAGAATATTGATGGTTATTTTAAAATATATTCTAAGCACACGCCTATTAAT
TTAGTGCGTGATCTCCCTCAGGGTTTTTCGGCTTTAGAACCATTGGTAGATTTGCCAA
TAGGTATTAACATCACTAGGTTTCAAACTTTACTTGCTTTACATAGAAGTTATTTGAC
TCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTTGGACAGCTGGTGCTGCAGCTTATTATGTGGGTTAT
CTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAAAATATAATGAAAATGGAACCATTACAGATGCT
GTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCTCAGAAACAAAGTGTACGTTGAAATCCTTCACT
GTAGAAAAAGGAATCTATCAAACTTCTAACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCTATT
GTTAGATTTCCTAATATTACAAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCA
GATTTGCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATT
ATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCATTTTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCC
TACTAAATTAAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAGATTCATTTGTAATTAGA
GGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACTGGAAAGATTGCTGATTATAA
TTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAATTCTAACAATCTT
GATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAAT

CTCAAACCTTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCT
TGTAATGGTGTTGAAGGTTTTAATTGTTACTTTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAAC
CCACTAATGGTGTTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACTTCT
ACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTAAAAACAA
ATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAA
CAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGC
TGTCCGTGATCCACAGACACTTGAGATTCTTGACATTACACCATGTTCTTTTGGTGGT
GTCAGTGTTATAACACCAGGAACAAATACTTCTAACCAGGTTGCTGTTCTTTATCAG
GATGTTAACTGCACAGAAGTCCCTGTTGCTATTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTT
GGCGTGTTTATTCTACAGGTTCTAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGG
GGCTGAACATGTCAACAACTCATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATG
CGCTAGTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTAGTCA
ATCCATCATTGCCTACACTATGTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGTTGCTTACTCTAAT
AACTCTATTGCCATACCCACAAATTTTACTATTAGTGTTACCACAGAAATTCTACCA
GTGTCTATGACCAAGACATCAGTAGATTGTACAATGTACATTTGTGGTGATTCAACT
GAATGCAGCAATCTTTTGTTGCAATATGGCAGTTTTTGTACACAATTAAACCGTGCT
TTAACTGGAATAGCTGTTGAACAAGACAAAAACACCCAAGAAGTTTTTGCACAAGT
CAAACAAATTTACAAAACACCACCAATTAAAGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCACA
AATATTACCAGATCCATCAAAACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAAGATCTACTTTT
CAACAAAGTGACACTTGCAGATGCTGGCTTCATCAAACAATATGGTGATTGCCTTGG
TGATATTGCTGCTAGAGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTTAACGGCCTTACTGTTTTG
CCACCTTTGCTCACAGATGAAATGATTGCTCAATACACTTCTGCACTGTTAGCGGGT
ACAATCACTTCTGGTTGGACCTTTGGTGCAGGTGCTGCATTACAAATACCATTTGCT
ATGCAAATGGCTTATAGGTTTAATGGTATTGGAGTTACACAGAATGTTCTCTATGAG
AACCAAAAATTGATTGCCAACCAATTTAATAGTGCTATTGGCAAAATTCAAGACTCA
CTTTCTTCCACAGCAAGTGCACTTGGAAAACTTCAAGATGTGGTCAACCAAAATGCA
CAAGCTTTAAACACGCTTGTTAAACAACTTAGCTCCAATTTTGGTGCAATTTCAAGT
GTTTTAAATGATATCCTTTCACGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTGAT
AGGTTGATCACAGGCAGACTTCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAATTAATT
AGAGCTGCAGAAATCAGAGCTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAAATGTCAGAGTGT
GTACTTGGACAATCAAAAAGAGTTGATTTTTGTGGAAAGGGCTATCATCTTATGTCC
TTCCCTCAGTCAGCACCTCATGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCAC
AAGAAAAGAACTTCACAACTGCTCCTGCCATTTGTCATGATGGAAAAGCACACTTTC
CTCGTGAAGGTGTCTTTGTTTCAAATGGCACACACTGGTTTGTAACACAAAGGAATT
TTTATGAACCACAAATCATTACTACAGACAACACATTTGTGTCTGGTAACTGTGATG

TTGTAATAGGAATTGTCAACAACACAGTTTATGATCCTTTGCAACCTGAATTAGACT
CATTCAAGGAGGAGTTAGATAAATATTTTAAGAATCATACATCACCAGATGTTGATT
TAGGTGACATCTCTGGCATTAATGCTTCAGTTGTAAACATTCAAAAAGAAATTGACC
GCCTCAATGAGGTTGCCAAGAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAACTTG
GAAAGTATGAGCAGTATATAAAATGGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGCTG
GCTTGATTGCCATAGTAATGGTGACAATTATGCTTTGCTGTATGACCAGTTGCTGTA
GTTGTCTCAAGGGCTGTTGTTCTTGTGGATCCTGCTGCAAATTTGATGAAGACGACT
CTGAGCCAGTGCTCAAAGGAGTCAAATTACATTACACATAA

Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая антиген шиповидного белка и/или кодирующая продукт слияния tPA с шиповидным белком-антигеном, является кодон-оптимизированной для применения у людей.

Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая антиген шиповидного белка и/или кодирующая продукт слияния tPA с шиповидным белком-антигеном, подвергнута введению замен для устранения серий повторяющихся нуклеотидов, таких как 5 или более последовательных появлений одного и того же нуклеотида.

Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая антиген шиповидного белка и/или кодирующая продукт слияния tPA с шиповидным белком-антигеном, является кодон-оптимизированной для применения у людей и подвергнута введению замен для устранения серий повторяющихся нуклеотидов, таких как 5 или более последовательных появлений одного и того же нуклеотида.

Предпочтительно указанная полинуклеотидная последовательность предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 3.

В данном случае представлена нуклеотидная последовательность, пересмотренная автором настоящего изобретения (т. е. после оптимизации кодонов для применения у людей, в ходе которой были введены серии одинаковых оснований, и после того, как эти серии одинаковых оснований были пересмотрены для сохранения той же кодирующей последовательности, но с удалением повторов), без кодируемого tPA.

SEQ ID NO: 3 – без лидерной последовательности tPA

TTCGTGTTCCTGGTGCTGCTGCCACTGGTGTCTAGCCAGTGTGTGAACCTGACCAC
CAGGACACAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTCACCAGAGGCGTGTACTACC
CAGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTT
TCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCA
AGAGATTCGACAACCCAGTGCTGCCCTTCAACGACGGAGTGTACTTTGCCAGCACCG
AGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACC
CAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTT

CCAGTTCTGCAACGACCCATTCCTGGGCGTCTACTACCACAAGAACAACAAGAGCT
GGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTCGAGTAC
GTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCT
GCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACA
CACCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCACTGG
TGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACA
GAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCTCTGGATGGACAGCTGGCGCCGCTGCC
TACTATGTGGGATACCTGCAGCCTCGGACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGC
ACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACC
CTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCA
GCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCGAATATCACCAATCTGTGCCCATTCGGCGA
GGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAG
CAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAA
GTGCTACGGCGTGTCACCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGC
CGACAGCTTCGTGATCCGTGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCACCTGGACAGACAG
GCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTG
CCTGGAACAGCAACAACCTGGATAGCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTAC
CGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATC
TATCAGGCCGGCAGCACACCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCA
CTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTACCAGCCTTACAGAGTG
GTGGTGCTGAGCTTCGAGCTGCTGCATGCTCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAA
AGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGG
CACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTCGGCC
GGGATATCGCCGATACCACAGATGCCGTCAGAGATCCTCAGACACTGGAAATCCTG
GACATCACACCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACGCCTGGCACCAACACC
AGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGC
CATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGT
GTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACG
AGTGCGACATCCCTATCGGCGCTGGCATCTGCGCCTCTTACCAGACACAGACAAACA
GCCCTAGACGGGCCAGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTC
TGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCGACCAACT
TCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTG
GACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAG
TACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACA
GGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACGCCTC

CTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGC
CCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGAC
GCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTG
ATTTGCGCCCAGAAGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAG
ATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGAC
ATTTGGAGCTGGCGCTGCCCTGCAGATCCCATTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTT
CAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCA
ACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGC
GCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCT
GGTCAAGCAGCTGTCTAGCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCT
GAGCAGACTGGACAAGGTGGAAGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGA
AGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGAT
TAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAG
CAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGC
GCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATACGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTT
CACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCG
TGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACCCAGCGGAACTTCTACGAGCCTC
AGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCA
TTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAG
GAACTGGATAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCTGACGTGGACCTGGGCGATAT
CAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACG
AGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGCAAGTAC
GAGCAGTACATCAAGTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATT
GCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTG
AAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCTCCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCC
GTGCTGAAGGGCGTGAAACTGCACTACACCTGA

Наиболее предпочтительно указанная полинуклеотидная последовательность предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 4. В данном случае представлена предпочтительная нуклеотидная последовательность, пересмотренная автором настоящего изобретения (т. е. после оптимизации кодонов для применения у людей, в ходе которой были введены серии одинаковых оснований, и после того, как эти серии одинаковых оснований были пересмотрены для сохранения той же кодирующей последовательности, но с удалением повторов), с кодируемым tPA. Это является крайне предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения.

SEQ ID NO: 4 – с подчеркнутым участком, кодирующим лидерную последовательность tPA

ATGGACGCCATGAAGCGAGGCCTGTGCTGTGTTCTGCTTCTGTGTGGCGCCGTGT
TTGTGTCCGCCAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGATTCGTGTTCCTGGTGC
TGCTGCCACTGGTGTCTAGCCAGTGTGTGAACCTGACCACCAGGACACAGCTGCCTC
CAGCCTACACCAACAGCTTCACCAGAGGCGTGTACTACCCAGACAAGGTGTTCAGA
TCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCT
GGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCA
GTGCTGCCCTTCAACGACGGAGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATC
AGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGT
GAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACC
CATTCCTGGGCGTCTACTACCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTC
CGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTG
ATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAA
GAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACACCTATCAACCTCGTGC
GGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCACTGGTGGATCTGCCCATCGGCA
TCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTG
GCGATAGCAGCTCTGGATGGACAGCTGGCGCCGCTGCCTACTATGTGGGATACCTGC
AGCCTCGGACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTG
GATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTG
GAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGT
GCGGTTCCCGAATATCACCAATCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAG
ATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTA
CTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCACC
TACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCG
TGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCACCTGGACAGACAGGCAAGATCGCCGACTACA
ACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAAC
CTGGATAGCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCC
AATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCAC
ACCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTT
TCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTACCAGCCTTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCG
AGCTGCTGCATGCTCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGA
AGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACA
GAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTCGGCCGGGATATCGCCGATAC
CACAGATGCCGTCAGAGATCCTCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACACCTTGCA

GCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACGCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCA
GTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCA
GCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAG
CCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCT
ATCGGCGCTGGCATCTGCGCCTCTTACCAGACACAGACAAACAGCCCTAGACGGGC
CAGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGA
ACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCGACCAACTTCACCATCAGCG
TGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGT
ACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCT
GCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACC
CAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACGCCTCCTATCAAGGACTT
CGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGA
GCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCA
AGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGA
AGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGT
ACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGC
GCTGCCCTGCAGATCCCATTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGA
GTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAG
CGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGC
TGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTG
TCTAGCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGAC
AAGGTGGAAGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCT
GCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCA
ATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGAC
TTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCGCCTCACGGCGTG
GTGTTTCTGCACGTGACATACGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCA
GCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAAC
GGCACCCATTGGTTCGTGACCCAGCGGAACTTCTACGAGCCTCAGATCATCACCACC
GACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACC
GTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGATAAGTA
CTTTAAGAACCACACAAGCCCTGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATG
CCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAAT
CTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGCAAGTACGAGCAGTACATCAA
GTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGT
CACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAG

CTGTGGCTCCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGT
GAAACTGCACTACACCTGA

Предпочтительно указанный шиповидный белок имеет аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 10 - аминокислотная последовательность продукта слияния tPA с шиповидным белком (tPA подчеркнут)

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPP
AYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPF
NDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYS
KHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYY
VGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESI
VRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK
LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
GGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVG
YQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ
QFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAI
HADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRR
ARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGD
STECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQIL
PDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTD
EMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIAN
QFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLD
KVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCG
KGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHW
FVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPD
VDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAG
LIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

Предпочтительно схема первичной вакцинации предусматривает одну дозу. В некоторых вариантах осуществления может потребоваться повторное введение, осуществляемое по прошествии некоторого времени. Интервалы между первой и второй дозами раскрыты в примерах. В некоторых вариантах осуществления может потребоваться повторное введение, осуществляемое по прошествии некоторого времени, не менее чем через 6 месяцев после первой иммунизации. Предпочтительно может потребоваться повторное введение, осуществляемое по прошествии некоторого времени, как например через приблизительно 12 месяцев после первой иммунизации.

Предпочтительно может потребоваться повторное введение, осуществляемое по прошествии некоторого времени, как например через приблизительно 12-60 месяцев после первой иммунизации. В одном варианте предпочтительно второе или дополнительное введение осуществляют через приблизительно 12 месяцев после первой иммунизации. В одном варианте предпочтительно второе или дополнительное введение осуществляют через приблизительно 60 месяцев после первой иммунизации.

В одном варианте предпочтительно второе или дополнительное введение осуществляют через более чем 60 месяцев после первой иммунизации.

В одном варианте осуществления предпочтительно еще более оптимальным является еще более позднее второе или дополнительное введение.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции в медицине.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции в получении лекарственного препарата для предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV2.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции в осуществлении иммунизации субъекта против SARS-CoV2. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению описанной выше композиции в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2.

Способ индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает введение указанному субъекту описанной выше композиции.

Предпочтительно указанному субъекту вводят однократную дозу указанной композиции.

Предпочтительно указанную композицию вводят один раз.

Предпочтительно указанную композицию можно вводить один раз в 6 месяцев.

Более предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 12 месяцев.

Более предпочтительно указанную композицию вводят один раз в 60 месяцев.

Предпочтительно указанную композицию вводят посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из подкожного, интраназального, аэрозольного, небулайзерного, внутрикожного и внутримышечного.

Наиболее предпочтительно указанное введение является внутримышечным или интраназальным введением.

Наиболее предпочтительно указанное введение является внутримышечным введением.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вирусному вектору на основе аденовируса, содержащему нуклеиновую кислоту, имеющую полинуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок из SARS-CoV2. Предпочтительно вирусным вектором на основе аденовируса является ChAdOx 1.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору ChAdOx, содержащему полинуклеотид, кодирующий гликопротеин S из вируса SARS-CoV2. Предпочтительно указанный вирусный вектор на основе аденовируса имеет последовательность и/или конструкцию, как описано в одном или нескольких примерах.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу усиления иммунного ответа путем введения вирусного вектора на основе аденовируса, как описано выше.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к описанному выше вирусному вектору на основе аденовируса для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к описанному выше вирусному вектору на основе аденовируса для применения в усилении иммунного ответа против SARS-CoV2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Под коронавирусом 19 (SARS-CoV2; nCoV-19; иногда называемый COVID-19) подразумевается вирус, вызвавший вспышку коронавирусного заболевания у людей, первые сообщения о котором появились в Ухане, Китай, 31 декабря 2019 года. В настоящее время вирус, как известно, надлежащим образом определен как SARS-CoV2. Заболеванием, которое он вызывает, является COVID-19. Более конкретно, под SARS-CoV2 подразумевается вирус, имеющий геном, содержащий нуклеотидную последовательность под номером доступа MN908947 или MG772933.1, наиболее предпочтительно MG772933.1.

Предпочтительно антитела, индуцированные, как описано в настоящем документе, представляют собой нейтрализующие антитела, т. е. антитела, способные нейтрализовать вирусные частицы SARS-CoV2.

Авторы настоящего изобретения создали вакцину против SARS-CoV2. Доклинические данные показывают превосходные результаты, применительно к которым авторы настоящего изобретения ссылаются на раздел "Примеры" ниже.

Как только была опубликована последовательность SARS-CoV2, было начато получение как вакцины исследовательского класса, подходящей для доклинических исследований, так и исходного посевного материала для вакцины, подходящего для ее

изготовления согласно GMP. Дизайн вакцины предусматривает полный шиповидный белок SARS-CoV2, экспрессируемый под управлением сильного промотора млекопитающих, который включает последовательности Tet-репрессора, обеспечивающие репрессию экспрессии антигена во время изготовления вакцины, улучшая значения выхода для вакцины. Получение вакцины для доклинических исследований прошло успешно, и сразу же были проведены эксперименты по иммунизации мышей (см. раздел примеров).

Авторами настоящего изобретения излагается информация относительно быстрого изготовления и клинической разработки ChAdOx1 SARS-CoV2.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит ChAdOx1 :: шиповидный белок SARS-CoV2, т. е. ChAdOx1, содержащий вставку нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок SARS-CoV2.

Предпочтительно используется полноразмерный шиповидный белок.

Предпочтительно на 5'-конце добавляют лидерную последовательность tPA человека.

Предпочтительно нуклеотидная последовательность является кодон-оптимизированной для соответствия частоте использования кодонов, свойственной человеку.

Кроме того, автор настоящего изобретения провел дополнительное изучение последовательности и разработал концепцию, предусматривающую удаление из последовательности серий повторяющихся оснований. Более детально, автором настоящего изобретения сначала была проведена оптимизация кодонов кодирующей последовательности антигена для соответствия частоте использования кодонов, свойственной человеку. Более предпочтительно автором настоящего изобретения была проведена оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности, кодирующей продукт слияния tPA с шиповидным белком-антигеном SARS-CoV2 для соответствия частоте использования кодонов, свойственной человеку. Однако, как объяснено выше, на основании умозаключений при рассмотрении последовательности автор настоящего изобретения заметил, что имелось несколько отрезков, на которых процедура оптимизации кодонов для применения у человека приводила к сериям идентичных нуклеотидов. Например, было замечено наличие серий из 5 последовательных оснований "C" (цитозиновых оснований). Автор настоящего изобретения выдвинул идею о том, что эти повторяющиеся последовательности могли быть причиной возникновения проблем при экспрессии, приводящих к проблемам в отношении эффективности вакцины, и/или явлениям "проскальзывания" полимеразы, приводящим к проблемам при получении вакцин на основе вирусного вектора ввиду нестабильности нуклеиновых кислот

(например, мутаций, перегруппировок, таких как усечения и т. д.). Чтобы решить эти технические проблемы, автор изобретения пришел к идее дополнительного мутирования уже мутированной кодон-оптимизированной последовательности. Таким образом, автор настоящего изобретения продолжил конструирование и выполнение дополнительных замен в нуклеотидной последовательности, тщательным образом сохраняя кодируемые аминокислоты с использованием универсального генетического кода, изменяя при этом нуклеотидные основания и выбирая альтернативные кодоны для удаления последовательностей повторов, склонных к проскальзыванию, сохраняя при этом способность кодирующей последовательности точно кодировать требуемый антиген. Как видно из данных, представленных в разделе примеров, подход авторов настоящего изобретения был очень успешным и обеспечил техническое преимущество, облегчив получение вакцины на основе вирусного вектора с получением хороших значений выхода вируса. Полученный таким образом вирус также продемонстрировал превосходную иммуногенность и другие свойства, обсуждаемые в данном документе.

Неожиданным для авторов настоящего изобретения стало следующее:

- Значения выхода для вакцины при использовании композиции на основе вирусного вектора для SARS-CoV2, по-видимому, одинаковы с tet-опосредуемой репрессией и без нее. Авторы настоящего изобретения нашли это удивительным. Ввиду проблем и недостатков, возникающих при подготовке к изготовлению согласно GMP вакцины против MERS-CoV, описанной в WO2018/215766 (обсуждалось выше в разделе "Уровень техники"), до создания настоящего изобретения считалось, что для всех вирусных гликопротеинов будет возникать необходимость Tet-опосредуемой репрессии. Считалось, что эти вирусные гликопротеины являются токсичными, ввиду чего и возникла необходимость Tet-опосредуемой репрессии во время изготовления. Настоящее изобретение демонстрирует неожиданное преимущество, состоящее в том, что Tet-опосредуемая репрессия не требуется для изготовления композиции на основе вирусного вектора для SARS-CoV2.

- Восстановление вируса из плазмиды оказалось исключительно быстрым и легким. Препараты на основе вируса были получены в рекордные сроки. Некоторые из этих препаратов даже были получены в рекордные сроки, несмотря на то, что в процедуру были включены теперь уже не являющиеся необходимыми стадии tet-опосредуемой репрессии. Таким образом, скорость и простота восстановления вируса из плазмиды является дополнительным техническим преимуществом, обеспечиваемым настоящим изобретением.

- Иммуногенность у мышей через 10 дней является очень сильной. Авторы настоящего изобретения ссылаются на раздел примеров ниже.

Более детально, следует отметить, что авторы настоящего изобретения исследовали пересмотренную версию вирусного вектора, кодирующего шиповидный белок MERS (т. е. описанного в WO2018/215766), с удаленными сериями повторяющихся оснований. После огромного объема проделанных этими опытными исследователями работ, которые находятся в авангарде в данной области исследований, все еще не имелось возможности получить исходный материал для вирусного вектора, кодирующего шиповидный белок MERS, который являлся бы генетически корректным. В лучшем случае, когда авторы настоящего изобретения обнаруживали, что шиповидный белок-антиген MERS являлся корректным, в промоторной области имелась одна или несколько спонтанных делеций. Эти наблюдения показывают, во-первых, что удаление серий повторяющихся оснований не полностью объясняет эффект/недостатки композиции на основе MERS из предшествующего уровня техники. Эти наблюдения показывают, во-вторых, что удаление серий повторяющихся оснований не является простым или прямым подходом, который можно просто применять с ожиданием достижения успеха, поскольку в данном случае можно было бы ожидать, что композиция на основе MERS с удаленными сериями повторяющихся оснований будет являться эффективной, чего не произошло. Это еще одно свидетельство непредсказуемости, имеющей место в данной области, и свидетельство неожиданных эффектов, которые обеспечивает настоящее изобретение.

Более детально, дополнительная проблема, с которой столкнулись авторы настоящего изобретения в различных областях своих исследований, привела их к заключению, что вирусные гликопротеины являлись неизменно токсичными в системах для получения вирусных частиц, используемых для изготовления. Таким образом, авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что Tet-опосредуемая репрессия всегда необходима, чтобы избежать проблем, связанных с токсичностью. Эта гипотеза была подкреплена их наблюдениями при работе с антигенами внутренних вирусных белков, которые, по-видимому, не характеризуются такими же проблемами, связанными с токсичностью, как вирусные гликопротеины. Настоящее изобретение, в котором применяется шиповидный белок SARS-CoV2, является явным исключением из этого правила и является дополнительным доказательством изобретательского уровня настоящего изобретения.

Более детально, даже выбор вирусной последовательности для использования для получения антигенных последовательностей по настоящему изобретению являлся интеллектуально обоснованным выбором, который необходимо было сделать. Например, первая последовательность для SARS-CoV-2 была опубликована в пятницу, 10 января 2020 года. Дополнительные вирусные последовательности, как например нижеследующие, были опубликована в течение следующих дней.

Вирусные последовательности, которые были опубликованы

Название вируса	ID доступа	Подробности относительно пассажей/происхождение	Дата сбора	Хозяин	Передающая лаборатория	Получающая лаборатория
BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019	EPI_ISL_402119	Изолят вируса, пассаж 1	2019-12-30	Человек	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний, CDC Китая	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний, CDC Китая
BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-04/2020	EPI_ISL_402120	Исходный	2020-01-01	Человек	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний, CDC Китая	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний, CDC Китая
BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-05/2019	EPI_ISL_402121	Исходный	2019-12-30	Человек	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний, CDC Китая	Национальный институт контроля и профилактики вирусных заболеваний, CDC Китая
BetaCoV/Wuhan/IPBCAMS-WH-01/2019	EPI_ISL_402123	Исходный	2019-12-24	Человек	Институт биологии патогенов, Китайская академия медицинских наук и Медицинский колледж Пекинского союза	Институт биологии патогенов, Китайская академия медицинских наук и Медицинский колледж Пекинского союза
BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019	**EPI_ISL_402124**	**Исходный**	**2019-12-30**	**Человек**	**Уханьская больница Цзиньинтань**	**Уханьский институт вирусологии Китайской академии наук**

Не было очевидно, включение какой из последовательностей лучше всего осуществить в композиции/вакцину, например, ввиду предполагаемого полиморфизма.

Был проведен анализ, включающий ряд выравниваний последовательностей, и на основе этого анализа была выбрана вирусная последовательность, которая подлежала включению в композиции по настоящему изобретению.

Данные относительно иммуногенности мышей предоставлены для демонстрации полезных свойств, обеспечиваемых настоящим изобретением (см. раздел примеров).

Дополнительным преимуществом настоящего изобретения является то, что действительно сильные ответы с выработкой антител и с участием Т-клеток получали у мышей всего через 10 дней.

Считается, что комбинация ChAdOx1 с антигеном SARS-CoV2, применяемая в данной работе, ранее не была раскрыта и поэтому является новой.

Режим "прайм-буст" из предшествующего уровня техники с использованием вакцин-кандидатов на основе MVA вызывает очень устойчивый иммунный ответ, что неоднократно демонстрировалось с большим количеством различных антигенов при различных показаниях. Преимуществом настоящего изобретения является то, что одно введение ChAdOx-SARS-CoV2 приводит к развитию устойчивого иммунного ответа. Этот ответ в результате однократной дозы ChAdOx-SARS-CoV2 был неожиданно сильным и имел ряд преимуществ, включая более быстрое и простое лечение и более дешевое изготовление и лечение.

Авторы настоящего изобретения раскрывают, что описанные в данном документе вакцинные композиции на основе ChAdOx1 против SARS-CoV2 вызывают ответы с выработкой антител и клеточные иммунные ответы у мышей.

Авторы настоящего изобретения описывают четыре вакцины против SARS-CoV2 на основе вирусных векторов, представляющих собой ChAdOx1 и основанных на MVA, по две вакцины на каждый вектор. Все вакцины содержат полноразмерный ген шиповидного белка SARS-CoV2; вакцины на основе ChAdOx1 SARS-CoV2 получали с наличием лидерной последовательности гена активатора тканевого плазминогена человека (tPA) или без нее, в то время как вакцины на основе MVA SARS-CoV2 получали с наличием tPA и промотора, представляющего собой либо mH5, либо F11, управляющего экспрессией гена шиповидного белка.

Авторы настоящего изобретения раскрывают разработку вакцин-кандидатов, основанных на двух разных вирусных векторах: на основе аденовируса шимпанзе, Оксфордский университет № 1 (ChAdOx1) (26), а также на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) (27, 28). Каждый вирусный вектор был разработан путем создания двух альтернативных версий, в результате чего были созданы четыре вакцины-кандидата, все из которых предусматривают кодирование одного и того же полного гена шиповидного белка SARS-CoV2 (S). Две вакцины на основе ChAdOx1 получали с наличием сигнального пептида гена тканевого активатора плазминогена

человека (tPA) на N-конце или без него. Предыдущие исследования показали, что кодирование tPA, расположенного выше по отношению к рекомбинантным антигенам, повышало иммуногенность, хотя результаты различались в зависимости от используемых антигенов. tPA, кодируемый с расположением выше нуклеопротеина вируса гриппа А в ДНК-векторе, усиливал как клеточный, так и гуморальный иммунные ответы у мышей (29, 30), тогда как та же лидерная последовательность приводила в результате к повышению уровня экспрессии последовательностей, участвующих в гуморальных ответах, но снижала клеточные ответы в отношении Gag ВИЧ (30). Две вакцины на основе MVA получали с наличием промотора поксвируса, представляющего собой либо mH5, либо F11, управляющего экспрессией антигена, при этом обе из них предусматривали последовательность tPA на N-конце шиповидного белка SARS-CoV2. Ранее авторы настоящего изобретения сообщали о способности сильного раннего промотора F11 усиливать клеточную иммуногенность вакцин-кандидатов на основе антигенов против малярии и гриппа по сравнению с использованием ранних/поздних промоторов p7.5 или mH5, что приводило в результате к более низкому уровню экспрессии генов сразу после инфицирования вирусом клеток-мишеней, но к более высоким уровням на более поздних стадиях (31). В данном документе авторы настоящего изобретения продолжают оценивать промотор F11 в отношении повышения клеточной иммуногенности и исследовать его способность влиять на гуморальные иммунные ответы.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали основной поверхностный антиген SARS-CoV2 как шиповидный белок (S-белок) и продемонстрировали, что ChAdOx1, экспрессирующий этот белок, индуцирует выработку антител к белку S после однократной внутримышечной иммунизации.

РЕЖИМ "ПРАЙМ-БУСТ"

Настоящее изобретение также находит применение в схемах иммунизации в режиме "прайм-буст". Например, если по прошествии некоторого времени иммунный ответ ослабевает, что имеет тенденцию происходить естественным образом для многих иммунных ответов, тогда может потребоваться стимулировать ответ у пациента до достижения эффективных уровней, таких как обеспечивающие защиту уровни.

Бустерная иммунизация может быть гомологичной бустерной иммунизацией, т. е. может быть достигнута повторным введением той же композиции, которая использовалась для исходной примирующей иммунизации. В другом варианте осуществления бустерная иммунизация может проводиться с использованием композиции, отличной от композиции, используемой для исходной примирующей

иммунизации. Этот режим обозначается как гетерологичный режим "прайм-буст". Предпочтительно гетерологичная бустерная иммунизация (т. е. вторая по счету, проводимая для дополнительной иммунизации) предусматривает одну или несколько композиций на основе компонента, выбранного из MVA, РНК, ДНК, белка, вирусного вектора на основе аденовируса, вирусного вектора на основе аденовируса обезьян, вирусного вектора на основе аденовируса гориллы или вирусного вектора на основе аденовируса человека. Более предпочтительно бустерная (вторая или дополнительная) иммунизация может предусматривать MVA, РНК или белок. Наиболее предпочтительно бустер-иммунизация (вторая или дополнительная иммунизация) может предусматривать РНК или белок.

Преимущества бустерных схем (т. е. предусматривающих второе или дополнительное введение/иммунизацию) включают повышение уровня иммунного ответа у субъекта и/или увеличение продолжительности иммунного ответа.

Если требуется схема с двумя дозами, например, для конкретных областей применения, таких как обеспечение продолжительного иммунитета (например, у работников в сфере здравоохранения), предпочтительными являются ChAdOx1/MVA, или ChAdOx1/РНК, или ChAdOx1/белок для схем в режиме "прайм-буст".

Более предпочтительно, если требуется схема с двумя дозами, то предпочтительной является схема в гомологичном режиме "прайм-буст", как например предусматривающая ChAdOx1/ChAdOx1, наиболее предпочтительно ChAdOx1 nCoV-19/ChAdOx1 nCoV-19.

Типичная схема вакцинации с помощью модифицированной РНК или самоамплифицирующейся mRNA

Вводят две дозы вакцины, обычно с интервалом 4-8 недель между каждой дозой.

Типичная схема вакцинации с использованием белков

Введение двух или трех доз вакцины, как правило, с интервалом 4-8 недель между каждой дозой, а также при иммунизации требуется введение адъюванта.

Преимущественная схема вакцинации с применением вирусного вектора в соответствии с настоящим изобретением

Вводится одна доза вакцины.

В предусматривающих бустерную иммунизацию вариантах осуществления предпочтительно первое введение предусматривает композицию в соответствии с настоящим изобретением, содержащую вирусный вектор, способный обеспечивать экспрессию шиповидного белка SARS-CoV2, или заключается в ее применении.

Предпочтительно второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает точно такой же антиген, что и для вирусного вектора.

Предпочтительно второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает РНК-вакцину.

Предпочтительно второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает самоамплифицирующуюся РНК-вакцину.

Предпочтительно второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает IM-введение.

Предпочтительно, в случае если второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает адъювант, указанный адъювант выбирается исполнителем в зависимости от платформы. В том случае, когда второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает saRNA, адъювант не требуется.

Предпочтительно, в случае если второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает РНК, доза предпочтительно находится в диапазоне от 0,001 до 1 микрограмма.

Предпочтительно, в случае если второе или дополнительное ("бустерное") введение предусматривает белок, доза предпочтительно находится в диапазоне от 1 до 15 микрограмм.

ДОЗЫ ДЛЯ РЕЖИМА "ПРАЙМ-БУСТ"

Участников, включенных в анализ, разделяли на группы, которые получали два разных уровня дозы в качестве первой дозы (т. е. в качестве первого введения (примирования)).

Дозы в рамках первого введения (примирования) являлись следующими:

- $2{,}5 \times 10^{10}$ в. ч. (группа "низкая доза"/"половинная доза") и
- $5{,}0 \times 10^{10}$ в. ч. (группа "стандартная доза"/"полная доза").

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к режиму двойного введения, при котором первое введение и второе введение выполняются в отношении одного субъекта, где соотношение дозы в рамках первого введения и дозы в рамках второго введения составляет 0,5:1.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к режиму двойного введения, при котором первое введение и второе введение выполняются в отношении одного субъекта, где соотношение дозы в рамках первого введения и дозы в рамках второго введения составляет 1:1.

Комбинированный анализ, включающий всех участников (n=11636), продемонстрировал в результате среднюю эффективность, составляющую 70%.

Участники, получавшие половинную дозу в качестве первой дозы ("низкая доза"), а затем полную дозу ("стандартную дозу") по меньшей мере через один месяц (n=2741) (т. е. при соотношении дозы в рамках первого введения и дозы в рамках второго введения 0,5:1), продемонстрировали эффективность вакцины, составляющую 90%.

У участников, получавших две стандартные дозы (полные дозы) с интервалом по меньшей мере один месяц (n=8895) (т. е. при соотношении дозы в рамках первого введения и дозы в рамках второго введения 1:1), эффективность вакцины составила 62%.

Вакцину можно хранить, транспортировать и обрабатывать при нормальных условиях охлаждения (2-8 градусов Цельсия/36-46 градусов по Фаренгейту) в течение по меньшей мере шести месяцев и вводить в существующих учреждениях здравоохранения.

Настоящее изобретение также относится к описанной выше композиции, где введение первой дозы указанной композиции субъекту-млекопитающему с последующим введением второй дозы указанной композиции указанному субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунитет у указанного субъекта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает

(i) введение указанному субъекту первой дозы описанной выше композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы описанной выше композиции,

где указанная вторая доза содержит в приблизительно два раза больше вирусных частиц, чем указанная первая доза.

Настоящее изобретение также предусматривает способ предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает

(i) введение указанному субъекту первой дозы описанной выше композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы описанной выше композиции,

где указанная вторая доза содержит в приблизительно два раза больше вирусных частиц, чем указанная первая доза.

Настоящее изобретение также предусматривает композицию для применения, как описано выше, где указанное применение предусматривает

(i) введение указанному субъекту первой дозы указанной композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы указанной композиции,

где указанная первая доза и указанная вторая доза содержат приблизительно одинаковое число вирусных частиц.

Настоящее изобретение также предусматривает композицию для применения, как описано выше, где указанное применение предусматривает

(i) введение указанному субъекту первой дозы указанной композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы указанной композиции,

где указанная вторая доза содержит в приблизительно два раза больше вирусных частиц, чем указанная первая доза.

Настоящее изобретение также предусматривает способ индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, или способ предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, или композицию для применения в таком способе, при этом способ включает

(i) введение указанному субъекту первой дозы описанной выше композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы описанной выше композиции,

где указанная первая доза содержит приблизительно половину числа вирусных частиц в указанной второй дозе.

Настоящее изобретение также предусматривает способ индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, или способ предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, или композицию для применения в таком способе, при этом способ включает

(i) введение указанному субъекту первой дозы описанной выше композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы описанной выше композиции,

где соотношение числа вирусных частиц в указанной первой дозе и числа вирусных частиц в указанной второй дозе составляет 0,5:1.

Настоящее изобретение также предусматривает способ индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего или способ предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает

(i) введение указанному субъекту первой дозы описанной выше композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы описанной выше композиции,

где соотношение числа вирусных частиц в указанной первой дозе и числа вирусных частиц в указанной второй дозе составляет 1:2.

Авторы настоящего изобретения были крайне удивлены полезными техническими эффектами, обеспечиваемыми схемами иммунизации в режиме "прайм-буст", а в частности схемой иммунизации с использованием низкой дозы и стандартной дозы (LD-SD) (т. е. примирующая иммунизация при низкой дозе (0,5 х доза), бустерная иммунизация при стандартной дозе (1,0 х доза)).

Предпочтительно указанная вторая доза вводится с интервалом, составляющим

a) менее чем 6 недель,

b) 6-8 недель,

c) 9-11 недель или

d) 12 недель или больше,

после введения указанной первой дозы.

Предпочтительно в одном варианте осуществления указанная первая доза содержит приблизительно $2,5 \times 10^{10}$ вирусных частиц. (LD)

Предпочтительно в одном варианте осуществления указанная первая доза содержит приблизительно 5×10^{10} вирусных частиц. (SD)

Предпочтительно указанная вторая доза содержит приблизительно 5×10^{10} вирусных частиц. (SD)

В одном варианте осуществления предпочтительно указанная первая доза содержит приблизительно $2,5 \times 10^{10}$ вирусных частиц, и указанная вторая доза содержит приблизительно 5×10^{10} вирусных частиц. (LD-SD)

В одном варианте осуществления предпочтительно указанная первая доза содержит приблизительно 5×10^{10} вирусных частиц, и указанная вторая доза содержит приблизительно 5×10^{10} вирусных частиц. (SD-SD)

Предпочтительно указанную композицию вводят посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из интраназального, аэрозольного, внутрикожного и внутримышечного. Более предпочтительно указанное введение является внутримышечным.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящее изобретение находит особое применение в предупреждении или сдерживании вспышек SARS-CoV2. При такой ситуации чрезвычайно выгодным является достижение защитного иммунитета с помощью только одной дозы вакцины. Что касается особых соображений, которые относятся к новым патогенам, таким как SARS-CoV2, то, как правило, не имеется достаточного времени для введения двух доз. Также исключительно трудно добиться повторного визита пациентов для получения второй дозы. Например, у пациентов может быть много ограничений по времени, что может помешать посещению для получения второй дозы. Например, они могут быть вынуждены проделывать длинный путь, чтобы получить дозу, или они могут быть заняты обеспечением возможности получения средств к существованию, что может помешать им осуществлять посещение для получения более чем одной дозы. Таким образом, существует потребность в обеспечении быстрого появления защиты, которая

обеспечивается настоящим изобретением. Настоящее изобретение также преимущественно обеспечивает возможность избежать помещения пациентов на карантин в период между получением доз, осуществление чего в противном случае могло бы потребоваться, поскольку инфицирование в период между получением доз потенциально приводило бы к вредным последствиям для индивидуума.

По причинам, аналогичным изложенным выше, техническим преимуществом является то, что настоящее изобретение обеспечивает защитный иммунитет только при однократной дозе.

Предпочтительно субъектом является человек.

Предпочтительно способ представляет собой способ иммунизации.

Предпочтительно иммунный ответ предусматривает гуморальный ответ. Предпочтительно иммунный ответ предусматривает ответ с выработкой антител. Предпочтительно иммунный ответ предусматривает ответ с выработкой нейтрализующих антител.

Предпочтительно иммунный ответ предусматривает клеточно-опосредованный ответ. Предпочтительно иммунный ответ предусматривает клеточно-опосредованный иммунитет (CMI). Предпочтительно иммунный ответ предусматривает индуцирование CD8+ Т-клеток. Предпочтительно иммунный ответ предусматривает индуцирование ответа с участием CD8+ цитотоксических Т-клеток (CTL).

Предпочтительно иммунный ответ предусматривает как гуморальный ответ, так и клеточно-опосредованный ответ.

Предпочтительно иммунный ответ предусматривает выработку защитного иммунитета.

Предпочтительно композиция представляет собой антигенную композицию.

Предпочтительно композиция представляет собой иммуногенную композицию.

Предпочтительно композиция представляет собой вакцинную композицию.

Предпочтительно композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

Предпочтительно композиция составлена для введения млекопитающим, предпочтительно приматам, наиболее предпочтительно людям.

Предпочтительно композицию составляют с учетом пути ее введения. Предпочтительно композицию составляют таким образом, чтобы она подходила для указанного пути введения. Предпочтительно композицию составляют таким образом, чтобы она подходила для пути введения, выбранного исполнителем или врачом.

COVID19 представляет собой заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV2 у людей. Предпочтительно настоящее изобретение дополнительно относится к способу

предупреждения COVID19 у субъекта, при этом способ включает введение указанному субъекту описанной выше композиции.

ПУБЛИКАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ

Последовательности, хранящиеся в базах данных, могут изменяться со временем. Предпочтительно за основу берут текущую версию базы(баз) данных последовательностей. В качестве альтернативы за основу берут опубликованную версию, действующую на дату подачи заявки.

Как известно специалисту в данной области, номера доступа могут являться номерами доступа с указанием версии/даты. Приводимые номера доступа для текущей записи в базе данных являются такими же, как указано выше, но без десятичной запятой и любых последующих цифр.

GenBank представляет собой базу данных генетических последовательностей NIH, являющуюся аннотированной коллекцией всех общедоступных последовательностей ДНК (Национальный центр биотехнологической информации, Национальная медицинская библиотека США, 8600 Роквилл-Пайк, Бетесда, Мэриленд, 20894, США; Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41(D1):D36-42), и представленные номера доступа относятся к ней, если не очевидным не является иное. Предпочтительно за основу берут текущую опубликованную версию. Более предпочтительно за основу берут опубликованную версию, доступную на дату подачи заявки. Более предпочтительно

упомянутая опубликованная версия базы данных называется NCBI-GenBank, выпуск 235: 15 декабря 2019 г.

UniProt (Универсальный белковый ресурс) представляет собой исчерпывающий каталог информации относительно белков (‘UniProt: a hub for protein information', Nucleic Acids Res. 43: D204-D212 (2015).). Предпочтительно за основу берут текущую опубликованную версию. Более предпочтительно за основу берут опубликованную версию, доступную на дату подачи заявки. Наиболее предпочтительно за основу берут базу знаний UniProt (UniProtKB), представленную опубликованной версией 2020_01 от 26 февраля 2020 г., консорциума Европейского института биоинформатики (EBI), Швейцарского института биоинформатики и информационных ресурсов по белкам SIB (PIR).

ПРЕИМУЩЕСТВА

Настоящее изобретение обладает преимуществом обеспечения защитного иммунитета после однократной дозы (однократного введения).

Таким образом, преимуществом является то, что настоящее изобретение обеспечивает достижение защитных иммунных ответов уже после однократной дозы.

Фраза "защитный иммунный ответ" или "защитный иммунитет", используемая в данном документе, означает, что композиция способна обеспечивать развитие защитного ответа в организме-хозяине, таком как человек или отличное от человека млекопитающее, которому ее вводят в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно защитный иммунный ответ обеспечивает защиту от последующих инфекции или заболевания, вызванных SARS-CoV2.

При рассмотрении известных вакцин для различных групп заболеваний, как отмечалось выше, имеется вакцина на основе вирусного вектора, предусматривающего ChAdOx1 и шиповидный белок MERS (WO2018/215766). Однако авторы настоящего изобретения столкнулись с проблемами при увеличении масштаба получения этой вакцины на основе вирусного MERS-вектора (которая не является частью настоящего изобретения). Во-первых, вирусные частицы этой вакцины против вируса MERS не могли быть получены без Tet-опосредуемой репрессии. Поскольку в момент увеличении масштаба для изготовления требуются клеточные линии соответствующего GMP качества, то получение клеточной линии соответствующего GMP качества, характеризующейся Tet-опосредуемой репрессией, представлялось непростой задачей. Кроме того, клеточная линия была получена со значительными затратами. Таким образом, в дополнение к дополнительным трудозатратам и опыту, необходимым для обеспечения функционирования системы Tet-опосредуемой репрессии, высокая стоимость клеточной линии является еще одним недостатком этого способа. Даже когда вирус получали с использованием этой дорогостоящей системы Tet-опосредуемой репрессии, авторы настоящего изобретения наблюдали дополнительные последующие проблемы, связанные с нестабильностью. Как представляется авторам настоящего изобретения, возможные случаи смещения нуклеотидной последовательности могут способствовать нестабильности, поскольку они наблюдали, что только 15% полученного в результате количества вируса характеризовалось правильной последовательностью/генетической структурой. Однако, даже когда авторы настоящего изобретения изменили нуклеотиды в кодирующей последовательности в попытке устранить возможную нестабильность, связанную с проскальзыванием, все еще оставались проблемы, связанные с получением вируса — например, когда антиген являлся корректным, авторы настоящего изобретения наблюдали делеции в промоторной последовательности. Таким образом, при увеличении масштаба получения вакцины на основе вирусного вектора ChAdOx1-MERS столкнулись с многочисленными серьезными техническими трудностями. Вследствие всех этих причин авторы настоящего изобретения были крайне удивлены фактом модифицирования

кассеты экспрессии гена шиповидного белка SARS-CoV2 по настоящему изобретению и получения превосходных значений выхода с Tet-опосредуемой репрессией или даже без нее. Кроме того, автор настоящего изобретения с удивлением дополнительно отметил, что Tet-опосредуемая репрессия не требовалась для получения вакцины на основе вирусного вектора по настоящему изобретению. Эти результаты полностью отличались от опыта работы автора настоящего изобретения с вакциной на основе вирусного вектора ChAdOx1-MERS. Поэтому автор настоящего изобретения был крайне удивлен техническими свойствами вакцины на основе вирусного вектора по настоящему изобретению, отметив, что экспериментальные данные показали, что 6 из 8 восстановленных вирусов по настоящему изобретению имели полностью корректную генетическую структуру/последовательность. Это само по себе является значительным открытием, которое сильно удивило авторов настоящего изобретения высокой стабильностью их новой конструкции.

Эти преимущества вытекают из конкретной комбинации признаков, изложенных в формуле изобретения.

Для ChAdOx1 nCoV будет обеспечено быстрое одобрение.

Кроме того, можно отметить, что вакцина против вируса MERS (вакцина на основе вирусного вектора, предусматривающего ChAdOx1 и шиповидный белок MERS (WO2018/215766)) была протестирована на приматах, отличных от человека (NHP). Работа, касающаяся заражения MERS NHP, была опубликована в (N. van Doremalen et al., *(2020) Sci. Adv. 10.1126/sciadv.aba8399). В этой статье показано, что защита была лишь частичной после одной дозы вакцины против вируса MERS, а для обеспечения хорошей защиты требовались две дозы вакцины против вируса MERS. Авторы настоящего изобретения ссылаются на фиг. 2A из работы N. van Doremalen* et al, *на которой, в частности, показано, что требовалось 2 дозы, а также фиг. 3B из работы N. van Doremalen* et al.

ШИПОВИДНЫЙ БЕЛОК

Шиповидный белок (S-белок) представляет собой крупный трансмембранный белок I типа. Этот белок в высокой степени гликозилирован, характеризуясь содержанием многочисленных сайтов N-гликозилирования. Шиповидные белки подвергаются сборке в тримеры на поверхности вириона, образуя характерную "корону" или коронаподобный внешний вид. Эктодомены всех шиповидных белков CoV имеют одинаковую конфигурацию в двух доменах: N-концевом домене, называемом ***S1****, который отвечает за*

*связывание с рецептором, и С-концевом домене **S2**, который отвечает за обеспечение слияния. Разнообразие CoV отражается в вариабельных шиповидных белках (S-белках).*

Предпочтительно антигеном является шиповидный белок SARS-CoV2.

Предпочтительно используется полноразмерный шиповидный белок.

Предпочтительно полноразмерный означает, что включена каждая аминокислота в шиповидном белке.

Иллюстративный шиповидный белок является таким, как раскрыто под SEQ ID NO: 1.

Можно использовать только домен S1 шиповидного белка, или только растворимую часть шиповидного белка, или только рецептор-связывающий домен шиповидного белка. Однако, наиболее предпочтительным в соответствии с настоящим изобретением является использование полноразмерного шиповидного белка.

Выбирая полноразмерный шиповидный белок, преимущественно можно гарантировать корректное подтверждение белка. Усеченные белки могут принимать неестественные конформации. Этого недостатка можно избежать путем использования полноразмерного белка.

Дополнительное преимущество использования полноразмерного шиповидного белка заключается в том, что он обеспечивает более эффективные ответы с участием Т-клеток. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, считается, что чем больше присутствует аминокислотных последовательностей, тем больше имеется потенциальных мишеней для ответов с участием Т-клеток. Таким образом, предпочтительно каждая аминокислота шиповидного белка дикого типа включена в антиген по настоящему изобретению.

tPA

tPA (тканевый активатор плазминогена), более конкретно лидерная последовательность tPA, предпочтительно слит с шиповидным белком-антигеном SARS-CoV2 по настоящему изобретению. Предпочтительно tPA слит с N-концом последовательности шиповидного белка.

Предпочтительно лидерная последовательность tPA означает аминокислотную последовательность tPA под SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 5

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRR

В представленной выше SEQ ID NO: 5 С-концевой "RR" фактически не является частью лидерной последовательности tPA. Это обусловлено слиянием двух сайтов рестрикции. Предпочтительно лидерную последовательность tPA можно использовать с С-концевым "RR" или без него, например под SEQ ID NO: 7 или под SEQ ID NO: 8.

Наиболее предпочтительно используется последовательность, показанная под SEQ ID NO: 5.

Подчеркнутый A представляет собой P в лидерной последовательности tPA, встречающейся в природе. Преимущество мутации с заменой P на A заключается в обеспечении улучшенной секреции антигена.

Предпочтительно лидерную последовательность tPA можно использовать с мутацией с заменой P на A или без нее, т. е. предпочтительно лидерную последовательность tPA можно использовать в виде представленной в SEQ ID NO: 5 или в SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 6

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARFRR

SEQ ID NO: 7 (представляет собой SEQ ID NO: 5 без C-концевого "RR")

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARF

SEQ ID NO: 8 (представляет собой SEQ ID NO: 6 без C-концевого "RR")

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHARF

Более предпочтительно последовательность используется с мутацией с заменой P на A (с C-концевым "RR" или без него). Наиболее предпочтительно используется последовательность, показанная под SEQ ID NO: 5.

Иллюстративная нуклеотидная последовательность, кодирующая tPA, которая была кодон-оптимизирована для соответствия частоте использования кодонов, свойственной человеку, показана под SEQ ID NO: 9 (она является последовательностью, кодирующей SEQ ID NO: 5):

ATGGACGCCATGAAGAGGGGCCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGT
TTGTGTCCGCCAGCCAGGAAATCCACGCCCGGTTCAGACGG

Считается, что tPA способствует секреции белков, с которыми он слит. Считается, что tPA увеличивает экспрессию белков, с которыми он слит. Несмотря на лежащий в основе механизм, преимущество настоящего изобретения, обеспечиваемое слиянием tPA с N-концом шиповидного белка-антигена, заключается в том, что достигается повышенная иммуногенность. Таким образом, наиболее предпочтительно антиген по настоящему изобретению представлен в виде продукта слияния с tPA. Наиболее предпочтительно tPA слит с N-концом шиповидного белка-антигена.

Предпочтительно антиген не содержит каких-либо дополнительных маркеров последовательности.

Предпочтительно антиген не содержит каких-либо дополнительных линкерных последовательностей.

Вирусные векторы на основе аденовирусов

Аденовирусы являются привлекательными векторами для вакцинации людей. Они обладают стабильным геномом, ввиду чего вставки в виде чужеродных генов не удаляются, и они могут инфицировать большое количество клеток без каких-либо признаков инсерционного мутагенеза.

Дефектный по репликации аденовирус может быть сконструирован путем делеции генов из локуса E1, которые необходимы для репликации вируса, и эти вирусы можно легко размножать с получением хороших значений выхода в клеточных линиях, экспрессирующих E1 из AdHu5, таких как клетки почки человеческого эмбриона 293 (клетки HEK 293).

Предыдущие кампании массовой вакцинации, проводимые среди более 2 миллионов взрослых военнослужащих США с использованием перорально вводимых живых аденовирусов человека серотипов 4 и 7, продемонстрировали хорошие данные в отношении безопасности и эффективности. Аденовирусы человека, среди прочего, разрабатываются в качестве векторов для вакцин против малярии, ВИЧ и гепатита C. Они широко применялись в испытаниях с участием людей, обеспечивая превосходный профиль безопасности, главным образом в качестве векторов для вакцин против ВИЧ.

Фактором, ограничивающим широкое использование аденовируса человека в качестве векторов для вакцин, является уровень антивекторного иммунитета, присутствующий у людей, в случае которых аденовирус представляет собой повсеместную инфекцию. Распространенность иммунитета к аденовирусам человека побудила рассмотреть аденовирусы обезьян в качестве векторов, поскольку они характеризуются гексонными структурами, гомологичными аденовирусам человека. Аденовирусы обезьян, как известно, не вызывают патологических заболеваний у людей, а распространенность антител к аденовирусам, происходящим от шимпанзе, составляет менее чем 5% у людей, проживающих в США.

Можно использовать любой подходящий вирусный вектор на основе аденовируса.

Более детально, можно использовать любой вирусный вектор с недостаточной репликацией для применения у людей, предпочтительно полученный из аденовируса, отличного от человеческого. Для ветеринарного применения можно использовать Ad5.

ChAdOx2 является примером подходящего вектора на основе аденовируса, отличного от человеческого, для применения у людей.

Наиболее предпочтительно вирусным вектором на основе аденовируса является ChAdOx1.

ChAdOx1

ChAdOx1 представляет собой вектор на основе аденовируса обезьян с недостаточной репликацией. Изготовление вакцины может осуществляться в малых или больших масштабах. Изначально имеющиеся уровни антител к вектору у людей являются очень низкими, и вакцины индуцируют сильные ответы с выработкой антител и участием Т-клеток после однократной дозы, в то время как отсутствие репликации после иммунизации приводит к превосходному профилю безопасности у субъектов всех возрастов.

ChAdOx1 описан в Dicks MDJ, Spencer AJ, Edwards NJ, Wadell G, Bojang K, et al. (2012) A Novel Chimpanzee Adenovirus Vector with Low Human Seroprevalence: Improved Systems for Vector Derivation and Comparative Immunogenicity. PLoS ONE 7(7): e40385, а также в WO2012/172277. Оба эти документа настоящим включены в данный документ посредством ссылки, в частности, в отношении конкретных идей относительно вектора ChAdOx1, включая его конструкцию и изготовление.

Для встраивания нуклеотидной последовательности, кодирующей шиповидный белок, предпочтительно можно использовать сайт E1 предпочтительно с IE-промотором hCMV. Предпочтительно можно использовать короткую или длинную версию; наиболее предпочтительно длинную версию, описанную в WO2008/122811, которая конкретно включена в данный документ посредством ссылки применительно к идеям в отношении промоторов, в частности длинного промотора.

Также возможно встраивать антигены в сайт E3 или рядом с последовательностями инвертированных концевых повторов, если это требуется.

Кроме того, в ECACC депонирован клон ChAdOx1, содержащий GFP: образец штамма SW1029 *E. coli* (производного от DH10B), содержащий бактериальные искусственные хромосомы (BAC), содержащие клонированный геном AdChOX1 (pBACe3.6 AdChOx1 (E4-модифицированный) TIPeGFP, название клеточной линии "AdChOx1 (E4-модифицированный) TIPeGFP"), был депонирован компанией Isis Innovation Limited 24 мая 2012 г. в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), являющейся частью Коллекции культур Агентства по охране здоровья, Агентство по охране здоровья, Портон-Даун, Солсбери SP4 0JG, Соединенное Королевство, в соответствии с Будапештским договором и обозначен предварительным номером доступа 12052403. Isis Innovation Limited является прежним названием владельца/заявителя этого патента/заявки.

ChAdOx2

Нуклеотидная последовательность вектора ChAdOx2 (с кассетой Gateway™ в

локусе E1) показана под SEQ ID NO. 2. Он представляет собой вирусный вектор на основе аденовируса шимпанзе C68. (Он представлен последовательностью под SEQ ID NO: 10 в заявке на патент Великобритании под номером 1610967.0).

Кроме того, клон ChAdOx2, содержащий GFP, депонирован в ECACC: номер доступа депонирования 16061301, депонирован Isis Innovation Limited 13 июня 2016 г. в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC), являющейся частью Коллекции культур Агентства по охране здоровья, Агентство по охране здоровья, Портон-Даун, Солсбери, SP4 0JG, Великобритания, согласно Будапештскому договору. Isis Innovation Limited является прежним названием владельца/заявителя этого патента/заявки.

ChAd63

В одном варианте осуществления, если требуется, можно использовать родственный вакцинный вектор ChAd63.

Получение ChAdOx1 nCoV-19

ChAdOx1 nCoV-19 можно получать любым способом, известным из уровня техники. Например, ChAdOx1 nCoV-19 можно получать, как описано в примере 10.

В общих чертах, шиповидный белок (S) из SARS-Cov-2 (с номером доступа в Genbank YP_009724390.1) был кодон-оптимизирован для экспрессии в клеточных линиях человека и синтезирован с использованием сервиса для синтеза генов GeneArt (Thermo Fisher Scientific). Последовательность, кодирующую аминокислоты 2-1273, клонировали в челночную плазмиду после клонирования InFusion (Clontech). Челночная плазмида кодирует модифицированный главный немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека (IE CMV) с сайтами тетрациклинового оператора (TetO), сигналом полиаденилирования из бычьего гормона роста (BGH) и сигнальной последовательностью tPA, расположенной выше по отношению ко встроенному гену.

Во избежание сомнений, "ChAdOx1 nCoV-19" означает аденовирусный вектор ChAdOx1, как описано в Dicks *et al.* (2012) PLoS ONE 7(7): e40385, и/или в WO2012/172277, содержащий нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4 (лидерную последовательность tPA из 32 аминокислот, слитую с шиповидным белком SARS-Cov-2), встроенную в локус E1 аденовирусного вектора ChAdOx1 под управлением "длинного" промотора CMV (цитомегаловируса). Это является предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения.

ПУТЬ ВВЕДЕНИЯ

В принципе, можно использовать любой подходящий путь введения.

Средства по настоящему изобретению можно вводить посредством аэрозольной доставки в респираторный тракт с использованием широко доступного устройства, обычно используемого для доставки лекарственных средств. Это может быть подходящим путем доставки вакцины против респираторных патогенов, таких как коронавирусы. В одном варианте осуществления композиция может содержать вакцину с вектором на основе MVA, при этом аэрозольная доставка может приводить к сильным иммунным ответам в респираторном тракте при низких дозах. Еще одним преимуществом аэрозольной доставки является исключение использования игл.

Предпочтительно путь введения выбран из группы, состоящей из подкожного, интраназального, аэрозольного, небулайзерного, внутрикожного и внутримышечного.

Предпочтительно путь введения выбран из группы, состоящей из интраназального, аэрозольного, внутрикожного и внутримышечного.

Предпочтительно путь введения выбран из группы, состоящей из интраназального, аэрозольного и внутримышечного.

Более предпочтительно путь введения выбран из группы, состоящей из интраназального и внутримышечного.

Наиболее предпочтительно путем введения является внутримышечный.

Путь введения может применяться по отношению к людям и/или другим млекопитающим.

ДОЗА

Следует отметить, что существуют альтернативные способы описания дозы для аденовирусных векторов.

- Вирусные частицы – в. ч./мл. Это относится к общему количеству введенных вирусных частиц.
- Инфекционные единицы – ИЕ/мл. Это относится к количеству введенных инфекционных единиц и может более точно коррелировать с иммуногенностью.

По соглашению, клинические испытания в Великобритании, как правило, предусматривают указание дозы с точки зрения вирусных частиц.

Предпочтительными дозами в соответствии с настоящим изобретением являются следующие.

Для людей в одном варианте осуществления диапазон составляет от 10^9 до 10^{11} вирусных частиц.

Для людей в одном варианте осуществления диапазон составляет $2,5 \times 10^{10}$ в. ч. до 5×10^{10} в. ч.

Для людей в одном варианте осуществления доза(-ы)/диапазон дозы(доз) могут быть получены из приведенных ниже примеров.

Предпочтительно с вирусным вектором по настоящему изобретению адъювант не вводят.

Предпочтительно вирусный вектор по настоящему изобретению составляют с простым буфером. Иллюстративный буфер может быть таким, как показано ниже под заголовком "Состав".

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

Предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты является кодон-оптимизированной для соответствия частоте использования кодонов, свойственной млекопитающему, наиболее предпочтительно для соответствия частоте использования кодонов, свойственной человеку.

Предпочтительно предусмотрен контейнер, содержащий описанную выше композицию. Предпочтительно указанный контейнер может представлять собой флакон. Предпочтительно указанный контейнер может представлять собой шприц.

Предпочтительно предусмотрен небулайзер, содержащий описанную выше композицию.

Предпочтительно предусмотрен назальный аппликатор, содержащий описанную выше композицию.

Предпочтительно предусмотрен ингалятор, содержащий описанную выше композицию.

Предпочтительно предусмотрен баллон под давлением, содержащий описанную выше композицию.

Предусмотрен способ изготовления описанной выше композиции, при этом указанный способ включает получение нуклеиновой кислоты, кодирующей шиповидный белок SARS-CoV2, необязательно слитый с белком tPA, и встраивание указанной нуклеиновой кислоты в вирусный вектор на основе аденовируса, предпочтительно вектор ChAdOx1. Предпочтительно нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, подходящим для индуцирования экспрессии указанного шиповидного белка SARS-CoV2 (или слитого белка, содержащего шиповидный белок SARS-CoV2 и tPA) в клетке млекопитающего, такой как клетка человека.

СОСТАВ

Вакцинный состав может являться жидким, предпочтительно стабильным в течение по меньшей мере 1 года при температуре 2-8°C, или может являться лиофилизированным,

предпочтительно стабильным при значениях температуры окружающей среды, например при комнатной температуре 18-22°C.

Буфер для состава на основе ChAdOx1, используемый для клинического продукта, является следующим.

КОМПОНЕНТЫ БУФЕРА ДЛЯ СОСТАВА

1. 10 мМ гистидина
2. 7,5% сахарозы
3. 35 мМ хлорида натрия
4. 1 мМ хлорида магния
5. 0,1% полисорбата 80
6. 0,1 мМ EDTA
7. 0,5% этанола
8. Хлористоводородная кислота (для доведения pH до ~pH 6,6)

Составление осуществляется в воде для инъекций согласно Европейской фармакопее.

Составы для других путей введения, таких как аэрозольный, будут соответствующим образом подобраны опытным исполнителем.

Предпочтительно композиция и/или состав не содержат адъюванта. Предпочтительно адъювант исключен из композиции и/или состава по настоящему изобретению.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Как отмечалось выше, можно использовать только домен S1 шиповидного белка, или только растворимую часть шиповидного белка, или только рецептор-связывающий домен шиповидного белка.

В одном варианте осуществления шиповидный белок может быть представлен в виде усеченного шиповидного белка, содержащего участок, предусматривающий рецептор-связывающий домен (RBD) шиповидного белка. Более предпочтительно шиповидный белок может быть представлен в виде конструкции, состоящей по существу из RBD-части шиповидного белка. Более предпочтительно шиповидный белок может быть представлен в виде конструкции, состоящей только из участка, предусматривающего RBD шиповидного белка.

Таким образом, в одном варианте осуществления используется только рецептор-связывающий домен шиповидного белка. Предпочтительно в данном случае предусмотрен продукт слияния с tPA.

Предпочтительно в данном варианте осуществления шиповидный белок имеет последовательность из SEQ ID NO: 12, под которым представлена аминокислотная

последовательность рецептор-связывающего домена шиповидного белка и tPA (последовательность tPA подчеркнута):

SEQ ID NO: 12

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWN
RKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIY
QAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTN
.

Предпочтительно в данном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая шиповидный белок, имеет последовательность из SEQ ID NO: 13, под которым представлена нуклеотидная последовательность, пересмотренная автором настоящего изобретения (т. е. после оптимизации кодонов для применения у людей, в ходе которой были введены серии одинаковых оснований, и после того, как эти серии одинаковых оснований были пересмотрены для сохранения той же кодирующей последовательности, но с удалением повторов), кодирующая рецептор-связывающий домен SARS-CoV2 шиповидного белка совместно с tPA (последовательность, кодирующая tPA, подчеркнута).

SEQ ID NO: 13:

ATGGACGCCATGAAGCGAGGCCTGTGCTGTGTTCTGCTTCTGTGTGGCGCCGTGT
TTGTGTCCGCCAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGACCGAATATCACCAATC
TGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGA
ACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCC
AGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCACCTACCAAGCTGAACGACCTGTGC
TTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGTGGAGATGAAGTGCGGCAGAT
TGCACCTGGACAGACAGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACT
TCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGATAGCAAAGTCGGCGGC
AACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGG
GACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACACCTTGTAACGGCGTGGAAGG
CTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGG
CTACCAGCCTTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAGCTGCTGCATGCTCCTGCCAC
AGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATTAA

В одном варианте осуществления шиповидный белок может быть представлен в "форме до слияния". Таким образом, в одном варианте осуществления используется версия шиповидного белка в конформации "до слияния".

Предпочтительно в данном случае предусмотрен продукт слияния с tPA.

Предпочтительно в данном варианте осуществления шиповидный белок имеет последовательность из SEQ ID NO: 14, под которым представлена аминокислотная последовательность шиповидного белка в конформации "до слияния" и tPA (последовательность tPA подчеркнута).

SEQ ID NO: 14

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPP
AYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPF
NDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYS
KHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYY
VGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESI
VRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTK
LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKV
GGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVG
YQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ
QFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAI
HADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPGSA
SSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDS
TECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILP
DPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDE
MIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQF
NSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPE
AEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGY
HLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVT
QRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVD
LGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIA
IVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

Предпочтительно в данном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая шиповидный белок, имеет последовательность из SEQ ID NO: 15, под которым представлена нуклеотидная последовательность, пересмотренная автором настоящего изобретения (т. е. после оптимизации кодонов для применения у людей, в ходе которой были введены серии одинаковых оснований, и после того, как эти серии одинаковых оснований были пересмотрены для сохранения той же кодирующей

последовательности, но с удалением повторов), кодирующая шиповидный белок SARS-CoV2 в конформации "до слияния" совместно с tPA (последовательность tPA подчеркнута).

SEQ ID NO: 15

ATGGACGCCATGAAGCGAGGCCTGTGCTGTGTTCTGCTTCTGTGTGGCGCCGTGT
TTGTGTCCGCCAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGATTCGTGTTCCTGGTGC
TGCTGCCACTGGTGTCTAGCCAGTGTGTGAACCTGACCACCAGGACACAGCTGCCTC
CAGCCTACACCAACAGCTTCACCAGAGGCGTGTACTACCCAGACAAGGTGTTCAGA
TCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCT
GGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCA
GTGCTGCCCTTCAACGACGGAGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATC
AGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGT
GAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACC
CATTCCTGGGCGTCTACTACCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTC
CGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTCGAGTACGTGTCCCAGCCTTTCCTG
ATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAA
GAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACACCTATCAACCTCGTGC
GGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCACTGGTGGATCTGCCCATCGGCA
TCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTG
GCGATAGCAGCTCTGGATGGACAGCTGGCGCCGCTGCCTACTATGTGGGATACCTGC
AGCCTCGGACCTTCCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTG
GATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTG
GAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGT
GCGGTTCCCGAATATCACCAATCTGTGCCCATTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAG
ATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTA
CTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCACC
TACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCG
TGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCACCTGGACAGACAGGCAAGATCGCCGACTACA
ACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAAC
CTGGATAGCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCC
AATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCAC
ACCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTT
TCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTACCAGCCTTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCG
AGCTGCTGCATGCTCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGA

AGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACA
GAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTCGGCCGGGATATCGCCGATAC
CACAGATGCCGTCAGAGATCCTCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACACCTTGCA
GCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACGCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCA
GTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCA
GCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAG
CCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCT
ATCGGCGCTGGCATCTGCGCCTCTTACCAGACACAGACAAACAGCCCTGGCAGCGC
CTCTTCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAA
CAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCGACCAACTTCACCATCAGCGT
GACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGT
ACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCT
GCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACC
CAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACGCCTCCTATCAAGGACTT
CGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGA
GCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCA
AGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGA
AGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGT
ACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGC
GCTGCCCTGCAGATCCCATTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGA
GTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAG
CGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGC
TGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTG
TCTAGCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGAC
CCTCCTGAAGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCT
GCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCA
ATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGAC
TTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCGCCTCACGGCGTG
GTGTTTCTGCACGTGACATACGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCA
GCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAAC
GGCACCCATTGGTTCGTGACCCAGCGGAACTTCTACGAGCCTCAGATCATCACCACC
GACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACC
GTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGATAAGTA
CTTTAAGAACCACACAAGCCCTGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATG

CCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAAT
CTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGCAAGTACGAGCAGTACATCAA
GTGGCCCTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGT
CACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAG
CTGTGGCTCCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGT
GAAACTGCACTACACCTGATAA

ВАРЬИРОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Предпочтительно последовательность представляет собой аминокислотную последовательность, предусмотренную в данном документе, такую как SEQ ID NO. 1, или получена из нее. Допускается некоторая степень варьирования последовательности. Предпочтительно последовательность, используемая в векторе по настоящему изобретению, предусматривает аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 99% идентичностью с эталонной аминокислотной последовательностью, например, эталонной аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO. 1.

Уровень идентичности последовательности 99% по сравнению с SEQ ID NO. 1 (имеющей 1272 аминокислоты) соответствует приблизительно 12-13 заменам по всей длине последовательности шиповидного белка, представленной под SEQ ID NO. 1. Предпочтительно используемая конструкция на основе шиповидного белка имеет 13 или меньше замен относительно SEQ ID NO: 1, предпочтительно 12 или меньше замен относительно SEQ ID NO: 1, предпочтительно 10 или меньше замен относительно SEQ ID NO: 1, предпочтительно 8 или меньше замен относительно SEQ ID NO: 1, предпочтительно 6 или меньше замен относительно SEQ ID NO: 1, предпочтительно 4 или меньше замен относительно SEQ ID NO: 1, предпочтительно 2 или меньше замен относительно SEQ ID NO: 1, предпочтительно одну замену относительно SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно любые аминокислотные замены не находятся в рецептор-связывающем домене. Предпочтительно любые аминокислотные замены находятся вне рецептор-связывающего домена.

Предпочтительно подсчет замен не включает добавление последовательности tPA.

MVA – ШИПОВИДНЫЙ БЕЛОК SARS-CoV2

Авторы настоящего изобретения раскрывают вектор на основе MVA, несущий шиповидный белок SARS-CoV2. Вектор на основе MVA, описанный в данном документе, характеризуется промоторной системой mH5/F11 в одном варианте осуществления или основан на стандартном промоторе F11 в другом варианте осуществления. В любом

случае, эти промоторные системы известны из уровня техники, например, в опубликованном патенте США 9273327 B2 (Cottingham, выданном 1 марта 2016 г., "Поксвирусная система экспрессии"), причем этот документ настоящим включен в данный документ посредством ссылки, в частности в отношении конкретных идей относительно промотора(-ов) для применения в данном документе.

В контексте настоящего изобретения, как описано, вектор на основе MVA, доставляющий шиповидный белок SARS-CoV2, рассматривается как полезное необязательное средство стимулирования в схеме иммунизации. Первая доза предпочтительно должна представлять собой ChAdOx1 с шиповидным белком SARS-CoV2 (наиболее предпочтительно содержащий tPA, слитый с N-концом шиповидного белка), а необязательное второе введение предпочтительно предусматривает MVA с шиповидным белком SARS-CoV2.

Как будет очевидно, основное внимание в настоящем изобретении уделяется созданию вакцины против SARS-CoV2 для применения в виде однократной дозы. Однако в данном варианте осуществления, предусматривающем второе (бустерное) введение, предпочтительно, чтобы второе (бустерное) введение осуществлялось с другим вирусным вектором, т. е. согласно схеме в гетерологичном режиме "прайм-буст". Предпочтительно второе (бустерное) введение предусматривает вектор на основе MVA. Это находит особое применение, например, для индуцирования иммунитета у таких субъектов, как работники в сфере здравоохранения. Особую проблему представляет то, что работники в сфере здравоохранения могут заразиться инфекцией, вызываемой SARS-CoV2. Поскольку они, как правило, сами обладают хорошим состоянием здоровья, то это очень слабо влияет на их общее состояние здоровья. Однако, в случае если они являются инфицированными, они, конечно, могут выделять вирус, который может продолжить инфицировать пациентов с ослабленным иммунитетом, уход за которыми они осуществляют, с катастрофическими последствиями. Поэтому имеет место особая и конкретная проблема, связанная с иммунизацией работников в сфере здравоохранения. Для этих специалистов необходим сильный и длительный иммунитет. Поэтому, хотя основополагающим принципом настоящего изобретения является то, что однократная доза вакцины обеспечивает защиту от инфекции, вызываемой SARS-CoV2, в конкретном случае работников в сфере здравоохранения необходимо, чтобы защитный иммунитет сохранялся как можно дольше в будущем. Для большинства областей применения временный иммунитет ("временный", в отличие от пожизненного иммунитета) вполне достаточен для защиты человека и/или для остановки распространения инфекции. Однако,

в конкретном случае работников в сфере здравоохранения любой способ продления их иммунитета во времени сам по себе является дополнительно преимущественным. В данном сценарии авторы настоящего изобретения предлагают схему в режиме "прайм-буст", предусматривающую первое введение композиции на основе аденовирусного вектора для SARS-CoV2, такой как композиция на основе ChAdOx-SARS-CoV2, с последующим вторым (бустерным) введением вирусного вектора, содержащего шиповидный белок SARS-CoV2, такого как вектор на основе MVA, экспрессирующий шиповидный белок SARS-CoV2. Таким образом, по мнению авторов настоящего изобретения вектор на основе MVA, несущий шиповидный белок SARS-CoV2, имеет ограниченное применение, однако может найти конкретное применение в качестве средства гетерологичной бустерной вакцинации после примирующей вакцинации с помощью ChAdOx, несущего шиповидный белок SARS-CoV2. В одном варианте осуществления порядок процедур иммунизации может быть обратным, вследствие чего сначала вводят вакцину на основе MVA-SARS-CoV2, а затем вакцину на основе ChAdOx-SARS-CoV2 после интервала, обычно составляющего 1-8 недель.

Таким образом, в одном аспекте изобретение предусматривает способ индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает

(i) введение указанному субъекту композиции, содержащей вирусный вектор, при этом вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, имеющую полинуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок SARS-CoV2, отличающейся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса, и

(ii) введение указанному субъекту композиции, содержащей вирусный вектор, при этом вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, имеющую полинуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок SARS-CoV2, отличающейся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой вектор на основе MVA.

Предпочтительно стадия (i) предусматривает примирующую композицию.

Предпочтительно стадия (ii) предусматривает бустерную композицию.

Предпочтительно стадию (ii) осуществляют через 1-8 недель после стадии (i), наиболее предпочтительно через 4 недели после стадии (i).

Дополнительные конкретные и предпочтительные аспекты изложены в прилагаемых независимых и зависимых пунктах формулы изобретения. Признаки зависимых пунктов формулы изобретения могут быть объединены с признаками независимых пунктов

формулы изобретения, а также в комбинациях, отличных от тех, которые явно указаны в пунктах формулы изобретения.

Если характеристика устройства описана как выполненная для обеспечения функции, то следует понимать, что она включает характеристику устройства, которая обеспечивает эту функцию или которая адаптирована или выполнена с возможность обеспечения этой функции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Далее настоящее изобретение будет описано со ссылкой на прилагаемые в качестве примера графические материалы, на которых изображено следующее.

На фигуре 1 показана столбчатая диаграмма.

На фигуре 2 показана столбчатая диаграмма.

На фигуре 3 показана столбчатая диаграмма.

На фигуре 4 показаны графики.

На фигуре 5 показаны графики.

На фигуре 6 показана карта ДНК ChAdOx1 nCoV-19.

На фигуре 7 показаны графики/столбчатые диаграммы.

На фигуре 8 показаны графики/столбчатые диаграммы.

На фигуре 9 показаны графики.

На фигуре 10 показаны графики.

На фигуре 11 показаны графики.

На фигуре 12 показана столбчатая диаграмма.

На фигуре 13 показаны S-специфичные ответы с участием Т-клеток в отношении SARS-CoV-2 после осуществления схем вакцинации с использованием ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "только примирование" и в режиме "прайм-буст" у мышей и свиней.

На фигуре 14 показаны ответы с выработкой специфичных к S-белку SARS-CoV-2 антител после осуществления схем вакцинации с использованием ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "только примирование" и в режиме "прайм-буст" у мышей и свиней.

На фигуре 15 показаны столбчатые диаграммы. Полученные местные (15A) и системные (15B) нежелательные реакции в первые 7 дней после вакцинации, зарегистрированные в электронных дневниках симптомов у участников. P = 60-минутный период поствакцинального наблюдения в клинике; день 0 является днем вакцинации. Лихорадка: самостоятельная оценка ощущений при лихорадочном состоянии, температура при лихорадке: объективные измерения температуры, легкая: >= 38°C, умеренная: >= 38,5°C, тяжелая: >= 39,0°C.

На фигуре 16 показаны столбчатые диаграммы. Полученные местные (16A) и системные (16B) нежелательные реакции в первые 7 дней после примирующих доз и при бустерных дозах с использованием ChAdOx1 nCoV-19 в нерандомизированной подгруппе из 10 участников. P = 60-минутный период поствакцинального наблюдения в клинике; день 0 является днем вакцинации. Лихорадка: самостоятельная оценка ощущений при лихорадочном состоянии, температура при лихорадке: объективные измерения температуры, легкая: >= 38oC, умеренная: >= 38,5oC, тяжелая: >= 39,0oC.

На фигуре 17 показаны графики. Ответ с участием IgG согласно стандартизированному внутрилабораторному ELISA в отношении шиповидного белка SARS-CoV-2 у участников испытаний и выздоравливающих ПЦР-положительных пациентов с COVID-19. Красные (средние): реципиенты ChAdOx1 nCoV-19; синие (слева): реципиенты MenACWY, зеленые (справа): сыворотка крови выздоравливающих ПЦР-положительных пациентов с COVID-19. Планки погрешностей показывают медиану и IQR. Участники группы с бустерной иммунизацией получали вторую дозу в день 28.

На фигуре 18 показаны графики. Мультиплексный ответ с участием IgG в отношении SARS-CoV-2 согласно ELISA применительно к 18A) шиповидному белку и 1B) рецептор-связывающему домену у участников испытаний и выздоравливающих ПЦР-положительных пациентов с COVID-19 (платформа MSD Mesoscale). Красные: реципиенты ChAdOx1 nCoV-19; синие: реципиенты MenACWY, зеленые: сыворотка крови выздоравливающих ПЦР-положительных пациентов с COVID-19. Планки погрешностей показывают медиану и IQR. Образцы, взятые в день 42 у количества участников N=9, подвергнутых бустерной иммунизации в день 28.

На фигуре 19 показаны графики. Ответ согласно ELISPOT IFNg в отношении пептидов, охватывающих шиповидный белок SARS-CoV-2, SFC: пятнообразующие клетки, PBMC: мононуклеарные клетки периферической крови. Планки погрешностей показывают медианы и межквартильные диапазоны. LLD составляет 48 SFC.

На фигуре 20 показан график. Анализ нейтрализации псевдотипа (Monogram). Синие: реципиенты MenACWY, красные: реципиенты ChAdOx1 nCoV-19. Зеленые (крайние справа): сыворотка крови выздоравливающих при случаях COVID-19 (CONV). Сплошные линии соединяют образцы от одного и того же участника. Образцы, взятые в день 35 и день 42 у участников, которые получали бустерную дозу в день 28.

На фигуре 21 показаны графики. Анализы нейтрализации живого SARS-CoV-2.

Верхние панели: нейтрализация живого вируса SARS-CoV-2 (IC100 - Марбург-анализ).

Нижняя левая: микронейтрализация живого SARS-CoV-2 (MNA) (IC50 — Служба общественного здравоохранения Англии) и внизу справа: анализ в отношении титра нейтрализации бляшкообразования (PRNT) (IC50 - Служба общественного здравоохранения Англии). Синие: реципиенты MenACWY, красные: реципиенты ChAdOx1 nCoV-19. Группа 1: группа, предусматривающая только примирование, группа 3: группа, предусматривающая режим "прайм-буст" (подвергнутая бустерной иммунизации в день 28). Сплошные линии соединяют образцы от одного и того же участника. Пунктирная линия показывает нижний/верхний пределы выявления. CONV: сыворотка крови выздоравливающих при случаях COVID-19, HCW+: сыворотка крови работников в сфере здравоохранения, у которых результат теста на исходном уровне согласно ELISA был положительным.

На фигуре 22 показана диаграмма профиля испытаний.

На фигуре 23 представлена диаграмма эффекта профилактического парацетамола в отношении ожидаемых местных реакций в первые 2 дня после вакцинации с помощью A) ChAdOx1 nCoV-19, B) MenACWY. * Соотношения шансов были скорректированы с учетом возраста, пола, профессии (является работником в сфере здравоохранения или таковым не является), курения, употребления алкоголя и BMI.

На фигуре 24 показаны диаграммы. Эффект профилактического парацетамола в отношении ожидаемых системных реакций в первые 2 дня после вакцинации с помощью A) ChAdOx1 nCoV-19, B) MenACWY. * Соотношения шансов были скорректированы с учетом возраста, пола, профессии (является работником в сфере здравоохранения или таковым не является), курения, употребления алкоголя и BMI.

На фигуре 25 показаны графики.

На фигуре 26 показаны графики полученных местных нежелательных реакций в течение 7 дней после примирующей или бустерной вакцинации с помощью вакцины в стандартной дозе в зависимости от возраста, относящиеся к примеру 16, где день 0 является днем вакцинации. Показанные участники являются участниками, рандомизированными для получения 2 доз; нежелательные реакции регистрировались в электронных дневниках симптомов участников.

На фигуре 27 показаны графики полученных системных нежелательных реакций в течение 7 дней после примирующей или бустерной вакцинации с помощью вакцины в стандартной дозе в зависимости от возраста, относящиеся к примеру 16. День 0 является днем вакцинации. Лихорадочное состояние: самостоятельная оценка ощущений при лихорадочном состоянии, температура при лихорадке: объективные измерения

температуры, легкая: >= 38°C, умеренная: >= 38,5°C, тяжелая: >= 39,0°C. Показанные участники являются участниками, рандомизированными для получения 2 доз. Нежелательные реакции регистрировались в электронных дневниках симптомов участников.

На фигуре 28 представлены графики титров нейтрализующих антител, измеренных в анализе нейтрализации псевдотипированного вируса (Monogram) после примирующей и бустерной вакцинации в зависимости от возраста и дозы вакцины, относящиеся к примеру 16. Красные: реципиенты ChadOx1 nCoV-19, синие: реципиент MenACWY. Пунктирная линия означает нижний предел анализа (40). Показаны только участники, которым назначено получение двух доз. Сравнение титров в день 42 в возрастных группах, получавших одинаковую дозу, с помощью ANOVA, примененного к log_2-преобразованным значениям: низкая доза, p=0,2440, высокая доза, p=0,6555. Сравнение титров в день 42 среди дозовых групп в каждой возрастной когорте с помощью t-критерия для независимых выборок, примененного к log_2-преобразованным значениям: 18-55, p=0,5115, 56-69, p=0,4516, 70+, p=0,7664.

На фигуре 29 показан график ответа согласно ELISpot интерферона-γ в отношении пептидов, охватывающих встроенный шиповидный белок SARS-CoV-2, после примирующей и бустерной вакцинации с разбивкой по возрастным группам и дозе вакцины, относящийся к примеру 16. Синие: реципиенты MenACWY, красные: реципиенты ChAdOx1 nCoV-19. Сплошные линии соединяют образцы от одного и того же участника. SFC: пятнообразующие клетки, PBMC: мононуклеарные клетки периферической крови. Прямоугольники показывают медианы и межквартильные диапазоны. LLD составляет 48 SFC/млн. (пунктирная линия). Образцы, взятые в день 42 от участников, которые получали бустерную дозу в день 28. Данные также показаны в таблице S2 как для групп с однократной дозой, так и для групп с двумя дозами с анализом числовых значений для каждого момента времени.

На фигуре 30 показаны графики ответа с участием IgG в отношении шиповидного белка и в отношении рецептор-связывающего домена SARS-CoV-2 в зависимости от возраста и дозы вакцины, измеренного с использованием мультиплексного иммунологического анализа (MIA), относящиеся к примеру 16. Верхние панели: группы с высокими дозами вакцины, нижние панели: группы с низкими дозами вакцины, RBD: рецептор-связывающий домен; шиповидный белок: шиповидный белок SARS-COV-2. Участники группы с бустерной иммунизацией получали свою вторую дозу в день 28

(пунктирная линия). На графике показаны медиана и межквартильный диапазон. Контрольные группы не показаны.

На фигуре 31 показаны графики титров нейтрализующих антител, измеренных с использованием анализа микронейтрализации живого вируса SARS-CoV-2 (PHE – MNA80) после примирующей и бустерной вакцинации в зависимости от возраста и дозы вакцины, относящиеся к примеру 16. Верхняя панель: группы с высокими дозами вакцины, нижняя панель: группы с низкой дозой вакцины, участники группы с бустерной иммунизацией получали вторую дозу в день 28. На графике показаны медиана и межквартильный диапазон. Контрольные группы не показаны. Чтобы нормализовать данные по сериям анализов, эталонный образец включали во все серии анализов, а тестовые образцы нормализовали по этому значению путем генерирования log10-коэффициентов. Пунктирные линии показывают верхний и нижний пределы анализа (значения вне этого диапазона задавали равными 640 и 5 соответственно).

На фигуре 32 показаны графики мультиплексного ответа с выработкой IgG, специфичного для SARS-CoV-2, согласно результатам мультиплексного иммуноанализа после иммунизации в режиме "прайм-буст", относящиеся к примеру 17.

На фигуре 33 показаны графики микронейтрализации живого SARS-CoV-2 после иммунизации в режиме "прайм-буст", относящиеся к примеру 17.

На фигуре 34 показаны графики ответов с выработкой изотипа иммуноглобулина, специфичного для шиповидного отростка SARS-CoV-2, индуцированных схемами введения ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "прайм-буст", относящиеся к примеру 17.

На фигуре 35 показаны графики ответов с выработкой подкласса IgG, специфичного для шиповидного отростка SARS-CoV-2, индуцированных схемами введения ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "прайм-буст", относящиеся к примеру 17.

На фигуре 36 показаны антителозависимый моноцитарный фагоцитоз (A) и нейтрофильный фагоцитоз (B), отложение комплемента (C) и активация естественных киллерных клеток (D) для участников испытаний, плазмы крови выздоравливающих и плазмы крови, полученной до пандемии, а также продольная Fc-зависимая функциональность антител для реципиентов вакцины ChAdOx1-nCoV19, выздоравливающих пациентов с COVID-19 и образцов, полученных до пандемии, относящиеся к примеру 17.

На фигуре 37 показаны графики ответа согласно ELISpot IFNγ в отношении пептидов, охватывающих предусматриваемую вакциной вставку, представленную шиповидным

отростком SARS-CoV-2, после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19, относящиеся к примеру 17.

На фигуре 38 показаны графики для нейтрализующего антитела, измеренного в псевдовирусном анализе (Monogram, IC50), относящиеся к примеру 17.

На фигуре 39 показана активация популяций лимфоцитов после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19, относящаяся к примеру 18.

На фигуре 40 показаны ответы с выработкой изотипа иммуноглобулина, индуцированные вакцинацией с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или MenACWY, относящиеся к примеру 18.

На фигуре 41 показаны ответы с выработкой подкласса IgG, индуцированные введением ChAdOx1 nCoV-19 в однократной дозе или согласно схеме в режиме "прайм-буст", относящиеся к примеру 18.

На фигуре 42 показаны: ответы согласно ELISPOT IFNγ в отношении пулов 15-мерных пептидов, покрывающих последовательность, предусматриваемую вакциной ChAdOx1-nCOV19, относящиеся к примеру 18.

На фигуре 43 показано кратное изменение SFC для каждого пула пептидов для каждого участника, вакцинированного с помощью ChAdOx1, за период от исходного уровня (D0) до D14 после вакцинации, относящееся к примеру 18.

На фигуре 44 показаны ответы с участием Т-клеток в отношении пептидов, относящихся к шиповидному отростку SARS-CoV-2, измеренные с помощью проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием цитокинов, относящиеся к примеру 18.

На **фигуре 45** показаны результаты для Cryo-ET и усредненной субтомограммы шиповидного отростка, полученного из ChAdOx1 nCoV-19. (A) Томографический срез клетки U2OS, трансдуцированной ChAdOx1 nCoV-19. Срез имеет толщину 6,4 Å; PM = плазматическая мембрана, масштабный отрезок = 100 нм. **(B)** Подробный вид области, заключенной в рамку, отмеченной на **(A)**. Белые стрелки указывают на шиповидные белки на клеточной поверхности; масштабный отрезок = 50 нм. **(C-E)** усредненная субтомограмма при толщине 9,6 Å для шиповидного отростка, полученного из ChAdOx1 nCoV-19, показанного при виде сбоку **(C)**, виде сверху **(D)** и в поперечном разрезе **(E)**. Атомная модель S-белка SARS-CoV-2 (ID PDB: 6VXX) была аппроксимирована в качестве справочной информации.

На **фигуре 46** показан сайт-специфический процессинг гликанов S-белка SARS-CoV-2 при инфицировании ChAdOx1 nCoV-19. **(A)** Вестерн-блот-анализ шиповидных белков SARS-CoV-2 с использованием антител к S1 и к S1+S2. Дорожка 1 = белковый осадок из

лизатов клеток 293F, инфицированных ChAdOx1 nCoV-19. Дорожка 2 = осадок восстановленного белка из 293F, инфицированных ChAdOx1 nCoV-19**.** Дорожка 3 = 2P-стабилизированный S-белок SARS-CoV-2. Белые прямоугольники соответствуют полосам геля, которые вырезали для масс-спектрометрического анализа. **(B)** Сайт-специфическое N-гликозилирование гликопротеинов S0 и S1/S2 SARS-CoV-2. Анализ LC-MS. Гистограммы представляют относительное количество расщепленных гликопептидов, обладающих идентификаторами гликанов олигоманнозного/гибридного типа (зеленые), гликанов сложного типа (розовые) и незанятых PNG (серые) при каждом сиквоне N-связанного гликана в S-белке, перечисленных от N- к C-концу. **(C)** Гликозилированная модель расщепленного (S1/S2) шиповидного отростка SARS-CoV-2. Круговые диаграммы обобщают результаты количественного масс-спектрометрического анализа олигоманнозных/гибридных (зеленые), сложных (розовые) или незанятых сайтов (серые) популяций N-связанных гликанов. Репрезентативные гликаны смоделированы на основе структуры тримерного S-гликопротеина SARS-CoV-2 в конформации до слияния (идентификатор PDB: 6VSB) с одним RBD, представленным в конформации "вверх". Смоделированные гликаны окрашены в соответствии с содержанием олигоманнозных/гибридных гликанов, при этом сайты гликанов помечены зеленым (80-100%), оранжевым (30-79%), розовым (0-29%) или серым (не выявлено).

На **фигуре 47** показано, что стратегия с использованием режима "прайм-буст" усиливает ответ с участием CD8 Т-клеток в отношении ChAdOx1 nCoV-19 у пожилых мышей. **a**. Графическое изображение стратегии примирующей иммунизации. Процентное значение $CD8^+$ Т-клеток, представленных $Ki67^+$ Т-клетками (**b**), $CXCR3^+$ Т-клетками (**c**), эффекторными $CD44^+CD62L^-$ Т-клетками памяти (**d**) и $CD44^+CD62L^+$ Т-клетками центральной памяти (**e**), в дренирующем аортальном лимфатическом узле у 3-месячных (3 мес.) или 22-месячных (22 мес.) мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. **f**. Процентное значение пролиферирующих селезеночных $Ki67^+$ $CD8^+$ Т-клеток у 3-месячных (3 мес.) или 22-месячных (22 мес.) мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. **g-h**. Число $CD8^+$ клеток, вырабатывающих гранзим B (GZMB), IFNγ, IL-2 или TNFα, через шесть часов после повторной стимуляции пулами пептидов SARS-CoV-2 на (g) и число CD8 Т-клеток с одиночным или двойным продуцированием цитокинов представлены на составных столбиковых диаграммах. Клетки селезенки брали у 3-месячных (3 мес.) или 22-месячных (22 мес.) мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. **i**. Графическое изображение стратегии иммунизации в режиме "прайм-буст".

Процентное значение $CD8^+$ Т-клеток, представленных $Ki67^+$ Т-клетками (**j**), $CXCR3^+$ Т-клетками (**k**), эффекторными $CD44^+CD62L^-$ Т-клетками памяти (**l**) и $CD44^+CD62L^+$ Т-клетками центральной памяти (**m**), в дренирующем аортальном лимфатическом узле из 3-месячных или 22-месячных мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. **n.** Процентное значение пролиферирующих селезеночных CD8+ $Ki67^+$ Т-клеток у 3-месячных или 22-месячных мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. Число $CD8^+$ клеток, вырабатывающих гранзим B (**n**) или IFNγ (**o**), через шесть часов после повторной стимуляции пулами пептидов SARS-CoV-2 на (**p**) и число CD8 Т-клеток с одиночным или двойным продуцированием цитокинов представлены на составных столбиковых диаграммах. Клетки селезенки брали у 3-месячных или 22-месячных мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. Высота столбца на **b-g, j-o** соответствует медиане, и каждая окружность представляет одну биологическую повторность. На **h**, **p** каждый сегмент столбца представляет собой среднее значение, а планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. Для определения того, согласуются ли данные с нормальным распределением, использовался критерий нормальности Шапиро-Уилка, за которым следовал либо обычный односторонний анализ ANOVA для данных с нормальным распределением, либо критерий Крускала-Уоллиса для данных с отличным от нормального распределением, наряду с критерием множественного сравнения. Данные являются репрезентативными для двух независимых экспериментов (n=4-8 на группу/эксперимент).

На **фигуре 48** показан ответ с участием CD4 Т-клеток в отношении ChAdOx1 nCoV-19 у пожилых мышей. **a**. Графическое изображение стратегии примирующей иммунизации. Процентное значение пролиферирующих $Ki67^+$ (**b**), $CXCR3^+CD44^+$ (**c**) CD4 Т-клеток и $CXCR3^+CD44^+Foxp3^+$ Treg-клеток (**d**) в дренирующем аортальном лимфатическом узле. Процентное значение пролиферирующих $Ki67^+$ (**e**), $CXCR3^+CD44^+$ CD4 Т-клеток (**f**) и $CXCR3^+CD44^+Foxp3^+$ Treg-клеток (**g**) в селезенке 3-месячных или 22-месячных мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. **h, i.** Число $CD4^+Foxp3^-$ клеток, вырабатывающих IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 или TNFα, через шесть часов после повторной стимуляции пулами пептидов SARS-CoV-2 на (**i**) и число CD4 Т-клеток с одиночным или множественным продуцированием цитокинов представлены на составных столбиковых диаграммах. **j**. Графическое изображение стратегии иммунизации в режиме "прайм-буст". Процентное значение пролиферирующих $Ki67^+$ (**k**), $CXCR3^+CD44^+$ CD4 Т-клеток (**l**) и $CXCR3^+CD44^+Foxp3^+$ Treg-клеток (**m**) в дренирующем

аортальном лимфатическом узле. Процентное значение $Ki67^+$ $CD44^+$ (**n**), $CXCR3^+CD44^+$ $CD4^+Foxp3^-$ Т-клеток (**o**) и $CXCR3^+CD44^+Foxp3^+$ Treg-клеток (**p**) в селезенке 3-месячных или 22-месячных мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. **q, r.** Число $CD4^+Foxp3^-$ клеток, вырабатывающих IFNγ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 или TNFα, через шесть часов после повторной стимуляции пулами пептидов SARS-CoV-2 на (**r**) и число CD4 Т-клеток с одиночным или множественным продуцированием цитокинов представлены на составных столбиковых диаграммах. Высота столбца соответствует медиане, и каждая окружность представляет одну биологическую повторность. На **i**, **r** каждый сегмент столбца представляет собой среднее значение, а планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. Для определения того, согласуются ли данные с нормальным распределением, использовался критерий нормальности Шапиро-Уилка, за которым следовал либо обычный односторонний анализ ANOVA для данных с нормальным распределением, либо критерий Крускала-Уоллиса для данных с отличным от нормального распределением, наряду с критерием множественного сравнения. Данные являются репрезентативными для двух независимых экспериментов (n=4-8 на группу/эксперимент).

На **фигуре 49** показаны нарушенные В-клеточные ответы после иммунизации пожилых мышей с помощью ChAdOx1 nCoV-19. Представлен В-клеточный ответ у 3-месячных (3 мес.) или 22-месячных (22 мес.) мышей через девять дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS. Оценка посредством проточной цитометрии процентного значения (**a**) и числа (**b**) плазматических клеток в аортальном лимфатическом узле. **c**. Круговые диаграммы, показывающие долю IgM^+IgD^- (оранжевые) и переключенных IgM^- IgD^- (синие) плазматических клеток из b, c. Сывороточные антитела классов IgM (**d**) и IgG (**e**) к шиповидному отростку через девять дней после иммунизации. **f**. Круговые диаграммы, показывающие долю антител к шиповидному отростку класса IgG, относящихся к указанным подклассам, в сыворотке крови через девять дней после иммунизации. Процентное значение (**g**) и число (**h**) В-клеток зародышевого центра в аортальном лимфатическом узле. **i**. Круговые диаграммы, показывающие долю IgM^+IgD^- (оранжевые) и переключенных IgM^-IgD^- (синие) клеток зародышевого центра из g, h. Число фолликулярных хелперных Т-клеток (**j**) и фолликулярных регуляторных Т-клеток (**k**) в дренирующем лимфатическом узле. Конфокальные изображения селезенки мышей, иммунизированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19, указанных возрастов, при этом на (**l**) масштабные отрезки представляют 500 мкм, на (**m**) масштабные отрезки представляют 50 мкм. IgD^+ фолликулярные В-клетки отмечены зеленым, $CD3^+$ Т-клетки отмечены

пурпурным, $Ki67^+$ клетки отмечены синим, и $CD35^+$ фолликулярные дендритные клетки отмечены белым. Процентное значение (**n**) и число (**o**) селезеночных B-клеток зародышевого центра. **p**. Процентное значение $Ki67^+$ B-клеток в селезенке. Число селезеночных фолликулярных хелперных T-клеток (**q**) и фолликулярных регуляторных T-клеток (**r**). Сывороточные антитела к шиповидному отростку классов IgM (**e**) и IgG (**f**) и подклассов IgG (**u**) через 28 дней после иммунизации. Высота столбца соответствует медиане, и каждая окружность представляет одну биологическую повторность. Для определения того, согласуются ли данные с нормальным распределением, использовался критерий нормальности Шапиро-Уилка, за которым следовал либо обычный односторонний анализ ANOVA для данных с нормальным распределением, либо критерий Крускала-Уоллиса для данных с отличным от нормального распределением, наряду с критерием множественного сравнения. Данные являются репрезентативными для двух независимых экспериментов (n=4-8 на группу/эксперимент).

На **фигуре 50** показано, что бустерная иммунизация усиливает B-клеточный ответ в отношении иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 у пожилых мышей. **a**. Схема протокола иммунизации в режиме "прайм-буст". **b**. Процентное значение $Ki67^+$ B-клеток в дренирующем лимфатическом узле. Процентное значение (**c**) и число (**d**) плазматических клеток в аортальном лимфатическом узле. **e**. Круговые диаграммы, показывающие долю IgM^+IgD^- (оранжевые) и переключенных IgM^-IgD^- (синие) плазматических клеток из b, c. Процентное значение (**f**) и число (**g**) B-клеток зародышевого центра в аортальном лимфатическом узле. **h**. Круговые диаграммы, показывающие долю IgM^+IgD^- (оранжевые) и переключенных IgM^-IgD^- (синие) клеток зародышевого центра из g, h. Число фолликулярных хелперных T-клеток (**i**) и фолликулярных регуляторных T-клеток (**j**) в дренирующем лимфатическом узле. Процентное значение (**k**) селезеночных B-клеток зародышевого центра. Сывороточные антитела к шиповидному отростку классов IgM (**l**), IgG (**m**) и подклассов IgG (**n, o**) перед бустерной иммунизацией (день 29) и через девять дней после бустерной иммунизации. **p-q** Титры нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови определяли с помощью теста на микронейтрализацию, результаты которого выражены в виде обратной величины разбавления сыворотки крови, обеспечивающей подавление проникновения псевдовируса на 50% (IC_{50}). Образцы, находящиеся ниже нижнего предела выявления (LLoD), представлены в виде половины LLoD. Высота столбца соответствует медиане, и каждая окружность представляет одну биологическую повторность. Для определения того, согласуются ли данные с нормальным распределением, использовался критерий нормальности Шапиро-Уилка, за которым

следовал либо обычный односторонний анализ ANOVA для данных с нормальным распределением, либо критерий Крускала-Уоллиса для данных с отличным от нормального распределением, наряду с критерием множественного сравнения. На b-o показаны данные для одного из двух независимых экспериментов (n=4-8 на группу/эксперимент), на p и q данные для двух экспериментов объединены.

На фигуре 51 показаны столбчатые диаграммы.

На фигуре 52 показаны столбчатые диаграммы.

На фигуре 53 показаны столбчатые диаграммы.

На фигуре 54 показаны столбчатые диаграммы.

На фигуре 55 показаны графики Каплана-Мейера.

ПРИМЕРЫ

Конечная точка разработки вакцины/краткое описание

- Была создана вакцина на основе ChAdOx1 SARS-CoV2 для доклинических исследований.
- Доклиническое тестирование включало первоначальные исследования иммуногенности у мышей с последующими исследованиями эффективности у хорьков и NHP.
- Был создан исходный посевной материал для вакцины, пригодный для изготовления согласно cGMP.
- Партия для фазы I/II, состоящая из 1000 доз вакцины, была изготовлена согласно cGMP и предоставлена для клинических испытаний.
- Было получено одобрение этического комитета и регуляторных органов для проведения испытания в Великобритании.
- Было проведено исследование фазы I/II, предоставляющее данные относительно безопасности и иммуногенности у взрослых, пожилых людей и детей.
- Было начато крупномасштабное изготовление вакцины (200 л, около 20000 доз на партию).

Общий обзор

В этих примерах авторы настоящего изобретения:

1. Продемонстрировали эффективность вакцины на основе ChAdOx1 nCoV на моделях заражения хорьков и приматов, отличных от человека

2. Получили 1000 доз ChAdOx1 SARS-CoV2, готовых к использованию в клинических исследованиях

3. Провели клиническое испытание ChAdOx1 SARS-CoV2 у взрослых в возрасте 18-50 лет с последующим его распространением на взрослых старше 50 лет и детей школьного возраста.

4. Определили характеристики иммунного ответа в отношении шиповидного белка SARS-CoV2 у добровольцев, проходящих клинические испытания.

Данная вакцина против SARS-CoV2 использовалась для демонстрации результатов клинической разработки и доклинических исследований эффективности. Другие вакцинные технологии, такие как рекомбинантный белок, ДНК- и РНК-вакцины, находятся в стадии разработки, но требуют многократных доз для достижения измеримых иммунных ответов на вакцинный антиген. Основываясь на уже имеющихся доклинических данных, авторы настоящего изобретения утверждают, что вакцины по настоящему изобретению, наиболее предпочтительно ChAdOx1-nCoV, как описано в данном документе, способны индуцировать защитный иммунитет после однократной дозы и в течение 14 дней после (предпочтительно первой и единственной) вакцинации.

Пример 1

Для получения ChAdOx1 SARS-CoV2 выполняли подготовку исходного посевного материала для вакцины.

Начинали разработку способа быстрого создания исходного посевного материала для вакцины с целью обеспечения быстрого ответа на ситуацию при вспышке заболевания. В чрезвычайных ситуациях работу ускоряют, чтобы обеспечить быстрое получение исходного посевного материала для вакцины на основе ChAdOx1 SARS-CoV2 параллельно с материалом исследовательского качества для доклинического тестирования. Важным компонентом "быстрого способа" является принятие протоколов быстрого тестирования вакцины для обеспечения ее выпуска, чтобы сократить время тестирования вакцины для обеспечения ее выпуска с 5 месяцев до 1 месяца. Общие планы уже получили положительный отзыв от MHRA.

Ведутся дальнейшие обсуждения с MHRA касательно спецификации продукта, которая будет использоваться для ChAdOx1 SARS-CoV2.

Предпочтительно быстрое одобрение этического комитета и регуляторных органов для проведения испытаний в Великобритании может быть организовано в течение нескольких дней после подачи заявления на выдачу разрешения на проведение клинических испытаний (CTA).

Затем изготовление передается производителям, соответствующим требованиям GMP.

Предпочтительно один производитель (Advent) получает материал (первоначально 1000 доз) для фазы I/II исследования, проводимого в Великобритании, с тестированием вакцины у взрослых, а затем распространяя ее на пожилых людей и детей, используя однократную дозу на уровне, определенном более ранними исследованиями вакцины на основе ChAd.

Предпочтительно один производитель (CanSino) осуществляет изготовление в Китае в масштабе 200 л, по 20000 доз на партию. Дальнейшие исследования для определения эффективности вакцины и обеспечения лицензирования вакцины будут проводиться в зависимости от клинической необходимости, например возникновения случая(-ев) эпидемии. При необходимости получение может быть дополнительно оптимизировано, а мощность увеличена, чтобы увеличить как выход на партию, так и число партий, которые можно получать одновременно. Уже доступны высокопроизводительные линии наполнения с лиофилизацией или без нее.

Проводятся доклинические исследования для тестирования иммуногенности и эффективности вакцины на модели приматов, отличных от человека. Предпочтительно это осуществляется в NIH.

Предпочтительно проводится дополнительная работа над коррелятами защиты в данной модели.

Пример 2

Авторы настоящего изобретения получили вакцину на основе вектора ChAdOx1 против nCoV-2019.

Авторами настоящего изобретения излагается полное изготовление первой партии согласно GMP для клинических исследований.

Две организации, NIH и CSIRO, проводят исследования эффективности на животных, чтобы продемонстрировать эффективность вакцины после однократной дозы как у приматов, так и у хорьков.

Хорьков (или в отдельном эксперименте приматов, отличных от человека) вакцинировали либо одной дозой ChAdOx1 nCV-19, либо двумя дозами, предоставляемыми с интервалами в 4 недели. Контрольных животных вакцинировали либо двумя дозами, либо двумя дозами контрольной вакцины на основе ChAdOx1, экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP). Через 4 недели после последней вакцинации животных подвергали заражению живым вирусом SARS-CoV2 через респираторный тракт.

Осуществляли мониторинг животных на наличие клинических признаков и образцы из респираторного тракта отбирали ежедневно для определения распространенности вируса, при этом важно отметить, что данные анализы проводили либо через 9, либо через 10 дней после вакцинации, в то время как обычным является анализирование ответов с участием Т-клеток через 14 дней, а с выработкой антител через 28 дней. Это были исключительно сильные ответы для такого раннего момента времени в рамках анализа. Это имеет особое значение для вакцины, подлежащей использованию против патогена, ответственного за вспышку заболевания, в случае которого быстрое формирование иммунитета было бы крайне полезным.

Авторами настоящего изобретения раскрывается клиническое испытание фазы I/II с адаптивным дизайном, который обеспечивает возможность добавлять дополнительные группы после демонстрации безопасности и иммуногенности в рамках компонента исследования, предусматривающего впервые осуществляемое включение в исследование людей. Параллельно с этим производителю с возможностью осуществления крупномасштабного изготовления и проверенным опытом изготовления векторов на основе аденовирусов согласно cGMP предоставляется исходный посевной материал для вакцины, чтобы обеспечить поставку большого числа доз для тестирования эффективности и развертывания.

Описанное в данном документе испытание фазы I/II может проводиться в Великобритании. Это обеспечивает получение данных относительно безопасности и иммуногенности для взрослых, пожилых людей (которые подвергаются наибольшему риску заболеваемости и смертности) и детей (которые могут быть ответственны за многие случаи передачи любого респираторного патогена).

Следующие стадии клинической разработки зависят от прогрессирования конкретной вспышки заболевания, а полученные данные обеспечивают возможность проводить дальнейшие исследования.

Пример 3

Порядок мероприятий для доклинических исследований был следующим: сначала продемонстрировать иммуногенность у мышей (ответы с выработкой антител и участием Т-клеток), а затем приступить к тестированию эффективности вакцины у приматов, отличных от человека (в сотрудничестве с NIH) и тестированию эффективности вакцины у хорьков (в сотрудничестве с CSIRO). CEPI уже осуществляет финансирование CSIRO с целью создания модели на основе хорьков для 2019-nCoV (PI: проф. S.S. Vasan).

Авторы настоящего изобретения сообщают, что вакцина обеспечивает защиту после однократной дозы, и данные, демонстрирующие это, получены, как указано выше.

Исследование эффективности с использованием 6-8 хорьков параллельно с исследованием естественного прогрессирования (запланированная дата заражения 23 марта) находилось в процессе осуществления.

Клинический диапазон доз был установлен в других исследованиях. В рамках компонента исследования, предусматривающего впервые осуществляемое включение в исследование людей, авторы настоящего изобретения сначала тестировали две разные дозы. Учитывая клинический опыт применения вакцин на основе вектора ChAdOx1, токсикологическое исследование может не потребоваться для исследования, проводимого в Великобритании. Однако токсикологическое исследование проводилось так же, как и для других вакцин на основе вектора ChAdOx1 (проводилось, даже если оно не требовалось), поскольку данные считались ценными для инициирования исследований в других странах.

Анализ активности хорошо зарекомендовал себя и является мерой концентрации вакцины, и при этом не требовал каких-либо иммунологических исследований. Ниже приведен протокол определения инфекционности аденовируса, который является применимым в качестве анализа активности вакцин на основе аденовирусного вектора:

1.0 Номер протокола лаборатории Jenner J259

2.0 Версия номер 9

3.0 Иммуноанализ с определением титра аденовирусов

4.0 Примечания:

Данный способ отличается от его предыдущей версии тем, что в нем измеряют 4 вируса в трех повторностях в каждом планшете. Для каждого планшета требуется один препарат всех четырех вирусов, вносимый с использованием 12-канальной мультипипетки.

Этот анализ очень чувствителен к потере клеток из монослоев во время осуществления протокола иммуноокрашивания. Он также оказывался чувствительным к краевому эффекту как во время культивирования клеток, так и при окрашивании. В частности:

клетки HEK293 являются только слабоадгезивными. Использовались покрытые планшеты, чтобы попытаться решить эту проблему, однако монослои все еще являются относительно хрупкиими.

Следует соблюдать осторожность при пипетировании на протяжении всей процедуры осуществления протокола (культивирование клеток и окрашивание).

Краевой эффект при культивировании клеток

Испарение из краевых лунок и особенно из угловых лунок может отрицательно повлиять на здоровое состояние клеток в этих лунках (см. примечание в приложении).

Если объем слишком мал, то образующийся мениск может как концентрировать не подвергшиеся адгезии клетки у краев, так и оставлять эти клетки в центре лунок с недостаточным покрытием их средами.

Использовали квадратные коробки Nunc с влажной промокательной бумагой, чтобы обеспечить постоянную атмосферу с высокой влажностью. Планшеты, помещенные рядом с дверью инкубатора и/или часто извлекаемые для наблюдения, будут подвергаться перепадам влажности и повышенному испарению.

Краевой эффект во время окрашивания

Когда планшеты перемещают между местоположениями с разными значениями температур, края будут изменять температуру гораздо быстрее, чем центральные лунки. Важно, чтобы весь планшет достигал одинаковой температуры на каждой стадии.

Следует избегать штабелирования планшетов, так как температуры центральных планшетов будут сильно отличаться от температур внешних планшетов.

Следует убедиться, чтобы значения времени инкубации были достаточно большими, чтобы довести температуру планшета до однородной температуры.

Другие документы

MSDS для получения соответствующей информации относительно безопасности отдельных реагентов следует обратиться к MSDS:

\\Imsnw3_jenner_server\jenner\hill_group\Safety\COSHH assessments\Manufacturers material safety data sheets

R002 Аденовирус

\\Imsnw3_jenner_server\jenner\hill_group\Safety\GMO RA\R002 adenovirus.doc

R004 Приложение GMO RA

C030 Культура первичных клеток и клеточных линий, включая замораживание и восстановление

C024 Применение пенициллина для культивирования тканей сенсибилизированными лицами

C066 Применение антибиотиков для отбора клеток

J011 Пассирование клеток 293

При мытье 96-луночных планшетов в ходе окрашивания необходимо надевать защитные очки или накладные очки. Существует риск попадания брызг в глаза при стряхивании жидкости с планшетов в раковину.

5.0 Определения

FCS	фетальная телячья сыворотка
DMEM	среды Игла, модифицированные по Дульбекко
PBS	забуференный фосфатом физиологический раствор
TBS	забуференный Tris физиологический раствор
к. т.	комнатная температура

6.0 Цель

Рассчитать инфекционный титр вируса путем визуализации иммуноокрашенных инфицированных клеток.

7.0 Реагенты

DMEM: Sigma D6546

DMEM: Lonza/ SLS LZBE12-604F

Пениц./стреп.: Sigma

Глютамин: Sigma

FCS: Sigma F2442

Краситель трипановый синий: Sigma T8154

TrypLE Express: Invitrogen I2605

Черный/прозрачный 96-луночный планшет BD PureCoat Amine: VWR 734-1476

Метанол: Sigma 32213

Таблетки PBS: Sigma P4410-100TAB

Порошок забуференного фосфатом Дульбекко физиологического раствора (10 л): Invitrogen 21600-069

Bloxall: Vector labs SP-6000

1000x первичное антитело (1 мг/мл), 500 мкл: AbCam ab7428

(планшеты на 235/500 фунтов стерлингов) – 47 фунтов за планшет

10000x антитело к IgG мыши (целая молекула), конъюгированное со щелочной фосфатазой, выработанное в организме козы: Sigma A3562

(планшеты на 63/500 фунтов стерлингов) – 13 фунтов за планшет

TBS: Sigma T5912-1L

Раствор BCIP/NBT(Plus): Europa Bioproducts Ltd MO711A-1000

Готовый раствор 1% казеина: ThermoScientific 37528

(94 фунта стерлингов/литр) -

Оборудование

Бокс биологической безопасности II класса: BioSafety Cabinet Scanlaf Mars

Инкубатор с CO_2: RS Biotech Galaxy R

Водяная баня на 37°C: Grant SUB6

Микроскоп: Leica DMIL

Гемоцитометр Нойбауэра

Черный/прозрачный 96-луночный планшет BD PureCoat Amine: VWR 734-1476

(5,60 фунта стерлингов за планшет)

96-луночный планшет для тканевых культур с V-образными лунками: Greiner Bio-one 651201

Аспиратор

Встряхиватель

8-луночная многоканальная пипетка, 2 x p200

Пипетка, p1000

Пипетка, p10

Квадратная коробка Nunc

Фильтровальная бумага: ThermoScientific 86620

8.0 Способ

Получение реагентов

Полная DMEM с 10% FCS + бластицидин

500 мл DMEM

50 мл FCS (конечная конц. 10%)

5 мл пениц./стреп. (100 ЕД пенициллина, 0,1 мг стреп. с конечной конц. $мл^{-1}$)

10 мл L-глютамина (конечная конц. 4 мМ)

250 мкл бластицидина (конечная конц. 5 мкг/мл)

День 0 96-луночные планшеты должны быть засеяны клетками TREX, взятыми из колбы T175, выращенными до достижения 50%-60% конфлюентности.

День 1

9.1. Посев клеток – вирусы обычно титруют на клетках HEK293-TRex, независимо от клеточной линии, используемой для получения. Получают достаточное

количество планшетов для каждого запроса со значениями плотности, указанными ниже.

9.1.1. Клетки следует подсчитывать с помощью стеклянного гемоцитометра.

9.1.2. Предварительно нагревают коробку Nunc, содержащую промокательную бумагу, смоченную водой/Sigmaclean, и планшеты.

9.1.3. 100 мкл клеток высевают на лунку – (5×10^6 леток в 12 мл на планшет).

9.1.4. Планшеты помещают в квадратную коробку Nunc, подложив под них некоторое количество влажной промокательной бумаги, чтобы обеспечить постоянную среду с высокой влажностью.

9.1.5. Планшеты инкубируют в течение ночи в инкубаторе при 37°C, 5% CO_2.

9.1.6. Удаляют аликвоту 10% DMEM (10 мл на вирус плюс 10 мл для контроля), чтобы уравновесить до комнатной температуры в течение ночи.

День 2

Перед началом любой работы следует убедиться, что клетки в 96 луночных планшетах достигли 100% конфлюентности. Они должны характеризоваться 100% конфлюентностью, чтобы захватить все вирусные частицы в образце. Планшеты можно оставлять до полудня, но нельзя оставлять на дополнительный день.

9.2. Получение серийных разбавлений вируса.

9.2.1. Предварительно нагревают коробку Nunc, содержащую смоченную промокательную бумагу, в вирусологической лаборатории.

9.2.2. Извлекают одну аликвоту объемом 10 мкл очищенного вируса из морозильной камеры с температурой -80°C и размораживают при к. т.

9.2.3. Добавляют не более 100 мкл с 90 мкл D10 + бластицидин.

9.2.4. Заворачивают крышку в случае каждой аликвоты вируса парафильмом.

9.2.5. Обрабатывают каждую аликвоту ультразвуком в течение 30 секунд при 50% мощности.

9.2.6. Убеждаются, что используется правильная техника пипетирования, как описано в J212, чтобы гарантировать получение данных максимально возможного качества.

9.2.7. Переносят 20 мл среды (10% FBS, DMEM + бластицидин) в резервуар для реагентов.

9.2.8. Встряхивают аликвоты вируса, чтобы тщательно ресуспендировать вирус, а затем сильным щелчком вызывают перемещение материала к основанию пробирки.

9.2.9. Для данного способа получают разбавления, используя два планшета с V-образными лунками, ориентированные 12 лунками вертикально.

9.2.10. Отбирают 20 мкл образца из исходной пробирки и добавляют в первую колонку 96-луночного планшета с V-образными лунками.

9.2.11. Повторяют стадии 9.2.7 и 9.2.8 для остальных вирусов, чтобы добавить их в планшет.

9.2.12. С использованием многоканальной пипетки добавляют в лунки по 180 мкл сред.

9.2.13. Используя свежие наконечники на многоканальной пипетке p200, медленно измельчают образцы десять раз, чтобы избежать пенообразования.

9.2.14. Используют многоканальную пипетку для переноса 20 мкл первого разбавления во вторую колонку лунок.

9.2.15. Продолжают получать серию разбавлений, как показано в таблице ниже. Следует обратить внимание, что добавляемые объемы изменяются в середине таблицы.

	Исходный раствор вирусов	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	$3,3 x10^{-7}$	$1,1 x10^{-7}$	$3,7 x10^{-8}$	$1,2 x10^{-8}$	$4,1 x10^{-9}$
Вирус (мкл)	Исходный	20	20	20	20	20	75	75	75	75	75
10% DMEM (мкл)	-	180	180	180	180	180	150	150	150	150	150
		Планшет 1					Планшет 2				

9.3 Получение серийных разбавлений контрольного вируса

9.3.1. Извлекают одну аликвоту объемом 10 мкл контрольного вируса из морозильной камеры с температурой -80°C и размораживают при к. т.

9.3.2. Убеждаются, что используется правильная техника пипетирования, как описано в J212, чтобы гарантировать получение данных максимально возможного качества.

9.3.3. Встряхивают аликвоты вируса, чтобы тщательно ресуспендировать вирус, а затем сильным щелчком вызывают перемещение материала к основанию пробирки.

9.3.4. Подготавливают 4 криофлакона, помеченные как -2, -4, -6, -8.

9.3.5. Отбирают 5 мкл образца из исходной пробирки и добавляют в первый криофлакон объемом 2 мл.

9.3.6. Добавляют 495 мкл среды в криофлакон.

9.3.7. Используя свежий наконечник, медленно измельчают образцы десять раз, чтобы избежать пенообразования.

9.3.8. Переносят 5 мклпервого разбавления во второй криофлакон.

9.3.9. Продолжают получать серию разбавлений, как показано в таблице ниже.

	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}
Вирус (мкл)	5	5	5	5
10% DMEM (мкл)	495	495	495	495

9.4. Инфицирование клеток с помощью серийных разбавлений вируса

9

9.3

9.4.1. Используя многоканальную аспирационную пипетку, аспирируют среду из половины 96-луночного планшета, полученную в предыдущий день, при этом следует соблюдать осторожность, чтобы не повредить монослой клеток кончиками пипетки. Необходимо прикасаться к основаниям лунок, но быть максимально осторожными.

9.4.2. Осторожно, чтобы не повредить клеточный слой, добавляют по 50 мкл каждого из вышеперечисленных разбавлений (обозначены красным

шрифтом) на лунку, осуществляя внесение на боковую стенку лунки.

9.4.3. Добавляют по 50 мкл среды в лунки отрицательного контроля.

9.4.4. Планшеты помещают в квадратный лоток Nunc с влажной промокательной бумагой в основании, чтобы обеспечить постоянную среду с высокой влажностью.

9.4.5. Планшеты инкубируют в течение 24 часов при 37°C, 5% CO_2.

День 3

9.5. Добавление среды в лунки для обеспечения здорового состояния клеток, при этом выполнение данной работы должно начинаться ровно через 24 часа после инфицирования вирусом.

9.5.1. Предварительно нагревают среду до 37°C.

9.5.2. Используя многоканальную пипетку, добавляют по 50 мкл 10% DMEM + бластицидин в каждую лунку

планшетов.

9.5.3. Планшеты инкубируют в течение ночи в инкубаторе при 37°C, 5% CO_2.

9.5.4. Помещают метанол в морозильную камеру при температуре -20°C для использования в день 4.

День 4

9.4. Фиксация клеток, при этом выполнение данной работы должно начинаться ровно через 48 часов после инфицирования вирусом.

9.4.1. Проверяют лунки положительного контроля на наличие экспрессии GFP и лунки подсчитывают с помощью флуоресцентного микроскопа.

9.4.2. Используя многоканальный аспиратор, аспирируют среду из 96-луночного планшета, по одному планшету за один раз.

9.4.3. Соблюдают осторожность, чтобы не повредить клеточный монослой пипеткой.

9.4.4. Очень осторожно, используя многоканальную пипетку, добавляют 100 мкл предварительно охлажденного метанола во все лунки.

9.4.5. Планшеты инкубируют при -20°C в вирусологической лаборатории в течение минимум 20 минут.

ПРИМЕЧАНИЕ: осуществление протокола можно останавливать, а планшеты хранить при -20°C до тех пор, пока они не потребуются.

9.5. Иммуноокрашивание – на стадиях промывки надевают защитные очки/накладные очки.

9.5.1. Извлекают планшеты, выдерживаемые при -20°C, и их инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут (без штабелирования).

9.5.2. Получают 1x забуференный Tris физиологический раствор в 1-литровой бутылке Duran путем разбавления 100 мл 10x раствора до 1 л водой с сопротивлением 15 МОм.

9.5.3. Получают 3% Marvel в TBS: взвешивают 1,2 г Marvel в пробирке Falcon объемом 50 мл, доводят до не более 40 мл с помощью **TBS** и оставляют при к. т.

9.5.4. Промывают планшеты 4 раза с помощью D-PBS при к. т. (погружают планшеты в D-PBS в сэндвич-боксе и стряхивают содержимое в раковину, промакивают синим валиком. Промывают и стряхивают еще 3 раза. Наконец, промакивают синим валиком, чтобы убедиться, что весь PBS удален).

9.5.5. Вносят пипеткой 12 мл раствора bloxall из флакона в резервуар для реагентов. Добавляют по 100 мкл реагента в каждую лунку с использованием многоканального репитера. Блокируют в течение 30 минут при к. т.* – планшеты не штабелируют.

9.5.6. Удаляют Bloxall стряхиванием в раковину.

9.5.7. Промывают планшеты 4 раза с помощью D-PBS при к. т. (погружают планшеты в D-PBS в сэндвич-боксе и стряхивают содержимое в раковину, промакивают

синим валиком. Промывают и стряхивают еще 3 раза. Наконец, промакивают синим валиком, чтобы убедиться, что весь PBS удален).

9.5.8. Вносят пипеткой 25 мл раствора казеина в PBS в резервуар для реагентов. Добавляют по 200 мкл реагента в каждую лунку и блокируют в течение 15 мин при к. т.

9.5.9. Разбавляют первичное антитело 1:1000 в 1% растворе казеина (12 мклв 12 мл на планшет).

9.5.10. Удаляют казеин стряхиванием в раковину (на данной стадии промывание не требуется), промакивают синим валиком, чтобы убедиться, что весь раствор казеина удален из лунок (*любой остаточный казеин разбавит первичное антитело, добавленное на следующей стадии*).

9.5.11. Добавляют по 100 мкл 1х раствора антитела к гексону в каждую лунку с использованием многоканальной пипетки-дозатора BIOHIT e1200 и наконечников с фильтром BIOHIT.

9.5.12. Инкубируют в течение периода от 30 мин до 1 часа при комнатной температуре – планшеты не штабелируют.

9.5.13. Удаляют BCIP/NBT (12 мл на планшет) в пробирку объемом 50 мл. Отфильтровывают содержимое в свежую пробирку объемом 50 мл с использованием шприца на 50 мл и фильтра на 0,45 мкм и обеспечивают нагревание до к. т. (защищают от света с использованием фольги).

9.5.14. Разбавляют вторичное антитело 1:1000 в 3% Marvel в TBS (12 мкл в 12 мл на планшет).

9.5.15. Промывают планшеты 4 раза с помощью D-PBS при к. т. (погружают планшеты в TBS в сэндвич-боксе и стряхивают содержимое в раковину, промакивают синим валиком. Промывают и стряхивают еще 3 раза. Наконец, промакивают синим валиком, чтобы убедиться, что весь PBS удален).

9.5.16. Добавляют по 100 мкл 1х раствора вторичных антител (к иммуноглобулину мыши, конъюгированных с AP) в каждую лунку с использованием многоканальной пипетки-дозатора BIOHIT e1200 и наконечников с фильтром BIOHIT.

9.5.17. Инкубируют в течение периода от 30 мин до 1 часа при комнатной температуре – планшеты не штабелируют.

9.5.18. Промывают планшеты 4 раза с помощью D-PBS при к. т. (погружают планшеты в TBS в сэндвич-боксе и стряхивают содержимое в раковину, промакивают

синим валиком. Промывают и стряхивают еще 3 раза. Наконец, промакивают синим валиком, чтобы убедиться, что весь PBS удален).

9.5.19. Добавляют по 100 мкл раствора BCIP/NBT в каждую лунку с использованием многоканальной пипетки-дозатора BIOHIT e1200 и наконечников с фильтром BIOHIT.

9.5.20. Инкубируют в течение по меньшей мере 10 минут или до тех пор, пока не начинают появляться точки цвета индиго.

9.5.21. Удаляют BCIP/NBT стряхиванием в раковину и промывают планшет пять раз в водопроводной воде, после окончательной промывки несколько раз постукивают планшетом по синему валику, чтобы удалить как можно больше воды.

9.5.22. Снимают крышки с планшетов и помещают их вверх дном на часть синего валика, обеспечивая защиту от света, и оставляют высыхать в течение ночи перед подсчетом.

***Bloxall поставляется в светонепроницаемом флаконе-капельнице. Крышку пипетки перед первым использованием снимают для обеспечения пипетирования и переноса в резервуар с реагентом.**

Подсчет

9.6.1. Использование ридера AID Elispot:

a. Отрезают фрагмент белой бумаги или картона, чтобы он поместился под планшет. Его помещают в ридер Elispot, а сверху помещают планшет.

b. Включают ридер Elispot и осуществляют вход в компьютер с использованием стандартных учетных данных Novell.

c. Планшет помещают в держатель. Традиционно размещают серию разбавлений 1 слева.

d. Находят программу "Eli" в папке на C:/Elispot4.osr. Создают ярлык на рабочем столе для будущего использования. Осуществляют авторизацию и открывают программу:

Компьютер выдает сообщение об ошибке – файл макета "не существует". Нажимают OK.

Имя пользователя = вектор.

Пароль = вектор.

e. Новый файл, нажимают OK. Инструменты > Настройки подсчета > VVCF-амин > OK.

f. Нажимают на значок, чтобы открыть новый документ.

g. Инструменты > Стадия > Загрузить калибровку.

h. Выбирают черный планшет Adeno.

i. Инструменты > Стадия > Стадия калибровки.

При открытии окна нажимают кнопку "A1" под заголовком "Калибровать эти лунки". С использованием стрелок в правой части экрана регулируют положение и размер круга так, чтобы он помещался только внутри лунки A1. Процедуру повторяют для лунок A12 и H12 и нажимают OK.

j. Нажимают на значок "Начать", чтобы осуществить считывание и подсчет для планшета. Нажимают на одно из изображений лунки, чтобы просмотреть его. Если изображения являются нечеткими, то регулируют настройки камеры с использованием Инструменты > Настройки камеры. Если имеются затруднения с фокусировкой камеры, то проверяют, чтобы планшеты были сухими.

Если ридер отмечает части лунки, не содержащие коричневой точки:

Инструменты > Настройки подсчета > Ad Immuno > Редактирование. Увеличивают порог интенсивности и осуществляют пересчет для планшета.

ПРИМЕЧАНИЕ: Лучше пропустить несколько пятен, чем подсчитать лишние пятна, так как их легко добавлять позже.

k. Последовательно открывают каждое изображение и добавляют пятна, которые ридер пропустил, нажав на значок "Добавить пятна" (мишень), а затем нажимая на коричневые клетки. Редактируют только лунки с 50-200 пятнами. Следует обратить внимание, какая серия разбавлений подсчитывается в каждом случае.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для подсчета лунки должны быть на 100% интактными. Следует подсчитывать как минимум 3 лунки на вирус за титрование. Если доступно меньшее количество, то титрование необходимо повторять.

l. При завершении нажимают "Сохранить как": S:/Vector Core Facility/Image Files/Titration Images. Это действие создает папку, содержащую изображения лунок, а также документ программы Блокнот, демонстрирующий окончательные результаты подсчета.

m. При завершении нажимают на значок "Извлечь", чтобы удалить планшет.

9.6.2. Вводят результаты подсчета во вкладке "Результаты иммуно-подсчета" диаграммы продуцирования аденовирусов, находящейся в S:/Virus Production Records. Электронная таблица должна автоматически подсчитать титр с использованием формулы: *"среднее число пятен"* x *"серийное разбавление"* x *"коэффициент разбавления"* = *"x"* МЕ/мл.

Например, если при разбавлении до 10^{-7} получены значения количества, составляющие 36 и 40, то:

$\underline{(36 + 40)} = 38 \times (1 \times 10^7) \times 20 = 7{,}6 \times 10^9$ МЕ/мл.

ПРИМЕЧАНИЕ: Убеждаются, что в ячейке "Среднее значение на лунку" выбраны соответствующие значения в содержащейся в ней формуле.

9.6.3. Вводят значение титра в соответствующей вкладке электронной таблицы (либо "Поддержание исходного материала", либо "Новые аденовирусы"). Рассчитывают соотношение P и I, разделив количество вирусных частиц на мл (по показаниям считывания характеристик) на МЕ/мл по результатам титрования.

Значения P:I выше 100 обычно считаются слишком высокими для вирусов AdCh63, тогда как значения выше 50 обычно являются слишком высокими для вирусов AdHu5. В данном случае рассматривают возможность повторения процедуры инфицирования и очистки с использованием Hyperflask.

Приложение:

Способ фиксации клеток (февраль 2013 г.)

Авторы продемонстрировали, что фиксация метанолом (-20°C) крайне агрессивно обезвоживает клетки TREX (авторы провели наблюдение за капанием метанола на клетки в 6wp без аминосодержащего покрытия и обнаружили, что они подвергались иссушению и отделению от пластиковой поверхности). Фиксацию метанолом необходимо проводить при температуре -20°C, так как это замедляет удаление липидов и уменьшает разрушение клеток, по этой причине метанол также необходимо удалять перед нагреванием планшета перед окрашиванием.

Авторами рассматривалась фиксация 4% формальдегидом, который гораздо мягче воздействует на клетки, однако в результате окрашивание вокруг каждой окрашенной клетки было крайне диффузным.

Во время культивирования вода и среды обычно испаряются из лунок, расположенных ближе всего к периметру планшета, причем больше всего этому подвержены 36 внешних и угловые лунки. Результатом этого является различный рост клеток в планшете, в то время как любые компоненты сред, такие как соль, могут концентрироваться до такой степени, что они начинают оказывать вредное воздействие на клетки. Потеря объема всего на 10% может привести к концентрированию компонентов сред и метаболитов в степени, достаточной для изменения физиологии клеток, что, как следствие, повлияет на состоятельность получаемых впоследствии данных, приводя к получению гетерогенных или смещенных результатов.

Если клетки во внешних лунках находятся в нездоровом состоянии, то они с большей вероятностью будут утеряны из планшета во время промывания.

Аспекты, которые учитывались при разработке способа

Подпитка клеток через 24 ч

Авторы старались пропускать эту стадию — когда планшеты помещают в квадратные планшеты Nunc, испарения не происходит, а поэтому клетки, по видимому, находятся в нормальном состоянии в 50 мкл в течение 48 ч.

Краевой эффект

Авторами было показано, что краевой эффект не возникает при использовании лотков Nunc Square для инкубации планшетов на всех стадиях tc. Авторами не было доказано, что это является проблемой в случае без использования планшетов.

Для проведения теста авторами осуществлялось титрование контрольного вируса во всех лунках в той же концентрации. Пятна подсчитывали с использованием ридера EliSpot. Рассчитывали среднее значение и 95% CI, и при этом ни одна лунка не находилась за пределами этого диапазона.

Число подсчитываемых пятен

Чтобы результаты подсчета имели смысл при использовании распределения Пуассона, необходимо осуществить подсчет определенного числа явлений. В случае титрования, такого как в данном случае, авторы настоящего изобретения должны быть уверены, что у них имеется достаточно результатов подсчета, но также и в том, что не наблюдаются явления двойного инфицирования (одна клетка, инфицированная более чем одной вирусной частицей).

В этой связи, если принять за верхний предел 200 пятен в лунке, содержащей примерно 20000 клеток, MOI 0,01).

Функция ПУАССОН (из Excel)

Возвращает результат в виде распределения Пуассона. Распространенным применением распределения Пуассона является прогнозирование числа явлений в определенном объеме, например числа вирусных частиц на мл.

Число серий разбавления

Максимальное число пятен, которое можно подсчитать, прежде чем будут обнаруживаться клетки, инфицированные более чем одной вирусной частицей

TCID50 и БОЕ/мл

Предполагая, что используется одна и та же клеточная система, что вирус образует бляшки из этих клеток, а также что не добавляются какие-либо процедуры, способные

подавлять образование бляшек, можно ожидать, что 1 мл исходного раствора вируса будет содержать приблизительно половину числа бляшкообразующих единиц (БОЕ) в качестве значения TCID50. Это является только примерной оценкой, однако она основана на том соображении, что предельное разбавление, которое будет обеспечивать инфицирование 50% заражаемых клеточных слоев, часто, как ожидается, первоначально должно вызывать появление единичной бляшки в клеточных слоях, которые становятся инфицированными. В некоторых случаях могут случайно образоваться две или больше бляшек, и поэтому фактическое количество БОЕ следует определять экспериментально.

Математически ожидаемые значения БОЕ должны быть несколько больше, чем одна половина значения TCID50, поскольку отрицательные пробирки в случае TCID50 представляют нулевое число бляшкообразующих единиц, а каждая положительная пробирка представляет одну или несколько бляшкообразующих единиц. Более точную оценку получают при применении распределения Пуассона. При этом P(o) представляет собой долю отрицательных пробирок, а m представляет собой среднее число инфекционных единиц в объеме (БОЕ/мл), P(o) = e(-m). Для любого титра, выраженного как TCID50, P(o) = 0,5. Таким образом, e(-m) = 0,5 и m = -ln 0,5, что составляет ~0,7.

Следовательно, можно умножать значение титра TCID50 (на мл) на 0,7, чтобы предсказать среднее число БОЕ/мл. При фактическом применении таких расчетов следует помнить, что рассчитанные средние значения будут действительными только в том случае, если изменения в протоколе, необходимые для визуализации бляшек, не изменяют экспрессию инфекционного вируса по сравнению с экспрессией в условиях, используемых для TCID50.

Таким образом, в качестве рабочей оценки можно предположить, что в случае материала со значением TCID50, составляющим 1 x 105 TCID50/мл, будет получено 0,7 x 105 БОЕ/мл.

Пример 4

Во-первых, проводят клиническое испытание фазы I/II, включающее исследование, предусматривающее впервые осуществляемое включение в исследование людей, с участием здоровых взрослых в возрасте 18-50 лет, которое проводят в первую очередь.

Во-вторых, компонент фазы II, предусматривающий тестирование вакцины у пожилых людей и детей, осуществляют после рассмотрения данных относительно безопасности, полученных в первых группах, местным комитетом по безопасности.

Протокол кратко изложен ниже, и процедура внесения поправок в CTA дает возможность добавлять дополнительные группы, увеличивать размер групп или добавлять

дополнительные центры клинических испытаний в Великобритании, если это могло бы потребоваться в зависимости от распространения инфекции nCoV по всему миру.

Группы с внутримышечным введением

Группы 1 и 2 составляли компонент, предусматривающий впервые осуществляемое включение в исследование людей. По меньшей мере 5 субъектов в группе вакцинируют перед переходом к другим группам.

Группа	Возрастная группа	Доза	График
Группа 1 (n=10)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	2,5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 2 (n=10)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 3 (n=10)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	2,5 x 10^{10} в. ч.	Две дозы с интервалом 4 недели
Группа 4 (n=10)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	5 x 10^{10} в. ч.	Две дозы с интервалом 4 недели
Группа 5 (n=10)	Пожилые люди в возрасте 51-65 лет	5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 6 (n=10)	Пожилые люди в возрасте > 65 лет	5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 7 (n=10)	Дети в возрасте 12-15 лет	2,5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 8 (n=10)	Дети в возрасте 12-15 лет	5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 9 (n=10)	Дети в возрасте 5-11 лет	2,5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 10 (n=10)	Дети в возрасте 5-11 лет	5 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза
Группа 11 (n=10)	Дети в возрасте от 6 месяцев до 4 лет	1 x 10^{10} в. ч.	Однократная доза

Группы с аэрозольным введением – с последующей бронхоскопией

Группа	Возрастная группа	Доза аэрозоля	IM-доза
Группа 12 (n=3)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	1 x 9^{10} в. ч.	н.п.
Группа 13 (n=3)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	1 x 10^{10} в. ч.	н.п.
Группа 14 (n=10)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	1 x 10^{10} в. ч.	Физиологический раствор в качестве плацебо
Группа 15 (n=10)	Здоровые взрослые в возрасте 18-50 лет	Физиологический раствор в качестве плацебо	5 x 10^{10}

Предпочтительно иммунологические показатели можно оценивать на исходном уровне, через 7, 28 и необязательно 182 дня. Протокол подробно раскрыт в следующем(-их) примере(-ах).

Переход к лицензированию

Возможность проведения исследований для лицензирования вакцин зависит от распространения инфекции nCoV в ближайшие месяцы. В настоящее время в Африке крайне ограничены возможности проведения диагностического теста на nCoV-2019, а в некоторых странах ограничены возможности реагирования, если вирус начнет распространяться в густонаселенных районах.

Если вспышка будет сдержана, то лицензирование вакцины будет основываться на тестировании эффективности в животных моделях в сочетании с данными относительно безопасности и иммуногенности, полученными в ходе испытаний фазы II. Тестирование эффективности проводят как на хорьках, так и на NHP. Эти исследования могут быть расширены для определения коррелятов защиты. Если, как и в случае с SARS, вспышка закончится в течение нескольких месяцев, все еще будет желательным продолжить разработку вакцины до момента, когда эти исследования будут завершены и будет доступен запас вакцины.

Если быстрое сдерживание невозможно, то следует провести исследования эффективности вакцины фазы III. Описанное в данном документе исследование фазы I/II поддерживает дальнейшее планирование дополнительных испытаний фазы II и III во многих разных странах. Наиболее вероятным планом испытания будет являться рандомизированное плацебо-контролируемое испытание. В настоящее время частота случаев со смертельным исходом оценивается на уровне 1-2%, при этом большинство смертей происходит среди пожилых людей с уже имеющимися у них патологическими состояниями, а у большей части населения заболевание протекает в легкой форме. Таким образом, план испытания будет основываться на исследованиях эффективности вакцин против гриппа. Может иметь место сезонный эффект в отношении циркуляции SARS-CoV2, как и в случае других респираторных патогенов, что следует учитывать при планировании исследований. Однако после многократной передачи вируса от человека к человеку могут быть отобраны вирусные мутации, влияющие на трансмиссивность и тяжесть заболевания. Тяжесть заболевания может как увеличиться, так и уменьшиться. Повышение степени тяжести потребует пересмотра этических аспектов рандомизированного плацебо-контролируемого испытания, в то время как уменьшение степени тяжести разместит новый коронавирус в той же категории, что и другие

циркулирующие в настоящее время патогены, вакцины против которых никогда не считались необходимыми.

Планы возможного развертывания вакцины следует учитывать при планировании дополнительных испытаний. Это могла бы быть вакцинация некоторых работников в сфере здравоохранения, работающих на переднем крае борьбы с инфекцией, или могла бы возникнуть необходимость рассмотрения эффективности для наиболее уязвимой популяции населения (пожилые люди с сопутствующими заболеваниями), или в случае вероятных суперраспространителей (дети младшего возраста), или для всей популяции. План испытания фазы I/II авторов настоящего изобретения, раскрытый в данном документе, уже включает все возрастные группы. В случае необходимости вакцинации всего населения, включая особые популяции (беременные женщины, ВИЧ-положительные), описанная в данном документе вакцинная технология является подходящей.

Пример 5

Механизм действия

В клинических исследованиях образцы крови отбирают для проведения теста на антитела класса IgG с использованием валидированного ELISA и анализа ответов с участием Т-клеток с использованием валидированного протокола ELISpot на исходном уровне и после вакцинации.

Что касается валидированного протокола ELISPOT, то следует отметить, что фактический протокол ELISPOT представляет собой стандартную методику, которая обычно всегда выполняется одним и тем же образом. Специфичность валидированного протокола ELISPOT обусловлена используемыми пептидами. В данном изобретении используемые пептиды получены из шиповидного белка SARS-CoV2. В одном варианте осуществления синтезируют серию перекрывающихся пептидов, начиная с первой аминокислоты шиповидного белка. В данном варианте осуществления синтезируют 20-мерные пептиды. Следовательно, первый пептид содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 1-20 шиповидного белка SARS-CoV2; второй синтезированный пептид содержит аминокислоты 11-30 шиповидного белка SARS-CoV2; третий синтезированный пептид содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 21-40 шиповидного белка SARS-CoV2, и т. д. Эта коллекция пептидов может быть группирована в пулы для облегчения выполнения протокола ELISPOT. Квалифицированный исполнитель может применить любой подходящий подход к объединению пептидов в пулы.

Конкретный способ ELISPOT и результаты представлены ниже вместе с полным списком пептидов, используемых в анализе, а также подробностями используемой стратегии объединения в пулы.

Следует отметить, что ни одна из других разрабатываемых вакцинных технологий, как ожидается, не будет использоваться в качестве примирующей серии с однократной дозой. Все вакцины на основе ДНК, РНК и белков планируются для использования в виде схемы вакцинации с двумя дозами, при этом наиболее вероятный период между введением доз составляет 4 недели. Таким образом, вакцина автора настоящего изобретения эффективна для исключительно быстрого получения иммунных ответов, которая при этом, по-видимому, является лучшим вариантом вакцины для борьбы с SARS-CoV2.

В течение периода после контрольного заражения, составляющего 7 дней или больше, животных подвергнут эвтаназии, а легкие будут исследовать на наличие признаков иммунопатологии.

Наряду с внутримышечным введением для начальных групп авторы настоящего изобретения предусматривают аэрозольную доставку вакцины с последующей бронхоскопией для оценки иммунных ответов в респираторном тракте, выполняемую совместно с внутримышечной вакцинацией/бронхоскопией для сравнения.

Все эти процедуры оценки следуют хорошо зарекомендовавшим себя протоколам, которые уже используются либо в Оксфорде, либо в Королевском колледже Лондона. Эти исследования также дают возможность сравнивать иммуногенность вакцины с таковой для других вакцин против nCoV, находящихся в клинической или доклинической разработке.

Химические свойства, изготовление и контроль (CMC) в рамках разработки

Известны вакцины на основе аденовирусного вектора с недостаточной репликацией.

Ген аденовируса E1 должен поставляться в транс-действующем виде посредством клеточной линии, используемой для изготовления вакцины. В клетках HEK293 этот ген фланкирован другими последовательностями аденовируса 5, которые присутствуют в вакцинном векторе на основе Ad5, так что в редких случаях событие двойного кроссинговера приводит к образованию способного к репликации аденовируса. Это является нежелательным и было преодолено либо использованием другого аденовирусного вектора, такого как ChAdOx1, в котором гомология между вектором и клеточной линией слишком низка, чтобы обеспечить рекомбинацию, либо использованием клеточной линии, которая экспрессирует E1 Ad5 без фланкирующих последовательностей, таких как PerC6 или другие, разработанные другими компаниями.

Дальнейшее усовершенствование клеточной линии заключается во включении способности подавлять экспрессию вакцинного антигена во время изготовления. Вакцинный антиген находится под управлением сильного промотора млекопитающих, чтобы обеспечить высокий уровень экспрессии антигена после вакцинации. Экспрессия антигена во время изготовления может оказать отрицательный эффект в отношении значения выхода для вакцины. За счет предупреждения экспрессии компонентов вакцины во время изготовления выход больше не зависит от выбора антигена, а процедура может быть стандартизирована. У авторов настоящего изобретения для осуществления данного проекта имеется доступ к такому банку клеток, соответствующих требованиям cGMP, и он использовался ранее как в случае Advent (материал фазы I/II), так и в случае CanSino (масштабирование).

Подготовительная процедура состоит в расширении банка клеток, инфицировании посевным вирусом и обеспечении репликации аденовируса внутри клеток. После сбора лизис с помощью детергента, осветление и дополнительная очистка осуществляются стандартными способами, которые уже применяются как в случае Advent, так и в случае CanSino. Очищенное лекарственное вещество затем разбавляют в буфере для составления, стерилизуют фильтрованием и наполняют полученным флаконы, которые можно хранить в жидком или лиофилизированном виде.

Тесты в рамках контроля качества включают определение концентрации (что представляет собой анализ активности), стерильности, последовательности ДНК вакцинного антигена и отсутствия посторонних агентов. Использование глубокого секвенирования в последнее время значительно ускорило определение характеристик исходных посевных материалов для вакцины для подтверждения клональности без длительных циклов клонирования вируса, а также для выявления посторонних агентов. Таким образом, время, необходимое для тестирования для обеспечения выпуска, может быть значительно сокращено.

Чтобы начать изготовление согласно cGMP, Центр клинического биопроизводства Оксфордского университета осуществляет получение исходного посевного материала для вакцины, который является подходящим для перенесения в чистое помещение для изготовления. Он подлежит тестированию в отношении концентрации, последовательности ДНК антигена, стерильности и присутствия микоплазмы перед использованием двумя производителями вакцин. Advent в Италии изготовит партию из 1000 флаконов для первых клинических исследований.

CanSino в Китае также будет изготавливать вакцину. CanSino начнет изготовление после предоставления исходного посевного материала, начиная с партии объемом 200 л для получения 20000 доз.

Во всех проведенных клинических испытаниях вакцин на основе вектора ChAdOx1 использовали лекарственный продукт, полученный согласно GMP. Для ChAdOx1 SARS-CoV2 исходной партии, полученной согласно GMP, состоящей из 1000 доз, является достаточно для проведения клинического испытания фазы I/II, которое описано выше.

Одновременно с передачей исходного посевного материала для вакцины в Advent для изготовления первых 1000 доз исходный посевной материал для вакцины передают в CanSino, чтобы обеспечить увеличении масштаба изготовления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ/ХРОНОЛОГИЯ СОБЫТИЙ

- Создана вакцина ChAdOx1 SARS-CoV2 для доклинических исследований.
  - Завершено 18 февраля 2020 г.
- Доклиническое тестирование включающее первоначальные исследования иммуногенности у мышей с последующими исследованиями эффективности у хорьков и NHP.
  - Реализовано по соглашению между NIH и CSIRO.
- Был создан исходный посевной материал для вакцины, пригодный для изготовления согласно cGMP.
  - Завершено 6 марта 2020 г.
- Изготовление партии для фазы I/II, состоящей из 1000 доз вакцины, согласно cGMP и предоставление ее для клинических испытаний.
  - В ходе осуществления.
- Получение одобрения этического комитета и регуляторных органов для проведения испытания в Великобритании.
  - В ходе осуществления.
- Проведение исследования фазы I/II, предоставляющего данные относительно безопасности и иммуногенности у взрослых, пожилых людей и детей.
  - В ходе осуществления.
- Крупномасштабное изготовление вакцины (200 л, около 20000 доз на партию).
  - В ходе осуществления (передача исходного посевного материала).

Пример 6

Эти первоначальные исследования предусматривают тестирование на иммуногенность однократной дозы вакцины. Ответы с участием как B-, так и T-клеток оценивают через

две недели. Ответы с выработкой IgG оценивают с помощью анализа ELISA с использованием белка, полученного Keith Chapell (UQ, Австралия). Нейтрализующие антитела измеряют с использованием псевдотипированного вируса, несущего на своей поверхности шиповидный белок nCoV. Этот анализ использовался для проверки достоверности рецептора проникновения 2019-nCoV (https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.22.915660v1). Ответы с участием Т-клеток измеряли в анализе ELISpot с использованием пептидов, охватывающих всю последовательность шиповидного белка.

Вакцину предоставляли лаборатории Rocky Mountain Labs, NIH, для вакцинации приматов, отличных от человека, и исследований эффективности. Одна группа получает контрольную вакцинацию ChAdOx1 с зеленым флуоресцентным белком (GFP), одна получает однократную дозу ChAdOx1 SARS-CoV2 и одна получает две дозы, вводимые с интервалом в четыре недели, с заражением вирусом через дополнительные четыре недели. Тщательное гистопатологическое исследование проводят после исследования с заражением для оценки любой возможной иммунопатологии.

Авторы настоящего изобретения утверждают, что NHP защищены вакцинацией без репликации вируса после заражения и без признаков иммунопатологии.

Дальнейшее исследование эффективности вакцины осуществляется на хорьках, которое проводится PHE или CSIRO, если возможности PHE ограничены. Оно предусматривает включение в его состав тех же групп, что и в исследовании на NHP, но с четвертой группой, вакцинированной с помощью ChAdOx1 nCoV в два момента времени, из которой животных удаляли в разные моменты времени после заражения для оценки иммунопатологии в легких.

Исходный посевной материал для вакцины, подходящий для ее изготовления согласно GMP, получают в Центре клинического биопроизводства Оксфордского университета. Его передают в Advent для получения главного посевного вирусного материала и лекарственного вещества. Первая процедура заполнения и последующие операции применительно к вакцине приводят в результате к получению 1000 флаконов с потенциальным получением большего количества при втором заполнении . Тестирование качества вакцины находится под управлением MHRA с использованием способов глубокого секвенирования, чтобы сократить время, необходимое для сертификации в отношении GMP.

Клиническое исследование начинается с повышения дозы у здоровых взрослых добровольцев в возрасте от 18 до 50 лет. Стандартный подход к исследованиям,

предусматривающим впервые осуществляемое включение в исследование людей, заключался в первоначальной вакцинации самой низкой дозой одного добровольца. После успешного анализа безопасности ту же дозу вводят двум другим добровольцам, при этом оставшуюся часть группы затем вакцинируют через сорок восемь часов после дополнительного анализа безопасности. Первая доза будет составлять 2,5 x 10 ^ 10 в.ч., которая, как утверждают авторы настоящего изобретения, являлась иммуногенной без SAE. Если более высокая доза 5 x 10 ^ 10 в. ч. вызывает случаи ограниченной и непродолжительной лихорадки у некоторых субъектов, тогда можно выбрать более низкую дозу или соответствующим образом скорректировать ее. Таким образом тестируют эти две дозы и одну дозу выбирают для дальнейшей клинической оценки.

После анализа безопасности для первых двух групп через одну неделю после вакцинации исследование подлежит продолжению с участием взрослых старше 50 лет, а затем с участием детей школьного возраста. Для групп взрослых авторы настоящего изобретения осуществляют набор, вакцинацию и выполняют последующую оценку иммуногенности и безопасности для вакцинированных добровольцев.

Анализ безопасности будет следовать за стандартными процедурами при визитах для оценки в дни 2, 7, 14, 28, 56 и 182 после вакцинации. Иммуногенность оценивают в день вакцинации плюс дни 7, 14, 28, 56 и 182 у взрослых и максимум в три момента времени у детей. Процедуры оценки иммуногенности включают анализы ELISA и ELISpot в качестве первичных иммунологических конечных точек. Кроме того, проводят анализы на нейтрализацию для живого коронавируса и фенотипирование Т-клеток. PBMC замораживаются и могут быть использованы для дальнейших иммунологических исследований, направленных на изучение широты ответа, или для получения моноклональных антител.

Исследования, описанные в данном документе, представляют собой наилучшую практику разработки вакцины против нового коронавируса и проводятся согласно GCP с максимальной скоростью. За клиническими исследованиями следуют исследования по возрастной эскалации и деэскалации. Возрастные группы, которые подлежат включению, обеспечивают возможность оценки потенциальной эффективности вакцины у работников в сфере здравоохранения, пожилых людей с риском более тяжелого течения заболевания и детей, которые могут иметь легкую форму заболевания, но очень эффективно передавать инфекцию другим. После этих первоначальных исследований продолжают более детальные процедуры иммунологической оценки, а также клинические исследования эффективности вакцины.

Пример 7. Кривая роста для ChAdOx1-2019nCoV

Клетки HEK293 TREx в суспензии культивировали в следующих средах.

Составляющий компонент	**Поставщик**
1 л среды CD293	Fisher, 11913019
5 мл FBS	Sigma, F2442
1 мл 100x пениц./стреп.	Sigma, P0781
20 мл 200 мМ глютамина	Sigma, G7513
100 мкл бластицидина в концентрации 10 мг/мл	Melford Labs, B1105
10 мл средства против слеживания	Fisher, 0010057DG
20 мл 1 М HEPES	Sigma, H0887

Клетки HEK 293 TREx экспрессируют белок-репрессор элемента устойчивости к тетрациклину, который связывается с участками промотора CMV рекомбинантного аденовируса и предупреждает экспрессию шиповидного белка nCoV-19 во время получения ChAOx1 nCoV-19 в этих клетках. Экспрессия белка-репрессора tet выключается при добавлении в культуральную среду тетрациклина, что дает возможность экспрессировать шиповидный белок nCoV-19.

За день до инфицирования клетки HEK293 TREx осаждали и повторно суспендировали в минимальной среде (CD293, 1% FBS, 5 мМ L-глутамина и пениц./стреп.), подсчитывали методом вытеснения трипанового синего и высевали при 1 x 10e6/мл. Колбу с культурой оставляли для роста на ночь (37°C, 5% CO_2, внутри орбитального инкубатора).

В день инфицирования клетки подсчитывали методом вытеснения трипанового синего и доводили до 1 x 10e6/мл с помощью минимальной среды. Клетки распределяли на аликвоты с объемами по 80 мл в колбах со свежей культурой и в каждую колбу вносили различные добавки.

Колба 1: репрессированная при MOI 3 – 8 мкл бластицидина + вирус при множественности инфекции (MOI) 3.

Колба 2: дерепрессированная при MOI 3 – 80 мкл тетрациклина в концентрации 1 мг/мл + вирус при MOI 3.

Колба 3: репрессированная при MOI 1 – 8 мкл бластицидина + вирус при MOI 1.

Колба 4: репрессированная при MOI 0,3 – 8 мкл бластицидина + вирус при MOI 0,3.

Колбу возвращали для инкубации (37°C, 5% CO_2).

Из неинфицированных клеток отбирали и осаждали объем 500 мкл. Осадок и надосадочную жидкость хранили отдельно при -80°C для использования в качестве отрицательного контроля в qPCR.

Через 24, 48 и 72 часов после инфицирования отбирали следующие образцы:

A- 500 мкл: осаждали центрифугированием, и как надосадочную жидкость, так и осадок хранили отдельно при -80°C для анализа посредством qPCR.

B- 2 мл: осаждали центрифугированием. Надосадочную жидкость собирали и помещали в отдельную пробирку. Клеточный осадок сначала ресуспендировали в 140 мкл лизирующего буфера для ChAdOx1, содержащего нуклеазу. Затем общий объем доводили до 200 мкл с помощью 5 M NaCl. Образец встряхивали. Как клеточный осадок, так и образцы надосадочной жидкости помещали на хранение при температуре -80°C для использования в анализах иммунного титрования для расчета выраженных в ME показателей.

C- <u>Количественное определение инфекционных единиц (ME):</u>

ME определяли количественно с использованием иммуноанализа с определением. Вкратце, 96-луночный планшет с черными стенками/прозрачным плоским дном (Corning) засевали адгезивными клетками HEK293 TREx в среде для роста (ниже) с получением характеризующегося 95% конфлюентностью монослоя в требуемый день.

Составляющий компонент	**Поставщик**
500 мл 1x DMEM	Sigma, D6546 или Gibco, 21969035
50 мл FBS	Sigma, F2442
5 мл 100x пениц./стреп.	Sigma, P0781
10 мл 200 мМ глютамина	Sigma, G7513
250 мкл бластицидина в концентрации 10 мг/мл	Melford Labs, B1105
10 мл 1 M HEPES	Sigma, H0887

Образцы для титрования размораживали, встряхивали и отбирали аликвоту объемом 10 мкл для тестирования. Полученное смешивали с 90 мкл среды для роста с получением разбавления 10^{-1}. Дальнейшие разбавления в стандартной среде для роста (от 10^{-2} до 1,1 x 10^{-7}) выполняли в двух повторностях на образец в пустом 96-луночном планшете с V-образными лунками. Среду из планшета для анализа удаляли и высевали по 50 мкл каждого тестируемого образца/разбавления. Планшеты инкубировали в течение 24 ч (37°C, 8% CO_2) перед добавлением дополнительных 50 мкл стандартной среды для роста.

Планшет возвращали в инкубатор еще на 24 ч. В общей сложности через 48 ч все содержимое лунок аспирировали и клетки фиксировали с помощью 100 мкл предварительно охлажденного метанола на лунку. Планшеты помещали на хранение в течение ночи при -20°C.

Для иммуноокрашивания все стадии инкубации выполняли при комнатной температуре: планшеты промывали (x5) с помощью PBS перед блокированием сначала с помощью 100 мкл на лунку Bloxall (Vector Labs) в течение 30 мин, а затем 200 мкл на лунку 1% раствора казеина (Thermo Fisher) в течение 15 мин после промывки (x5) с помощью PBS. В лунки добавляли антитело к аденовирусному гексону (AbCam), разбавленное в 1% растворе казеина (100 мкл/лунка). Через 1 ч первичное антитело удаляли и планшеты промывали (x8) с помощью 1x TBS (забуференный Tris физиологический раствор – Sigma). Вторичное антитело (целая молекула антитела козы к IgG мыши, Sigma) разбавляли в TBS, содержащем 3% сухого обезжиренного молока. Полученное добавляли по 100 мкл/лунка перед дополнительным инкубированием в течение 1 ч. Планшеты снова промывали (x8) в 1x TBS, после чего добавляли по 100 мкл на лунку BCIP/NBT для визуализации инфицированных клеток. Как только "пятна" хорошо окрашивались, BCIP/NBT удаляли, планшет промывали (x5) водопроводной водой и оставляли высыхать в течение ночи. Изображения каждой лунки получали с использованием ридера AID Elispot и подсчитывали отдельные пятна в лунках, где можно было увидеть 20-200 пятен. Титр, выраженный в ME, оценивали путем расчета коэффициента разбавления каждого данного образца и количества пятен, подсчитанных при этом разбавлении.

Результаты

Фигура 1. Общее количество ME в культуре объемом 80 мл, инфицированной при MOI 3, с репрессией и без нее

Репрессированные и дерепрессированные культуры обеспечивали одинаковое количество ME вируса во все тестируемые моменты времени.

Фигура 2. Общее количество ME снижается дозозависимым образом в соответствии с MOI

Количественное определение числа копий генома в культурах

Хранимые при -80°C образцы извлекали и оттаивали при комнатной температуре. Образцы осадка повторно суспендировали в 500 мкл сверхчистой воды, чтобы вернуть их прежнюю объемную концентрацию в культуре.

По 10 мкл всех образцов разбавляли в 15 мкл DNArealeasy (Anachem) и использовали следующую программу ПЦР для создания матрицы вирусной ДНК:

65°C в течение 15 мин, 96°C в течение 2 мин, 65°C в течение 4 мин, 96°C в течение 1 мин, 65°C в течение 1 мин, 96°C в течение 30 с.

Для построения стандартной кривой плазмидную ДНК ChAdOx1 известной концентрации разбавляли с получением образца с заданным числом копий на лунку. Мастер-микс для qPCR получали с использованием 2x смеси зондов Luna (NEB), специфичных для ChAdOx2 праймеров (Thermo Fisher), специфичного для ChAdOx1 универсального зонда (TAMRA/FAM) (Applied Biosystems) и воды, не содержащей нуклеаз, до конечного объема 15 мкл на образец. Мастер-микс смешивали и добавляли по 15 мкл в соответствующие лунки 96-луночного планшета MicroAmp FAST Optical PCR. Добавляли матрицу/плазмидный стандарт/образцы (по 5 мкл на лунку) в соответствующие тестовые лунки. Для покрытия планшета использовали оптическую пленку перед запуском соответствующей программы qPCR на машине для qPCR StepOne.

Программа ПЦР: 95°C в течение 10 мин, 45 циклов по 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 1 мин. Полученные данные анализировали с использованием результатов построения стандартной кривой с получением числа копий вирусного генома на лунку, на основе которого проводили дополнительные расчеты с получением числа копий генома на мл культуры.

Чтобы сравнить значения титра, выраженного в ME, между дерепрессированной и репрессированной культурами, значения числа копий генома для дерепрессированной культуры задавали как 100%, а на приведенном ниже графике показано отличие репрессированной культуры при сравнении с данными значениями.

Результаты

Фигура 3 Число копий генома в колбах, представленное в процентах, стандартизированное по отношению к 100%, рассматриваемым в качестве показателя выхода для дерепрессированной культуры.

Данные показывают, что число копий генома является схожим при обоих условиях тестирования.

Пример 8

Исследование фазы 2/3 для оценки эффективности и безопасности рекомбинантной вакцины на основе аденовируса против коронавирусного заболевания (COVID-19)

Одностороннее слепое рандомизированное исследование безопасности и эффективности с дополнительными исследованиями иммуногенности в старшей и младшей возрастных группах.

Основное испытание эффективности: здоровые взрослые в возрасте ≥ 18 лет.

Последовательные дополнительные исследования иммуногенности с возрастной эскалацией/деэскалацией:

1. Здоровые взрослые в возрасте 56-70 лет включительно.
2. Здоровые взрослые в возрасте 71 года и старше.
3. Здоровые дети в возрасте от 5 до 15 лет включительно.

Общее число для включения в исследование: 3000-5250 участников.

Группы последовательного повышения/деэскалации возраста:

группа 1, взрослые в возрасте 56-70 лет:

5 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1-nCOV19, N=30;

ИЛИ

плацебо, физиологический раствор для инъекций, N=30,

группа 2, взрослые в возрасте 71+ лет:

5 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1-nCOV19, N=50;

ИЛИ

плацебо, физиологический раствор для инъекций, N=50,

группа 3, дети в возрасте 5-15 лет:

2,5 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1-nCOV19, N=30;

ИЛИ

плацебо, физиологический раствор для инъекций, N=30.

Основное исследование эффективности: 5280 участников.

Группа 4, взрослые в возрасте ≥ 18 лет:

5 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1-nCOV19, N = не более 2500,

ИЛИ

плацебо, физиологический раствор для инъекций, N = не более 2500.

Запланированная продолжительность испытания	6-12 месяцев на участника

	Цель	**Критерий эффективности**
Первичная	Изучить безопасность и эффективность вакцины	Безопасность:

	ChAdOx1-nCOV19 у здоровых взрослых в возрасте ≥ 18 лет	1. Местные и системные нежелательные реакции в течение 7 дней после вакцинации в подгруппе из 100 участников. 2. Серьезные нежелательные явления. Эффективность: вирусологически подтвержденные (ПЦР-положительные) симптоматические случаи COVID-19
Вторичная	Оценить клеточную и гуморальную иммуногенность ChAdOx1 nCoV-19	a) Иммуноферментный спот-анализ (ELISpot) с использованием интерферона-гамма (IFN-γ) для оценки ответов в отношении шиповидного белка SARS-CoV-2; b) твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для количественного определения антител к шиповидному белку SARS-CoV-2 (коэффициенты сероконверсии); c) анализы вируснейтрализующих антител (NAb) к живому вирусу и/или псевдотипу вируса SARS-CoV-2
	Изучить безопасность и иммуногенность вакцины ChAdOx1-nCOV19 у здоровых взрослых в возрасте 56-70 лет и 71 года или старше	Антитела к шиповидному белку SARS-CoV-2, измеренные с помощью ELISA в день 28 после вакцинации. Доля с 4-кратным увеличением содержания антител к шиповидному белку SARS-CoV-2, измеренных с помощью ELISA в день 28 после вакцинации.
	Изучить безопасность и иммуногенность вакцины ChAdOx1-nCOV19 у здоровых детей в возрасте 5-15 лет	Антитела к шиповидному белку SARS-CoV-2, измеренные с помощью ELISA в день 28 после вакцинации.

		Доля с 4-кратным увеличением содержания антител к шиповидному белку SARS-CoV-2, измеренных с помощью ELISA в день 28 после вакцинации.
	Исследовать влияние вакцины ChAdOx1-nCOV19 на серьезные инфекции COVID-19	1. Госпитализация по поводу инфекции COVID19. 2. Госпитализация госпитализации в ICU по поводу инфекции COVID-19. 3. Летальный исход, обусловленный инфекцией COVID19
Третичная	Исследовательские иммунологические анализы	a) Анализ клеток посредством анализов на основе проточной цитометрии. b) Функциональные анализы антител. c) Другие
	Измерить воздействие COVID-19	Представлено еженедельным опросом для сбора информации о случаях контактов среди членов семьи и друзей, контакта с населением в целом, процедурах инфекционного контроля
Исследуемые продукты	ChAdOx1-nCoV-19, вектор на основе аденовируса обезьян с недостаточной репликацией, экспрессирующий шиповидный (S) белок SARS-CoV-2. 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций	
Состав **Путь введения** **Доза на введение**	Жидкость Внутримышечно (IM) Группы 1, 2 и 4: 5 x 10^{10} в. ч. Группа 3: 2,5 x 10^{10} в. ч.	

Пример 9

Имелись одна группа из трех самок мышей BALB/c и одна группа из пяти самок мышей CD-1 в возрасте 6-10 недель. Имелись одна группа из двух самок мышей BALB/c и одна группа из трех самок мышей CD-1 в возрасте 6-10 недель. Каждой мыши внутримышечно вводили необходимый объем вакцины. Для процедур внутримышечной

вакцинации: инъекции осуществляют посредством введения 50 мкл в бедро. Через 9 дней отбирали мышей BALB/c, через десять дней отбирали мышей CD-1. У этих мышей собирали селезенки и проводили анализ ELIspot, как подробно описано ниже и описано в другом месте (PMID: 23485942).

Планшеты для ELISpot покрывали 50 мкл на лунку покрывающего mAb (например, AN18 к IFN-γ мыши, разбавленного до 5 мкг/мл в покрывающем буфере). Суспензию отдельных клеток из селезенки получают путем механического измельчения, лизиса и дифференциального центрифугирования, как описано в другом месте (PMID: 23485942). Спленоциты инкубировали с пептидами (1-4 мкг/мл), охватывающими весь шиповидный белок, закодированный в вакцине ChAdOx1 nCoV-19. Пептид 1 имел последовательность MFVFLVLLPLVSSQC (SEQ ID NO: 16); пептид 2 имел последовательность LVLLPLVSSQCVNLT (SEQ ID NO: 17); пептид 3 имел последовательность PLVSSQCVNLTTRTQ (SEQ ID NO: 18) и т. д. вплоть до пептида 316 включительно. Пептиды 317-321 являлись таким же образом перекрывающимися 15-мерами, но содержали последовательность из tPA. Были разработаны и проанализированы планшеты для ELISpot, при этом данные представлены ниже.

Пул 1: пептиды 1-77 включительно; 317-321 включительно. **Пул 2:** пептиды 78-167 включительно. **Пул 3:** пептиды 168-241 включительно. **Пул 4:** пептиды 242-316 включительно.

Фигура 4. (a) Суммарные ответы согласно ELISpot в отношении IFN-γ селезенки для мышей BALB/c (левая панель) и CD-1 (правая панель), развившиеся в ответ на пептиды, охватывающие шиповидный белок из SARS-CoV-2, через девять или десять дней после вакцинации с помощью 1,7 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1 nCoV-19 или 8 x 10^{9} в. ч. ChAdOx1 с GFP. Изображено среднее значение с SEM.

Фигура 5. Диаграмма типа "ящик с усами" для оптических плотностей после анализа ELISA сыворотки крови мыши BALB/C (верхняя панель), инкубированной с очищенным белком, охватывающим домен S1 (слева), или очищенным белком, охватывающим домен S2 (справа), шиповидного отростка SARS-CoV-2 через девять или десять дней после вакцинации с помощью 1,7 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1 nCoV-19 или 8 x 10^{9} в. ч. ChAdOx1 с GFP. Диаграммы типа "ящик с усами" для оптических плотностей после анализа ELISA сыворотки крови мыши CD-1 (нижняя панель), инкубированной с очищенным белком, охватывающим домен S1 (слева), или очищенным белком, охватывающим домен S2 (справа), шиповидного отростка SARS-CoV-2.

Пример 10. Сборка вакцины

Физические, химические и фармацевтические свойства и состав

Описание ChAdOx1 nCoV-19

Вакцина ChAdOx1 nCoV-19 состоит из вектора на основе аденовируса обезьян ChAdOx1 с недостаточной репликацией, содержащего структурный поверхностный гликопротеин (шиповидный белок) SARS CoV-2 (nCoV-19), являющийся антигеном, экспрессируемый под управлением промотора CMV, с лидерной сигнальной последовательностью тканевого активатора плазминогена (tPA). Было показано, что лидерная последовательность tPA способствует повышению иммуногенности.

Кодовым названием лекарственного вещества является ChAdOx1 nCoV-19. Рекомендуемого международного непатентованного названия (INN) не существует.

Лекарственное вещество ChAdOx1 nCoV-19 имеет размер генома 35542 п. о. и представляет собой слегка непрозрачную замороженную жидкость, по существу не содержащую видимых частиц. Внешний вид зависит от концентрации вируса и буфера, в котором составлен вирус.

Вектор ChAdOx1

Вектор ChAdOx1 характеризуется недостаточной репликацией, так как область, соответствующая гену E1, необходимая для репликации вируса, была удалена. Это означает, что вирус не будет реплицироваться в клетках человеческого организма. В векторе ChAdOx1 дополнительно удален локус E3. ChAdOx1 осуществляет размножение только в клетках, экспрессирующих E1, таких как клетки HEK293 и их производные или аналогичные клеточные линии, такие как Per.C6 (Crucell).

Сборка вакцинного штамма ChAdOx1 nCoV-19

Вакцина состоит из аттенуированного вектора на основе аденовируса шимпанзе ChAdOx1, экспрессирующего шиповидный белок SARS CoV-2 под управлением промотора CMV. Создавали предварительную аденовирусную плазмиду pBAC ChAdOx1 nCoV19 и ее получали в Институте Дженнера Оксфордского университета. кДНК шиповидного отростка SARS CoV-2, содержащая N-концевую лидерную последовательность tPA из 32 аминокислот, полученную от GeneArt, вставляли в локус E1 ChAdOx1 с помощью рекомбинации по технологии Gateway. Предпочтительно используется "длинный промотор CMV". Это известно из уровня техники и описано в PCT/GB2008/001262 (WO/2008/122811).

Использовались следующие ДНК-конструкции:

- № p5727: кДНК шиповидного отростка SARS CoV-2 в ДНК-векторе pMK;

- № p1990: плазмидный вектор pENTR, содержащий "длинный" промотор CMV (с сайтами интрона A и оператора Tet; CMVLP TO) и последовательность поли-A BGH;
- № p5710: плазмидный вектор pENTR, содержащий последовательность шиповидного отростка-антигена CoV, между "длинным" промотором CMVLP TO и последовательностями поли-A BGH;
- № p2563: вектор pBAC ChAdOx1 с удаленными E1 и E3 и модифицированным E4 для повышения выхода и экспрессии гексонов для безмаркерного титрования. Его создание было осущетсвлено в Институте Дженнера, и его полная последовательность генома является известной.

Последовательность шиповидного отростка-антигена SARS CoV-2 вырезали из № p5727 с использованием NotI и KpnI и лигировали в № 1990, в который вносили разрывы с помощью тех же ферментов, с получением № p5710. Вставку верифицировали рестрикционным картированием и секвенированием. Затем между № 5710 и № 2563 осуществляли рекомбинацию по технологии Gateway.

Последовательность трансгенной области в ChAdOx1 nCoV-19 верифицировали путем секвенирования непосредственно очищенной фенолом вирусной геномной ДНК.

Карта ДНК № p5713 pBAC ChAdOx1 nCoV-19, использованная для создания рекомбинантной вакцины на основе вирусного вектора, показана на фигуре 6.

Более детально, в изготовлении композиции по настоящему изобретению использовалась плазмида p5713 pDEST-ChAdOx1-nCOV-19. В частности, плазмида кодирует вирусный вектор по настоящему изобретению. Вирусную последовательность вырезают из p5713 pDEST-ChAdOx1-nCOV-19, а затем линейную вирусную ДНК используют для трансфекции клеток, экспрессирующих E1, таких как клетки HEK293-TRex, для получения вирусной вакцины.

SEQ ID NO: 25 – последовательность ДНК p5713 pDEST-ChAdOx1 nCoV-19. Формат: ДНК (верхняя нить), 44104 нуклеотида.

Примечательные особенности

- "Длинный" промотор CMV (CMVLP), содержащий сайты интрона A и оператора Tet (TO) для репрессирования экспрессии трансгена в клетках, экспрессирующих репрессор Tet.
- Синтетический кодон-оптимизированный шиповидный белок SARS CoV-2 с открытой рамкой считывания.
- Сигнал поли-A BGH.

- Фланкирующие сайт-специфические последовательности рекомбинации, используемые для вставки трансгена.
- Ген устойчивости к хлорамфениколу в остове вектора BAC.
- Сайты PmeI для высвобождения вирусного генома.

Пример 11

Название испытания: Исследование фазы I/II для определения эффективности, безопасности и иммуногенности вакцины-кандидата против коронавирусного заболевания (COVID-19) ChAdOx1 nCoV-19 у здоровых взрослых добровольцев в Великобритании

Ссылочный номер исследования: COV001

Версия протокола: 0,5

Дата: 12 марта 2020 г.

Номер EudraCT: 2020-001072-15

Ссылочный номер IRAS: 281259

План	Односторонне слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое, многоцентровое
Популяция	Здоровые взрослые в возрасте 18-55 лет.
Запланированный размер выборки	Не более 510

Группа	W0	W4
1a (n=44) Интенсивное последующее наблюдение	ChAdOx1 nCoV-19 5×10^{10} в. ч.	-
1b (n=44) Интенсивное последующее наблюдение	Физиологический раствор в качестве плацебо	
2a (n=206)	ChAdOx1 nCoV-19 5×10^{10} в. ч.	-
2b (n=206)	Физиологический раствор в качестве плацебо	-
3 (n=10) Режим "прайм-буст"	ChAdOx1 nCoV-19 5×10^{10} в. ч.	ChAdOx1 nCoV-19 5×10^{10} в. ч.

Запланированная продолжительность испытания	6 месяцев с момента включения в исследование с 12-месячным дополнительным визитом

	Цель	**Критерий эффективности**
Первичная	Оценить эффективность вакцины-кандидата ChAdOx1 nCoV-19 против COVID-19	a) Вирусологически подтвержденные (ПЦР-положительные) симптоматические случаи COVID-19
Сопервичная	Оценить безопасность вакцины-кандидата ChAdOx1 nCoV	a) Частота возникновения серьезных нежелательных явлений (SAE) на протяжении всего исследования.
Вторичная	Оценить профиль безопасности, переносимости и реактогенности вакцины-кандидата ChAdOx1 nCoV	a) частота возникновения ожидаемых признаков и симптомов местной реактогенности в течение 7 дней после вакцинации; b) частота возникновения ожидаемых признаков и симптомов системной реактогенности в течение 7 дней после вакцинации; c) частота возникновения неожиданных нежелательных явлений (AE) в течение 28 дней после вакцинации; d) изменение от исходного уровня для лабораторных количественных показателей безопасности и e) частота возникновения эпизодов усиления заболевания
	Оценить эффективность вакцины-кандидата ChAdOx1 nCoV-19 против тяжелой и не являющейся тяжелой форм COVID-19	a) Случаи госпитализации в связи с COVID-19; b) Поступления в отделение интенсивной терапии

		(ICU), связанные с COVID-19; c) Случаи летального исхода, связанные с COVID-19; d) Сероконверсия против антигенов SARS-CoV-2, не относящихся к шиповидному отростку
	Оценить клеточную и гуморальную иммуногенность ChAdOx1 nCoV-19	a) Иммуноферментный спот-анализ (ELISpot) с использованием интерферона-гамма (IFN-γ) для оценки ответов в отношении шиповидного белка SARS-CoV-2; b) твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для количественного определения антител к шиповидному белку SARS-CoV-2 (коэффициенты сероконверсии); c) анализы вируснейтрализующих антител (NAb) к живому вирусу и/или псевдотипу вируса SARS-CoV-2
Исследовательская	Исследовательские иммунологические анализы	a) Анализ клеток посредством анализов на основе проточной цитометрии. b) Функциональные анализы антител. c) Другие

Анализ образцов для достижения конечных точек исследования может выполняться согласно протоколу исследовательского банка тканей OVC Biobank (REC: 16/SC/0141).

Исследуемые продукты	a) ChAdOx1 nCoV-19, вектор на основе аденовируса обезьян с недостаточной репликацией, экспрессирующий шиповидный (S) белок SARS-CoV-2.

b) 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций

Состав	Жидкость
Путь введения	Внутримышечно (IM) в дельтовидную область плеча
Доза на введение	5 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1 nCoV-19 Физиологический раствор для инъекций в том же объеме, что и в исследуемых группах

СОКРАЩЕНИЯ

AdHu	Аденовирус человека
AdHu5	Аденовирус человека серотипа 5
AE	Нежелательное явление
AID	Аутоиммунное заболевание
CCVTM	Центр клинической вакцинологии и тропической медицины, Оксфорд
CBF	Центр клинического биопроизводства
CEF	Фибробласт эмбриона курицы
ChAd63	Аденовирус шимпанзе 63
CI	Доверительный интервал
COP	Свод правил
CRF	Индивидуальная регистрационная форма или Центр клинических исследований
CS или CSP	Циркумспорозоитный белок
CTRG	Управление клинических испытаний и исследований, Оксфордский университет
CTL	Цитотоксический Т-лимфоцит
DSUR	Обновляемый отчет по безопасности разрабатываемого лекарственного препарата
ELISPOT	Иммуноферментный спот-анализ
GCP	Надлежащая клиническая практика
GMO	Генетически модифицированный организм
GMT	Среднее геометрическое значение титра

GP	Врач общей практики
GSK	GlaxoSmithKline
HCG	Хорионический гонадотропин человека
HBV	Вирус гепатита B
HEK	Почка человеческого эмбриона
HCV	Вирус гепатита C
HIV	Вирус иммунодефицита человека
HLA	Лейкоцитарный антиген человека
HRA	Управление по исследованиям в области здравоохранения
HTLV	Т-лимфотропный вирус человека
IB	Брошюра исследователя
ICH	*Международная конференция по гармонизации*
ICMJE	*Международный комитет редакторов медицинских журналов*
ICS	*Внутриклеточное окрашивание цитокинов*
IDT	Компания Impfstoffwerk Dessau-Tornau Biologika GmbH
ID	Внутрикожное
IFNγ	Интерферон гамма
IM	Внутримышечное
IMP	Исследуемый лекарственный препарат
IMP-D	Досье исследуемого лекарственного препарата
IV	Внутривенное
LSOC	Местный клиницист, осуществляющий контроль за обеспечением безопасности
ME-TRAP	Множественные эпитопы и адгезивный белок, связанный с тромбоспондином
MHRA	Агентство по регулированию лекарственных средств и изделий медицинского назначения
MVA	Модифицированный вирус осповакцины Анкара
NANP	Фосфатаза N-ацетилнейраминовой кислоты
NHS	Национальная служба здравоохранения
NIH	Национальные институты здравоохранения
NIHR	Национальный институт исследований в области здравоохранения
PBMC	*Мононуклеарная клетка периферической крови*

Pb	*Плазмодий Berghei*
PCR	Полимеразная цепная реакция
PI	Главный исследователь
БОЕ	Бляшкообразующая единица
QP	Квалифицированное лицо
qPCR	Количественная полимеразная цепная реакция
QS21	Молекула сапонина *Quillaja saponaria*
REC	Комитет по этике исследований
SAE	Серьезное нежелательное явление
П/к	Подкожное
SmPc	Краткие характеристики продукта
SOP	Стандартная операционная процедура
SUSAR	Предполагаемая непредвиденная серьезная нежелательная реакция
мкг	микрограмм
в. ч.	вирусная частица
VV	вирусный вектор
WHO	Всемирная организация здравоохранения

3.1. Предпосылки

Новый коронавирус, известный как 2019-nCoV [1], впоследствии был переименован в SARS-CoV-2, поскольку он схож с коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV), бета-коронавирус линии B. SARS-CoV-2 принадлежит к филогенетической линии B рода *Betacoronavirus* и распознает ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) в качестве рецептора проникновения [4].

Шиповидный белок представляет собой тримерный трансмембранный гликопротеин I типа, расположенный на поверхности вирусной оболочки CoV, который можно разделить на две функциональные субъединицы: N-концевую S1 и C-концевую S2. S1 и S2 отвечают за связывание клеточных рецепторов через рецептор-связывающий домен (RBD) и слияние вируса и клеточных мембран соответственно, опосредуя тем самым проникновение SARS-CoV-2 в клетки-мишени. [3] Роль S в связывании рецептора и слиянии с мембраной делает его идеальной мишенью для разработки вакцин и противовирусных препаратов, поскольку он является основной мишенью для нейтрализующих антител.

Вакцина ChAdOx1 nCoV-19 состоит из вектора на основе аденовируса обезьян ChAdOx1 с недостаточной репликацией, содержащего структурный поверхностный гликопротеин (шиповидный белок) SARS CoV-2 (nCoV-19), являющийся антигеном, с лидерной сигнальной последовательностью тканевого активатора плазминогена (tPA). ChAdOx1 nCoV-19 экспрессирует кодон-оптимизированную кодирующую последовательность для шиповидного белка из последовательности генома под номером доступа в GenBank: MN908947. Было показано, что лидерная последовательность tPA способствует повышению иммуногенности другой CoV-вакцины на основе вектора ChAdOx1 (ChAdOx1 MERS) [5].

3.2.1. Иммуногенность

Мышей (balb/c и CD-1) иммунизировали с помощью ChAdOx1, экспрессирующего шиповидный белок SARS-CoV-2 или зеленый флуоресцентный белок (GFP). Селезенки собирали для процедуры оценки ответов с помощью ELISpot IFY, а образцы сыворотки крови отбирали для процедур оценки ответов с выработкой антител, специфичных в отношении S1 и S2, с помощью ELISA через 9 или 10 дней после вакцинации. Результаты этого исследования показали, что однократная доза ChAdOx1 nCoV являлась иммуногенной у мышей.

Фигура 4. Суммарные ответы согласно ELISpot в отношении IFN-γ селезенки для мышей BALB/c (левая панель) и CD-1 (правая панель), развившиеся в ответ на пептиды,

охватывающие шиповидный белок из SARS-CoV-2, через девять или десять дней после вакцинации с помощью 1,7 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1 nCoV-19 или 8 x 10^{9} в. ч. ChAdOx1 с GFP. Изображено среднее значение с SEM.

Фигура 5. Диаграмма типа "ящик с усами" для оптических плотностей после анализа ELISA сыворотки крови мыши BALB/C (верхняя панель), инкубированной с очищенным белком, охватывающим домен S1 (слева), или очищенным белком, охватывающим домен S2 (справа), шиповидного отростка SARS-CoV-2 через девять или десять дней после вакцинации с помощью 1,7 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1 nCoV-19 или 8 x 10^{9} в. ч. ChAdOx1 с GFP. Диаграммы типа "ящик с усами" для оптических плотностей после анализа ELISA сыворотки крови мыши CD-1 (нижняя панель), инкубированной с очищенным белком, охватывающим домен S1 (слева), или очищенным белком, охватывающим домен S2 (справа), шиповидного отростка SARS-CoV-2.

3.2.2. Эффективность

В настоящее время проводятся доклинические исследования эффективности ChAdOx1 nCoV-19 у хорьков и приматов.

1.2. Обоснование

Эпидемия COVID-19 вызвала серьезные сбои в работе систем здравоохранения со значительными социально-экономическими последствиями. Меры по сдерживанию не смогли остановить распространение вируса, которое быстро приближается к уровню пандемии. В настоящее время не существует специфических средств лечения, направленных против COVID-19, и срочно требуется проведение ускоренной разработки вакцины.

Живые аттенуированные вирусы исторически были одной из доступных платформ, характеризующихся наибольшей иммуногенностью, поскольку они обладают способностью презентировать несколько антигенов на протяжении жизненного цикла вируса, представленных в своих естественных конформациях. Однако изготовление живых аттенуированных вирусов требует сложных мер по сдерживанию и обеспечения биологической безопасности. Кроме того, живые аттенуированные вирусы несут риск неадекватной аттенуации, вызывающей диссеминированное заболевание, особенно у хозяев с ослабленным иммунитетом. Учитывая, что тяжелая форма заболевания и смертельный исход в результате COVID-19 непропорционально затрагивают пожилых людей с сопутствующими заболеваниями, создание живой аттенуированной вирусной вакцины является менее приемлемым вариантом. Репликационно-компетентные вирусные векторы могут представлять аналогичную угрозу развития диссеминированного

заболевания у лиц с ослабленным иммунитетом. Однако векторы с недостаточной репликацией позволяют избегать такого риска, сохраняя при этом преимущества презентации нативного антигена, индуцирования Т-клеточного иммунитета и способности экспрессировать несколько антигенов [9]. Субъединичные вакцины обычно требуют использования адъювантов, и хотя ДНК- и РНК-вакцины могут иметь преимущества в отношении изготовления, они часто характеризуются плохой иммуногенностью, требуя многократных доз, что крайне нежелательно в условиях пандемии.

Вакцинные векторы на основе аденовируса шимпанзе были безопасно введены тысячам людей с использованием широкого спектра инфекционных заболеваний-мишеней. Вакцины на основе вектора ChAdOx1 были введены более чем 320 добровольцам без каких-либо проблем, связанных с безопасностью, и было продемонстрировано, что они обладают высокой иммуногенностью при введении однократной дозы. Важно отметить, что в недавних клинических испытаниях однократная доза вакцины на основе вектора ChAdOx1, экспрессирующего полноразмерный шиповидный белок другого бета-коронавируса (MERS-CoV), индуцировала выработку нейтрализующих антител.

Данные, полученные в данном исследовании, будут использованы для поддержки дальнейших более крупных исследований эффективности фазы II/III, которые будут включать целевые группы с более высоким риском развития тяжелого заболевания.

4. ЦЕЛИ И КОНЕЧНЫЕ ТОЧКИ

Цели	**Критерии эффективности**	**Момент(-ы) времени для проведения оценки данного критерия эффективности**
Основная цель Оценить эффективность ChAdOx1 nCoV-19 против COVID-19	а) Вирусологически подтвержденные (ПЦР-положительные) симптоматические случаи COVID-19	На протяжении всего исследования
Сопервичная цель Оценить безопасность вакцины-кандидата ChAdOx1 nCoV	а) Частота возникновения серьезных нежелательных явлений (SAE) на протяжении всего исследования.	На протяжении всего исследования
Второстепенные цели Оценить профиль безопасности, переносимости и реактогенности	а) частота возникновения ожидаемых признаков и симптомов местной реактогенности в течение 7 дней после вакцинации;	Дни 0-6 Самостоятельно сообщаемые симптомы, зарегистрированные с

вакцины-кандидата ChAdOx1 nCoV	b) частота возникновения ожидаемых признаков и симптомов системной реактогенности в течение 7 дней после вакцинации; c) частота возникновения неожиданных нежелательных явлений (AE) в течение 28 дней после вакцинации; d) изменение от исходного уровня для лабораторных количественных показателей безопасности и f) частота возникновения SAE, представляющего особый интерес: эпизоды усиления заболевания	использованием электронных дневников Дни 0-6 Самостоятельно сообщаемые симптомы, зарегистрированные с использованием электронных дневников Дни 0-27 Самостоятельно сообщаемые симптомы, зарегистрированные с использованием электронных дневников Образцы крови, взятые при включении в исследование (до вакцинации) в дни 2, 7 и 28 На протяжении всего исследования
Оценить эффективность ChAdOx1 nCoV-19 против COVID-19	a) Случаи госпитализации в связи с COVID-19; b) Поступления в отделение интенсивной терапии (ICU), связанные с COVID-19; c) Случаи летального исхода, связанные с COVID-19; d) Сероконверсия против антигенов, не относящихся к шиповидному отростку, измеренная с помощью ELISA	На протяжении всего исследования На протяжении всего исследования На протяжении всего исследования Образцы крови, взятые в D0, D28 и D182 (D364 необязательно)
Оценить клеточную и гуморальную иммуногенность ChAdOx1 nCoV-19	a) Иммуноферментный спот-анализ (ELISpot) с использованием интерферона-гамма (IFN-γ) для оценки ответов в отношении шиповидного белка SARS-CoV-2; b) твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для	См. график посещений

	количественного определения антител к шиповидному белку SARS-CoV-2 (коэффициенты сероконверсии); c) анализы вируснейтрализующих антител (NAb) к живому вирусу и/или псевдотипу вируса SARS-CoV-2	
Исследовательские цели Исследовательские иммунологические анализы	a) Анализ клеток посредством анализов на основе проточной цитометрии. b) Функциональные анализы антител. c) Другие	См. график посещений

Анализ образцов для достижения конечных точек исследования может выполняться согласно одобренному с этической точки зрения протоколу OVC Biobank.

5. ПЛАН ИСПЫТАНИЯ

Это исследование, представляет собой односторонне слепое рандомизированное плацебо-контролируемое индивидуально рандомизированное исследование фазы I/II с участием здоровых взрослых в возрасте 18-55 лет, набор которых осуществляется в Великобритании. ChAdOx1 nCoV-19 или физиологический раствор в качестве плацебо будут вводиться внутримышечно в дельтовидную мышцу. В исследовании будет проводиться оценка эффективности, безопасности и иммуногенности ChAdOx1 nCoV-19.

Будет предусматриваться 3 группы исследования по 250 добровольцев в каждой группе вакцины (ChAdOx1 nCoV-19 или физиологический раствор) в случае вместе взятых групп 1 и 2 и 10 участников в группе 3 с общим размером выборки 510 (таблица 1). Рандомизация будет выполняться при соотношении средства вмешательства и плацебо 1:1. Рандомизировать будут только участников, включенных в группы 1 и 2. Для участников группы 3 режим заслепления предусматриваться не будет.

Постадийное включения в исследование будет применяться по отношению к первым добровольцам, получающим IMP, как описано в разделе 7.4.2.2. Участников сначала будут набирать в группы 1 и 3. Как только группы 1 и 3 будут полностью набраны, последующих добровольцев будут включать в группу 2.

Оценка безопасности будет проводиться в режиме реального времени, а промежуточные проверки запланированы после того, как 1, 4, 54 и 100 участников получат IMP.

DSMB будет периодически оценивать данные по безопасности и эффективности каждые 4-8 недель и/или по мере необходимости.

Участники будут находиться под наблюдением на протяжении всего исследования для регистрации нежелательных явлений и эпизодов вирусологически подтвержденных симптоматических случаев COVID-19. Для целей анализа будет применяться протокольное определение случаев COVID-19. Случаи COVID-19 и связанные с ними события будут определяться как:

a) Лихорадка и/или симптомы инфекции верхнего отдела респираторного тракта, ассоциированные с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2.
b) Случай госпитализации в связи с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2.
c) Случаи поступления в отделение интенсивной терапии (ICU), ассоциированные с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2.

d) Летальный исход, ассоциированный с положительным результатом ПЦР на SARS-CoV-2.

e) Сероконверсия в отношении антигенов SARS-CoV-2, не относящихся к шиповидному отростку.

Умеренную и тяжелую формы заболевания COVID-19 будут определять с использованием клинических критериев. Подробные клинические параметры будут собираться из медицинских карт и соотноситься с согласованными определениями по мере их появления. Вероятно, они будут включать без ограничения, среди прочих клинически значимых параметров, насыщение кислородом, потребность в кислородной терапии, частоту дыхания и другие основные показатели жизненно важных функций, потребность в искусственной вентиляции легких, рентгенографию и КТ-сканирование и результаты анализа крови.

5.1. Группы исследования

Таблица 3. Группы исследования

Группа	**Число добровольцев**	**Доза**	**Путь введения**
1a	44	ChAdOx1 nCoV-19 5 x 10^{10} в. ч.	IM
1b	44	Физиологический раствор в качестве плацебо	IM
2a	206	ChAdOx1 nCoV-19 5 x 10^{10} в. ч.	IM
2b	206	Физиологический раствор в качестве плацебо	IM
3	10	Гомологичный режим "прайм-буст" 5 x 10^{10} в. ч.	IM

5.2. Добровольцы для участия в испытании

В исследование будут включать здоровых взрослых добровольцев в возрасте 18-55 лет. Добровольцев будут считать включенными в исследование сразу после первой вакцинации.

5.3. Определение окончания испытания

Окончанием испытания являлась дата последнего анализа, проведенного с использованием последнего собранного образца.

5.4. Продолжительность исследования

Общая продолжительность исследования будет составлять 6 месяцев со дня включения в исследование для всех добровольцев с необязательным 12-месячным последующим наблюдением.

6.1. Идентификация добровольцев для участия в испытании

Набор здоровых взрослых в Великобритании будут осуществлять с использованием объявлений +/- регистрационной формы, официально одобренной комитетом(-ами) по этике. Все добровольцы будут подписывать и датировать форму информированного согласия перед выполнением каких-либо конкретных процедур в рамках исследования.

Критерии включения

Доброволец должен удовлетворять всем следующим критериям, чтобы быть допущенным к участию в исследовании:

- Здоровые взрослые в возрасте 18-55 лет.
- Способность и желание (по мнению исследователя) соблюдать все требования исследования.
- Готовность предоставлять исследователям возможность обсуждения истории болезни добровольца со своим врачом общей практики, а также получения доступа ко всем медицинским записям, в случае если они будут иметь отношение к процедурам исследования.
- Только для женщин: готовность непрерывно пользоваться эффективными средствами контрацепции (см. ниже) во время исследования и отрицательный результат теста на беременность в день(дни) скрининга и вакцинации.
- Согласие воздержаться от сдачи крови во время исследования.
- Предоставление информированного согласия в письменной форме.

Критерии исключения

Доброволец не может участвовать в исследовании, если применимо любое из следующего:

- Предварительное получение любых вакцин (лицензированных или экспериментальных) за $\leq$ 30 дней до включения в исследование.
- Запланированное получение любой вакцины, кроме исследуемого средства вмешательства, в течение 30 дней до и после каждой предусматриваемой исследованием процедуры вакцинации.

- Ранее имевшее место получение исследуемой или лицензированной вакцины, вероятно, повлияет на интерпретацию данных, полученных в испытании (например, вакцин на основе аденовирусного вектора, любых вакцин против коронавируса).
- Введение иммуноглобулинов и/или любых препаратов крови в течение трех месяцев, предшествующих запланированному введению вакцины-кандидата.
- Любое подтвержденное или подозреваемое состояние иммуносупрессии или иммунодефицита, включая ВИЧ-инфекцию; асплению; рецидивирующие тяжелые инфекции и длительное применение (в течение более чем 14 дней) иммуносупрессивного лекарственного препарата в промежутке последних 6 месяцев (применение ингаляционных и местных стероидов разрешено).
- Наличие в анамнезе аллергического заболевания или реакций, которые, вероятно, будут усугублены любым компонентом вакцины.
- Наличие в анамнезе любого эпизода наследственного ангионевротического отека или идиопатического ангионевротического отека.
- Наличие в анамнезе любого эпизода анафилаксии в связи с вакцинацией.
- Беременность, лактация или готовность/намерение забеременеть во время исследования.
- Наличие рака в анамнезе (за исключением базально-клеточной карциномы кожи и карциномы шейки матки in situ).
- Наличие в анамнезе серьезного психического расстройства, которое, вероятно, повлияет на участие в исследовании.
- Нарушение свертываемости крови (например, дефицит фактора свертывания крови, коагулопатия или нарушение, связанное с тромбоцитами) или наличие в анамнезе ранее имевших место эпизодов значительного кровотечения или кровоподтеков после внутримышечных инъекций или венопункции.
- Любое другое серьезное хроническое заболевание, требующее нахождения под наблюдением специалиста в больнице.
- Предполагаемое или известное текущее злоупотребление алкоголем, определяемое как количество потребляемого алкоголя, составляющее более чем 42 единицы каждую неделю.
- Предполагаемое или известное злоупотребление инъецируемыми наркотическими средствами в течение 5 лет, предшествующих включению в исследование.

- Любое клинически значимое отклонение от нормы, обнаруженное при скрининговых процедурах биохимического анализа, гематологических анализов крови или анализа мочи.
- Любое другое серьезное заболевание, нарушение или наблюдение, которые могут значительно увеличить риск для добровольца вследствие его участия в исследовании, повлиять на способность добровольца участвовать в исследовании или ухудшить интерпретацию полученных в ходе исследования данных.
- Наличие в анамнезе лабораторно подтвержденного COVID-19.

6.3.3. Критерии исключения для ревакцинации

Следующие AE, ассоциированные с любой вакциной или выявленные в день вакцинации или за день до нее, представляют собой абсолютные противопоказания для дальнейшего введения IMP рассматриваемому добровольцу. Если любое из этих событий произойдет во время исследования, то субъект будет исключен из исследования и будет находиться под наблюдением группы клиницистов или своего GP до разрешения или стабилизации явления:

- анафилактическая реакция после введения вакцины;
- беременность.

6.1.1. Эффективная контрацепция для женщин-добровольцев

Женщины-добровольцы детородного возраста должны использовать эффективную форму контрацепции в ходе исследования (т. е. до их последнего визита последующего наблюдения).

6.1.2. Предупреждение "чрезмерного волонтерства"

Добровольцы будут исключаться из исследования, если они параллельно участвуют в другом испытании, в котором IMP вводили в течение 30 дней до включения или будут вводить в течение периода испытания.

6.1.3. Исключение добровольцев

В соответствии с принципами текущей редакции Хельсинкской декларации и любыми другими применимыми правилами доброволец имеет право отказаться от участия в исследовании в любое время и по любой причине и не обязан приводить причины его или ее отказа от участия.

Если доброволец исключается из исследования, то данные и образцы крови, собранные до его исключения, все равно будут использоваться для анализа. Хранение образцов крови будет продолжаться, если участник конкретно не потребует обратного.

Во всех случаях исключения субъекта сбор долгосрочных данных относительно безопасности, включая некоторые процедуры, такие как анализы крови на безопасность, будут продолжать выполняться, если субъекты получали одну или несколько доз вакцины, если только они не откажутся от нахождения под дальнейшим наблюдением.

6.2. Беременность

Если доброволец забеременеет во время испытания, то дальнейшее введение IMP осуществляться не будет. Она будет находиться под наблюдением для оценки клинической безопасности с ее постоянного согласия и, кроме того, будет находиться под наблюдением до тех пор, пока не будет определен исход беременности.

7. ПРОЦЕДУРЫ, ПРЕДУСМАТРИВАЕМЫЕ ИСПЫТАНИЕМ

В данном разделе описаны процедуры, предусматриваемые испытанием, для оценки участников исследования и последующего наблюдения после введения исследуемой вакцины.

7.1. График посещения

Все добровольцы в группах 1 будут иметь одинаковый график посещений клиники и прохождения процедур, как указано в графиках посещения (таблица 6). Группа 2 будет посещать клинику и проходить процедуры, как указано в графиках посещений ниже (таблица 7). Группа 3 будет посещать клинику и проходить процедуры, как указано в графиках посещений ниже (таблица 8). Субъекты будут получать либо вакцину ChAdOx1 nCoV-19, либо физиологический раствор в качестве плацебо и проходить последующее наблюдение в течение 6 месяцев с необязательным визитом через 1 год после включения в исследование. Общий объем крови, сданной во время исследования, будет составлять 225-420 мл в зависимости от того, к какой группе они относились. Дополнительные визиты или процедуры могут выполняться по усмотрению исследователей, например, дополнительное изучение истории болезни и физикальное обследование, микроскопия мочи в случае положительного результата анализа мочи или дополнительные анализы крови, если это является клинически значимым.

7.2. Наблюдения

Пульс, кровяное давление и температуру будут измерять в моменты времени, указанные в графике процедур, а также могут измеряться в рамках физикального обследования, если их проведение было указано в другие моменты времени.

7.3. Анализы крови и анализ мочи

Кровь будут забирать для последующих лабораторных тестов и обрабатывать в согласованных лабораториях NHS Trust с использованием нижеследующих стандартных процедур NHS:

- **Гематологический анализ**; общий анализ крови;
- **Биохимический анализ**; натрий, калий, мочевина, креатинин, альбумин, функциональные тесты печени (ALT, ALP, билирубин);
- **Диагностические серологические анализы**; HBsAg, антитела к HCV, антитела к ВИЧ (будут получать специальное согласие перед тестированием крови на наличие этих передающихся через кровь вирусов);
- **Иммунологические анализы**; типирование лейкоцитарных антигенов человека (HLA).

Дополнительные анализы крови на безопасность могут выполняться, если они являются клинически значимыми, по усмотрению исследователей с медицинской квалификацией.

В исследовательских лабораториях Оксфордского университета предусматриваются:

- **Иммунологические анализы**; оценка иммуногенности будет проводиться с помощью различных иммунологических анализов. Они могут включать определение антител к антигенам, относящимся к шиповидному отростку и не относящимся к шиповидному отростку SARS-CoV, с помощью ELISA, ex vivo анализов ELISpot для гамма-интерферона и анализов на основе проточной цитометрии, анализов на нейтрализующие антитела и других функциональных анализов на антитела, а также анализов с использованием B-клеток. Другие исследовательские иммунологические анализы, включая анализ с использованием цитокинов и другие анализы на антитела, анализ ДНК на генетические полиморфизмы, потенциально имеющие отношение к иммуногенности вакцины, а также исследования экспрессии генов, среди прочего, могут выполняться по усмотрению исследователей.
- **Анализ мочи**; мочу будут тестировать на белок, кровь и глюкозу при скрининге. Только для женщин-добровольцев мочу будут тестировать на бета-субъединицу хорионического гонадотропина человека (β-HCG) при скрининге и непосредственно перед вакцинацией.

Образцы, которые должны храниться для будущих исследований, будут передаваться в OVC Biobank (REC 16/SC/0141).

7.4. Визиты в рамках исследования

Процедуры, которые подлежат включению в каждый визит, задокументированы в графике посещений (таблицы 6-8).

7.4.1. Скрининговый визит

Все потенциальные добровольцы будут проходить скрининговый визит, который может иметь место не позднее, чем за 90 дней до вакцинации. Перед скринингом будет осуществляться получение информированного согласия.

При соответствии требованиям добровольцу будут назначаться визит дня 0 для получения вакцины и последующее наблюдение.

7.4.2. День 0: визит для включения в исследование и вакцинации

Добровольцы будут считаться включенными в испытание с момента вакцинации. Перед вакцинацией/применением испытуемого средства вмешательства будет осуществляться проверка соответствия добровольца требованиям включения в исследование. Будут проводиться наблюдения за пульсом, кровяным давлением и температурой и, при необходимости, могут проводиться изучение истории болезни и физикальное обследование, чтобы определить необходимость отложить вакцинацию. Процедуры вакцинации будут проводиться, как описано ниже.

7.4.2.1. Вакцинация

Все вакцины и физиологический раствор в качестве плацебо будут путем инъекции вводиться внутримышечно в соответствии с конкретными SOP. Место инъекции будет покрыто стерильной повязкой, и доброволец будет оставаться в центре проведения испытания для наблюдения в случае возникновения немедленных нежелательных явлений. Наблюдения будут проводиться в течение 60 минут после вакцинации (+/- 30 минут), после чего будут проводиться удаление стерильной повязки и осмотр места инъекции.

Во всех группах добровольцам будут выдавать оральный термометр, измерительную ленту и дневник пациента (бумажный или электронный) с инструкциями по применению, а также 24-часовой номер экстренной связи для связи с дежурным врачом-исследователем в случае необходимости. Добровольцев будут инструктировать относительно того, как самостоятельно оценивать тяжесть данных АЕ. В дневнике пациента также будет иметься место для самостоятельного документирования нежелательных АЕ, а также того, принимался ли какой-либо лекарственный препарат для облегчения симптомов. Дневники пациента будут обеспечивать сбор информации о сроках и серьезности нижеследующих ожидаемых АЕ.

Таблица 4. ***Ожидаемые AE, собранные в дневниках пациента после вакцинации***

Местные ожидаемые AE	**Системные ожидаемые AE**
Боль	Лихорадка
Болезненность	Лихорадочное состояние
	Зябкость
Покраснение	Боли в суставах
Повышение температуры	Мышечные боли
Зуд	Утомляемость
Припухлость	Головная боль
Уплотнение	Недомогание
	Тошнота

7.4.2.2. Последовательность включения в исследование и вакцинации добровольцев

До начала исследования любые новые доступные данные относительно безопасности будут рассматриваться применительно к испытаниям на животных или клиническим испытаниям вакцин против коронавируса, которые тестировались в рамках других исследований, и при необходимости будут обсуждаться с DSMB и/или MHRA. Из соображений безопасности первого добровольца, подлежащего получению IMP, будут вакцинировать раньше каких-либо других участников, а профиль нежелательных явлений будет рассматриваться через 48 часов (±24 ч) после вакцинации. При условии отсутствия проблем, связанных с безопасностью, по оценке исследователей и/или председателя DSMB еще 3 добровольца будут вакцинировать с помощью IMP по прошествии по меньшей мере 48 часов (±24 ч) после первой вакцинации и с интервалом друг от друга, составляющим по меньшей мере 1 час. Профиль AE будет оцениваться исследователями с медицинской квалификацией в режиме реального времени и через 48 часов (±24 ч) после получения IMP первыми 4 участниками, при этом дальнейшие процедуры вакцинации будут продолжаться при условии отсутствия проблем, связанных с безопасностью. Соответствующим исследователям и председателю DSMB будет предложено принять решение о том, можно ли проводить дальнейшие процедуры вакцинации после того, как первые 4 участника получили IMP. Если на данном этапе возникнут вопросы в отношении безопасности, то можно будет также проконсультироваться со всеми членами DSMB.

Рассмотрение будет проводиться на основании накопленных данных относительно безопасности для первых 54 участников, получавших IMP. Включение в исследование вплоть до 100 участников будут продолжать только в том случае, если CI и/или другие назначенные соответствующие исследователи и председатель DSMB оценят данные, как

указывающие на то, что это является безопасным. На данном этапе любые новые данные относительно иммунопатологии из доклинических исследований с заражением, проводимых на хорьках и приматах, отличных от человека, будут оцениваться CI и/или другими назначенными соответствующими исследователями и DSMB до включения в исследование вплоть до 100 участников.

Второе рассмотрение будет проводиться на основании накопленных данных относительно безопасности для 100 участников, получавших IMP, до включения в исследование остальных участников. Включение в исследование остальных 160 участников, получающих IMP, будут продолжать только в том случае, если CI и/или другие назначенные соответствующие исследователи и DSMB оценят данные, как указывающие на то, что это является безопасным. В таблице ниже представлена примерная последовательность набора участников.

Если станут доступными другие партии IMP, то к этим новым партиям будут применяться те же процедуры постадийного включения в исследование.

7.4.3. Последующие визиты

Визиты последующего наблюдения будут проходить в соответствии с графиком посещений, описанным в таблицах 6-8, в своих соответствующих временных окнах. Оценка добровольцев будет проводиться в отношении местных и системных нежелательных явлений, промежуточного анамнеза, результатов физикального обследования, анализирования дневников пациента (бумажных или электронных) и анализов крови в данные моменты времени, как указано в графике посещений. Кровь также будет забираться для иммунологических целей.

Если у добровольцев возникают нежелательные явления (лабораторные или клинические), которые исследователь (врач), CI и/или председатель DSMB определяют как подлежащие дальнейшему тщательному наблюдению, то доброволец может быть госпитализирован в больницу NHS для наблюдения и дальнейшего медицинского обслуживания под наблюдением врача-консультанта по вызову.

7.4.4. Участники на карантине

С учетом развивающейся эпидемиологической ситуации как во всем мире, так и в Великобритании, если участник находится на карантине и не может присутствовать ни на одном из запланированных визитов, будет организована консультация по телефону, чтобы получить основные получаемые в ходе исследования данные, когда это возможно.

7.4.5. Изменения номеров групп

Если для завершения введения доз в ходе испытания потребуются другие партии IMP, то будут применяться те же постадийные процедуры включения в исследование, описанные в разделе 7.4.2.2. В данном случае размер выборки в группе 1 будет увеличен на 88 участников на новую партию без увеличения общего размера выборки (т. е. количество участников в группе 2 будет уменьшено на такое же число). Это является необходимым для обеспечения сопоставимости данных в отношении безопасности и иммуногенности для разных партий.

Таблица 6. График посещений для участников группы 1

Номер посещения	1[S]	2	3	4	5	6	7	8	9
Хронология событий** (дни)	≤ 90	0	2	7	14	28	56	182	364 (необязательно)
Временное окно (дни)			±1	±2	±3	±7	±7	±14	±30
Информированное согласие	X								
Рассмотрение противопоказаний, критериев включения и исключения	X	X							
Вакцинация		X							
Основные показатели жизненно важных функций^	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Установление нежелательных явлений		X	X	X	X	X	X	X	X
Предоставление дневников пациента		X							
Сбор дневников пациента						X			
История болезни, физикальное обследование	X	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Биохимический анализ, гематологический анализ (мл)	5	5	5	5		5			
Исследовательские иммунологические анализы (мл)		50		10	50	50	50	50	50
Анализ мочи	X								
bHCG мочи (только для женщин)	X	X							
Типирование HLA (мл)		4							
HBsAg, антитела к HCV, серологический анализ на ВИЧ (мл)	5								
Объем крови за визит	10	59	5	15	50	55	50	50	50
Совокупный объем крови[%]	10	69	74	89	139	194	244	294	344

S = скрининговый визит; (X) = если это считалось необходимым ^ = основные показатели жизненно важных функций включают пульс, кровяное давление и температуру.

** Хронология событий указана только примерно. Точные временные рамки визитов связаны со днем включения в исследование, т. е. каждый визит должен происходить через указанное количество дней после включения в исследование ± временное окно.

% Совокупный объем забранной крови для добровольцев из Оксфорда, если забор крови осуществляется в соответствии с графиком и исключая любой повторный анализ крови на безопасность, который может потребоваться.

Таблица 7. График посещений для участников группы 2

Номер посещения	1[S]	2	3	4	5
Хронология событий** (дни)	≤ 90	0	28	182	364 (необязательно)
Временное окно (дни)			±7	±14	±30
Информированное согласие	X				
Рассмотрение противопоказаний, критериев включения и исключения	X	X			
Вакцинация		X			
Основные показатели жизненно важных функций^	X	X	X	X	X
Установление нежелательных явлений		X	X	X	X
Предоставление дневников пациента		X			
Сбор дневников пациента			X		
История болезни, физикальное обследование	X	(X)	(X)	(X)	(X)
Биохимический анализ, гематологический анализ (мл)	5	5	5		
Исследовательские иммунологические анализы (мл)		50	50	50	50
Анализ мочи	X				
bHCG мочи (только для женщин)	X	X			
Типирование HLA (мл)		4			
HBsAg, антитела к HCV, серологический анализ на ВИЧ (мл)	5				
Объем крови за визит	10	59	55	50	50
Совокупный объем крови[%]	10	69	124	174	224

S = скрининговый визит; (X) = если это считалось необходимым ^ = основные показатели жизненно важных функций включают пульс, кровяное давление и температуру.

** Хронология событий указана только примерно. Точные временные рамки визитов связаны со днем включения в исследование, т. е. каждый визит должен происходить через указанное количество дней после включения в исследование ± временное окно.

% Совокупный объем забранной крови для добровольцев из Оксфорда, если забор крови осуществляется в соответствии с графиком и исключая любой повторный анализ крови на безопасность, который может потребоваться.

Таблица 8. График посещений для участников группы 3

Номер посещения	1[S]	2 (V1)	3	4	5	6 (V2)	7	8	9	10	11	12
Хронология событий** (дни)	≤ 90	0	2	7	14	28	30	35	42	56	182	364 (необязательно)
Временное окно (дни)			±1	±3	±3	±7	±1	±2	±3	±3	±14	±30
Информированное согласие	X											
Рассмотрение противопоказаний, критериев включения и исключения	X	X				X						
Вакцинация		X				X						
Основные показатели жизненно важных функций^	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Установление нежелательных явлений		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Предоставление дневников пациента		X				X						
Сбор дневников пациента						X				X		
История болезни, физикальное обследование	X	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)
Биохимический анализ[$], гематологический анализ (мл)	5	5	5	5		5	5	5		5		
Исследовательские иммунологические анализы[£] (мл)		50		10	50	50		10	50	50	50	50
Анализ мочи	X											
bHCG мочи (только для женщин)	X	X				X						

Типирование HLA (мл)		4										
HBsAg, антитела к HCV, серологический анализ на ВИЧ (мл)	5											
Объем крови за визит	10	59	5	15	50	55	5	15	50	55	50	50
Совокупный объем крови[%]	10	69	74	89	139	194	199	214	264	319	369	419

S = скрининговый визит; (X) = если это считалось необходимым ^ = основные показатели жизненно важных функций включают пульс, кровяное давление и температуру.

** Хронология событий указана только примерно. Точные временные рамки визитов связаны со днем включения в исследование, т. е. каждый визит должен происходить через указанное количество дней после включения в исследование ± временное окно.

% Совокупный объем забранной крови для добровольцев из Оксфорда, если забор крови осуществляется в соответствии с графиком и исключая любой повторный анализ крови на безопасность, который может потребоваться.

7.4.3. Добровольцы с симптомами

Участников, у которых появляются симптомы во время последующего наблюдения, будут инструктировать совершить звонок в исследовательскую группу, которая затем даст консультацию в отношении того, каким образом продолжать клиническое тестирование на COVID-19 в соответствии с рабочими инструкциями по испытаниям. Участники будут получать еженедельные напоминания (по электронной почте или текстовые сообщения), чтобы связаться с исследовательской группой, если у них появились лихорадка или симптомы со стороны верхнего отдела респираторного тракта, а также если они по какой-либо причине были госпитализированы.

7.4.4. Рассмотрение медицинских записей

С согласия участников исследовательская группа запросит доступ к медицинским записям или отправит форму для сбора данных для заполнения обслуживающим медицинским персоналом при любых эпизодах COVID-19, требующих оказания медицинской помощи. Будет осуществляться сбор любых данных, которые имеют отношение к установлению конечных точек эффективности и усилению заболевания (AESI). Они, вероятно, будут включать без ограничения информацию относительно случаев госпитализации в ICU, клинических параметров, таких как, среди прочего, насыщение кислородом, значения частоты дыхания и основные показатели жизненно важных функций, потребность в кислородной терапии, потребность в искусственной вентиляции легких, результаты визуализации и анализов крови.

7.4.5. Рандомизация, заслепление и вскрытие кода

Участников будут рандомизировать для получения исследуемой вакцины или физиологического раствора в качестве плацебо при распределении в соотношении 1:1 с использованием блочной рандомизации. Размеры блоков будут отражать количество участников, которое подлежит набору на каждой стадии исследования. Первый блок будет представлять собой блок из 2 участников, за которым будет следовать блок из 6, а затем дальнейшая комбинация блоков из 2, 6 или 10 в соответствии с требованиями для достижения общих количеств для рандомизации для каждого дня.

Участников, зачисленных в группы 1 и 2, будут заслеплять в отношении того, в какую группу они были распределены, будь то предусматривающая получение исследуемой вакцины или плацебо. Заслепления исследовательского персонала, вводящего вакцину, проводиться не будет. Вакцины будут подготавливаться вне поля зрения участника, а шприцы будут покрыты непрозрачным предметом/материалом до тех пор, пока они не будут готовы к введению, чтобы обеспечить режим заслепления.

Если клиническое состояние участника требует вскрытия кода, то это будет осуществляться в соответствии с рабочей инструкцией по конкретному испытанию и распределению по группам, представленным лечащему врачу, если посчитают, что раскрытие сведений будет уместным и, вероятно, изменит клиническое ведение.

Для участников, включенных в группу 3, режим заслепления предусматриваться не будет.

7.1. Изготовление и презентация

7.1.1. Описание ChAdOx1 nCoV-19

Вакцина ChAdOx1 nCoV-19 состоит из вектора на основе аденовируса обезьян ChAdOx1 с недостаточной репликацией, содержащего антигены, представленные структурными поверхностными гликопротеинами (шиповидными белками) SARS-CoV-2.

7.2. Поставка

ChAdOx1 nCoV-19 была составлена и расфасована во флаконы в Центре клинического биопроизводства (CBF) Оксфордского университета. В CBF вакцина будет проходить сертификацию и процедуру маркировки для испытаний квалифицированным лицом (QP) перед отправкой в клинический центр.

7.3. Хранение

Вакцину хранят при номинальной температуре -80°C в закрытой морозильной камере в клиническом центре. Все перемещения исследуемых вакцин будут задокументированы в соответствии с существующей стандартной операционной процедурой (SOP). Учет, хранение, отгрузку вакцины и обращение с ней будут осуществлять в соответствии с соответствующими SOP и формами.

7.4. Введение

В день вакцинации будут обеспечивать оттаивание ChAdOx1 nCoV-19 до комнатной температуры, и ее будут вводить в течение 1 часа после извлечения из морозильной камеры. Вакцину будут вводить внутримышечно в дельтовидную мышцу недоминирующей руки (предпочтительно). Всех добровольцев будут наблюдать в отделении в течение 1 часа (±30 минут) после вакцинации. Во время введения исследуемых продуктов лекарственные средства для неотложного жизнеобеспечения и реанимационное оборудование будут находиться в немедленном доступе для оказания медицинской помощи при анафилаксии. Проведение вакцинации и обращение с IMP будут осуществлять согласно соответствующим SOP.

8.5. Обоснование для выбранной дозы

Дозу, подлежащую введению, в данном испытании выбирали на основе клинического опыта работы с аденовирусным вектором ChAdOx1, экспрессирующим различные вставки, и другими подобными вакцинами на основе аденовирусного вектора (например, ChAd63).

В исследовании с повышение дозы, предусматривающем впервые осуществляемое включение людей в исследование, с использованием вектора ChAdOx1, кодирующего антиген гриппа (FLU004), осуществляли безопасное введение ChAdOx1 NP+M1 в дозах от 5×10^8 до 5×10^{10} в. ч. Последующее рассмотрение данных идентифицировало оптимальную дозу $2{,}5 \times 10^{10}$ в. ч., уравновешивающую иммуногенность и реактогенность. Эту дозу впоследствии предоставляли более чем сотням добровольцев в многочисленных более крупных исследованиях фазы 1 в Институте Дженнера. К настоящему времени вакцины на основе вектора ChAdOx1 продемонстрировали очень хорошую переносимость. Подавляющее большинство АЕ были легкой-умеренной степени тяжести, а на данный момент каких-либо SAR не происходило.

Другой аденовирусный вектор обезьян (ChAd63) безопасно вводили в дозах не более 2×10^{11} в. ч. с оптимальной дозой 5×10^{10} в. ч., уравновешивая иммуногенность и реактогенность.

MERS001 был первым клиническим испытанием вектора ChAdOx1, экспрессирующего полноразмерный шиповидный белок из отдельного, но родственного бета-коронавируса. На данный момент ChAdOx1 MERS был введен 31 участнику при дозах в диапазоне от 5×10^9 в. ч. до 5×10^{10} в. ч. Несмотря на более высокую реактогенность, наблюдаемую при 5×10^{10} в. ч., эта доза была безопасной, с самоограничивающимися АЕ и отсутствием зарегистрированных SAR. Доза 5×10^{10} в. ч. была наиболее иммуногенной с точки зрения индуцирования нейтрализующих антител к MERS-CoV с использованием анализа с живым вирусом (Folegatti et al. Lancet Infect Dis, 2020, в печати). Учитывая результаты иммунологических анализов и профиль безопасности, наблюдаемые при использовании вакцины на основе вектора ChAdOx1 против MERS-CoV, для ChAdOx1 nCoV-19 выбирали дозу 5×10^{10} в. ч.

Поскольку данная оценка является впервые осуществляемой с участием людей оценкой антигенной вставки, представленной S-белком SARS-CoV-2, то для первых добровольцев, включаемых в исследование, будет применяться постадийное включение в исследование. Такая же процедура будет применяться, если станут доступны другие партии ChAdOx1 nCoV-19. Безопасность ChAdOx1 nCoV-19 будет отслеживаться в режиме реального

времени, и в случае возникновения неприемлемых нежелательных явлений или проблем, связанных с безопасностью, дозы будут снижены.

8.7. Плацебо

Участники, которые включены в контрольную группу, будут получать инъекцию плацебо в виде 0,9% физиологического раствора вместо ChAdOx1 nCoV-19. Объем и место инъекции будут такими же, как и для группы, получающей средство вмешательства, и участников будут подвергать заслеплению в отношении того, какую инъекцию они получают. Каждый однодозовый контейнер с физиологическим раствором будет использоваться только для одного участника. Предусматриваемый испытанием вакцины журнал учета для физиологического раствора будет вестись в каждом центре проведения испытания.

8.10. Сопутствующий лекарственный препарат

В соответствии с критериями исключения добровольцы не могут принимать участие в исследовании, если они получали любую вакцину за 30 дней до включения в исследование, или имеет место запланированное получение любой другой вакцины в течение 30 дней после каждой вакцинации, любой исследуемый продукт в течение 30 дней до включения в исследование, или если получение запланировано в течение периода исследования, или если имеет место длительное применение какого-либо (> 14 дней) из любых иммуносупрессивных лекарственных препаратов в течение 6 месяцев до включения в исследование, или если прием запланирован в любое время в течение периода исследования (применение ингаляционных и местных стероидов разрешено).

9. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ

Оценка безопасности будет проводиться по частоте, встречаемости и характеру AE и SAE, возникающих во время исследования.

9.1. Определения

9.1.1. Нежелательное явление (AE)

AE представляет собой любое неблагоприятное медицинское событие у добровольца, которое может произойти во время или после введения IMP и не обязательно имеет причинно-следственную связь со средством вмешательства. Таким образом, AE может являться любым неблагоприятным и непреднамеренным признаком (включая любые клинически значимые аномальные результаты лабораторных исследований или изменение от исходного уровня), симптомом или заболеванием, временно ассоциированным с исследуемым средством вмешательства, независимо от того, считается ли оно связанным с исследуемым средством вмешательства или нет.

9.1.2. Нежелательная реакция (AR)

AR представляет собой любой неблагоприятный или непреднамеренный ответ в отношении IMP. Это означает, что причинно-следственная связь между IMP и AE является по меньшей мере обоснованной возможностью, т. е. наличия связи исключать нельзя. Все случаи, которые по мнению подотчетного медицинского исследователя, имеют обоснованную предполагаемую причинно-следственную связь с IMP (т. е. возможно, вероятно или определенно связаны с IMP), будут квалифицироваться как AR.

Нежелательные явления, которые могут быть связаны с IMP, перечислены в брошюре исследователя для каждого продукта.

9.1.4. Серьезное нежелательное явление (SAE)

SAE представляет собой AE, которое приводит к любому из нижеследующих исходов, независимо от того, считается ли он связанным с исследуемым средством вмешательства.

- Летальный исход.
- Явление, опасное для жизни (т. е. доброволец, по мнению исследователя, подвергался непосредственной опасности летального исхода в результате произошедшего события). Это не включает AE, которое, если бы оно возникло в более тяжелой форме, могло бы привести к летальному исходу.
- Стойкая или значительная инвалидизация или недееспособность (т. е. существенное нарушение способности выполнять нормальные жизненные функции).
- Госпитализация или продление существующей госпитализации, независимо от продолжительности пребывания, даже если это является мерой предосторожности для продолжения наблюдения. Госпитализация (включая стационарную или амбулаторную госпитализацию для плановой процедуры) по поводу уже имеющегося состояния, которое не подверглось неожиданному ухудшению, не является серьезным AE.
- Важное медицинское явление (которое может не приводить к летальному исходу, быть опасным для жизни или требовать госпитализации), которое, на основании соответствующего медицинского заключения, может подвергнуть добровольца опасности и/или потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предупреждения одного из перечисленных выше исходов. Примеры таких медицинских явлений включают аллергическую реакцию, требующую интенсивного лечения в отделении неотложной помощи или клинике, дискразии крови или судороги, которые не приводят к стационарной госпитализации.
- Врожденная аномалия или врожденный порок.

9.1.5. Серьезная нежелательная реакция (SAR)

AE, которое является как серьезным, так и, по мнению подотчетного исследователя или спонсоров, рассматривается как возможно, вероятно или определенно вызванное IMP или любыми другими исследуемыми средствами лечения, исходя из предоставленной информации.

9.1.6. Предполагаемая непредвиденная серьезная нежелательная реакция (SUSAR)

SAR, характер и тяжесть которой не соответствуют информации о рассматриваемом лекарственном продукте, изложенной в IB.

9.2. Ожидаемость

В данном исследовании не ожидаются какие-либо SAE, связанные с IMP. Поэтому обо всех SAR будет сообщаться как о SUSAR.

9.3. Предсказуемые нежелательные реакции

Предсказуемые AR после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 включают боль в месте инъекции, болезненность, эритему, повышение температуры, припухлость, уплотнение, прурит, миалгию, артралгию, головную боль, утомляемость, лихорадку, лихорадочное состояние, зябкость, недомогание и тошноту.

9.4. Нежелательные явления, представляющие особый интерес

Будет отслеживаться усиление заболевания после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19. Тяжелая форма заболевания COVID-19 будет определяться с использованием клинических критериев. Подробные клинические параметры будут собираться из медицинских карт и соотноситься с согласованными определениями по мере их появления. Вероятно, они будут включать без ограничения, среди прочих клинически значимых параметров, насыщение кислородом, потребность в кислородной терапии, частоту дыхания, потребность в искусственной вентиляции легких, визуализацию и результаты анализа крови.

9.5. Причинность

Для каждого AE клиницист, делегированный CI, будет выполнять оценку взаимосвязи явления с введением вакцины. Будет выполняться интерпретация причинно-следственной связи средства вмешательства с рассматриваемым AE исходя из типа явления; взаимосвязи явления со временем введения вакцины и известными биологическими аспектами вакцинотерапии (таблица 9). Будут рассматриваться и исследоваться альтернативные причины AE, такие как естественное течение уже имеющихся медицинских состояний, сопутствующая терапия, другие факторы риска и временная взаимосвязь события с вакцинацией. Оценку причинно-следственной связи будут

выполнять во время запланированных процедур анализа безопасности, промежуточных анализов (например, если активировано правило приостановки или прекращения участия в исследовании) и при окончательном анализе безопасности, за исключением SAE, которые должны устанавливаться подотчетным исследователем немедленно, как описано в предусматриваемой SOP OVC005 Отчетности по безопасности для CTIMP.

0	**Отсутствие взаимосвязи**	Отсутствие временной взаимосвязи с исследуемым продуктом, ***и*** альтернативная этиология (клиническое состояние, воздействие окружающей среды или других средств вмешательства); ***и*** несоответствие известному паттерну ответа в отношении исследуемого продукта
1	**Маловероятная**	Маловероятная временная взаимосвязь с исследуемым продуктом, ***и*** альтернативная вероятная этиология (клиническое состояние, воздействие окружающей среды или других средств вмешательства); ***и*** несоответствие известному типичному или приемлемому паттерну ответа в отношении исследуемого продукта
2	**Возможная**	Обоснованная временная взаимосвязь с исследуемым продуктом, ***или*** явление, которое не может быть легко вызвано клиническим состоянием, воздействием окружающей среды или других средств вмешательства; ***или*** схожий паттерн ответа с таковым, наблюдаемым для других вакцин
3	**Вероятная**	Обоснованная временная взаимосвязь с исследуемым продуктом; ***и*** явление, которое не может быть легко вызвано клиническим состоянием, воздействием окружающей среды или других средств вмешательства; ***или*** известный паттерн ответа, наблюдаемый для других вакцин
4	**Определенная**	Обоснованная временная взаимосвязь с исследуемым продуктом; ***и*** явление, которое не может быть легко вызвано клиническим состоянием, воздействием окружающей среды или других средств вмешательства; ***и*** известный паттерн ответа, наблюдаемый для других вакцин

Таблица 9. *Руководство по оценке взаимосвязи введения вакцины с АЕ.*

9.6. Процедуры отчетности относительно всех нежелательных явлений

Все местные и системные AE, возникающие в течение 28 дней после каждой вакцинации, наблюдаемые исследователем или о которых сообщает доброволец, независимо от того, являются ли они связанными с исследуемым лекарственным препаратом или нет, будут регистрироваться в электронных дневниках или исследовательской базе данных. Все AE, которые приводят к исключению добровольца из исследования, будут отслеживаться до тех пор, пока не будет достигнуто их удовлетворительное разрешение или пока не будет установлена причинно-следственная связь, не связанная с исследованием (если доброволец соглашается на это). SAE и нежелательные явления, представляющие особый интерес, будут собираться в течение всего периода испытания.

9.7. Оценка степени тяжести

Тяжесть клинических и лабораторных нежелательных явлений будет оцениваться в соответствии со шкалами, приведенными в таблице 12, основывающимися на шкалах оценки токсичности FDA для здоровых и находящихся в подростковом возрасте добровольцев, участвующих в превентивных клинических испытаниях вакцины.

Нежелательное явление	**Степень**	**Интенсивность**
Боль в месте инъекции	1	Боль, которая легко переносится
	2	Боль, которая мешает повседневной деятельности
	3	Боль, которая препятствует повседневной деятельности
	4	Визит в отделение неотложной помощи или госпитализация
Болезненность	1	Легкий дискомфорт при прикосновении
	2	Дискомфорт при движении
	3	Значительный дискомфорт в покое
	4	Визит в отделение неотложной помощи или госпитализация
Эритема в месте инъекции*	1	2,5-5 см
	2	5,1-10 см
	3	> 10 см
	4	Некроз или эксфолиативный дерматит

Уплотнение/припухлость в месте инъекции	1	2,5-5 см и не мешает деятельности
	2	5,1-10 см или мешает деятельности
	3	> 10 см или препятствует повседневной деятельности
	4	Некроз

Таблица 10. Критерии оценки степени тяжести местных нежелательных явлений

*эритема ≤ 2,5 см является ожидаемым последствием прокола кожи и поэтому не будет считаться нежелательным явлением

Основные показатели жизненно важных функций	**1 степень (легкая)**	**2 степень (умеренная)**	**3 степень (тяжелая)**	**4 степень Потенциально опасное для жизни**
Лихорадка (пероральная температура)	38,0°C - 38,4°C	38,5°C – 38,9°C	39,0°C - 40°C	> 40°C
Тахикардия (уд./мин)*	101 - 115	116 – 130	>130	Визит в отделение неотложной помощи или госпитализация по поводу аритмии
Брадикардия (уд./мин)**	50 – 54	45 – 49	<45	Визит в отделение неотложной помощи или госпитализация по поводу аритмии
Систолическая гипертензия (мм рт.ст.)	141 - 150	151 – 155	≥155	Визит в отделение неотложной помощи или госпитализация по поводу злокачественной гипертензии

Диастолическая гипертензия (мм рт.ст.)	91 - 95	96 – 100	>100	Визит в отделение неотложной помощи или госпитализация по поводу злокачественной гипертензии
Систолическая гипотензия (мм рт.ст.)***	85 - 89	80 – 84	<80	Визит в отделение неотложной помощи или госпитализация по поводу гипотензивного шока
Частота дыхания – вдохов в минуту	17 - 20	21-25	>25	Интубация

Таблица 11. ***Критерии оценки степени тяжести для наблюдений при физическом осмотре*** **Измеряется после ≥ 10 минут отдыха **При частоте сердечных сокращений в покое 60-100 ударов в минуту. При характеристике брадикардии у некоторых популяций здоровых людей, например у подготовленных спортсменов, используют клиническую оценку. ***Только при наличии симптомов (например, головокружение/предобморочное состояние)*

0 СТЕПЕНЬ	Отсутствие
1 СТЕПЕНЬ	Легкая: временный или легкий дискомфорт (< 48 часов); не мешает деятельности; медицинское вмешательство/терапия не требуются
2 СТЕПЕНЬ	Умеренная: ограничение деятельности в степени от легкой до умеренной – может потребоваться некоторая помощь; не требуются или требуются минимальные медицинское вмешательство/терапия
3 СТЕПЕНЬ	Тяжелая: выраженное ограничение деятельности, обычно требуется некоторая помощь; требуются медицинское вмешательство/терапия
4 СТЕПЕНЬ	Потенциально опасно для жизни: требуется оценка в отделении неотложной помощи или госпитализация

Таблица 12. ***Критерии оценки степени тяжести местных и системных АЕ***

- **Ожидаемые местные нежелательные явления**
  - Если более чем 25% доз вакцины в данный момент времени (например, день 0, день 28) в исследуемой группе сопровождаются одинаковым ожидаемым местным

нежелательным явлением 3 степени, которое начинается в течение 2 дней после вакцинации (день вакцинации и один последующий день) и сохраняется при 3 степени в течение > 72 часов.

- **Ожидаемые системные нежелательные явления**
  - Если более чем 25% доз вакцины в данный момент времени (например, день 0, день 28) в исследуемой группе сопровождаются одинаковым ожидаемым системным нежелательным явлением 3 степени, которое начинается в течение 2 дней после вакцинации (день вакцинации и один последующий день) и сохраняется при 3 степени в течение > 72 часов.
- **Неожиданные нежелательные явления**
  - Если более чем 25% доз вакцины в данный момент времени (например, день 0, день 28) в исследуемой группе сопровождаются одинаковым неожиданным нежелательным явлением 3 степени, которое начинается в течение 2 дней после вакцинации (день вакцинации и один последующий день) и сохраняется при 3 степени в течение > 72 часов.
- **Лабораторное нежелательное явление**
  - Если более чем 25% доз вакцины в данный момент времени (например, день 0, день 28) в исследуемой группе сопровождаются одинаковым лабораторным нежелательным явлением 3 степени, которое начинается в течение 2 дней после вакцинации (день вакцинации и один последующий день) и сохраняется при 3 степени в течение > 72 часов.

9.14.2. Индивидуальные правила прекращения участия в исследовании (будут применяться только к группе, предусматривающей режим "прайм-буст")

В дополнение к изложенным выше групповым правилам приостановки участия в исследовании будут применяться правила прекращения участия в исследовании для отдельных добровольцев (т. е. показания к исключению отдельных лиц из участия в дальнейших процедурах вакцинации). Участники исследования, к которым применимо хотя бы одно из следующих правил прекращения участия в исследовании, будут исключены из участия в дальнейшей вакцинации, проводимой в рамках исследования:

- **Местные реакции:** изъязвление, абсцесс или некроз в месте инъекции.
- **Лабораторные АЕ:**

  у добровольца развивается лабораторное АЕ 3 степени в течение 7 дней после вакцинации, которое рассматривается как характеризующееся возможной, вероятной

или определенной взаимосвязью с ней, и при этом постоянно сохраняющееся при 3 степени в течение > 72 часов.

- **Системные ожидаемые нежелательные явления:**
    - у добровольца развивается системное ожидаемое AE 3 степени в течение 2 дней после вакцинации (день вакцинации и один последующий день), которое рассматривается как характеризующееся возможной, вероятной или определенной взаимосвязью с ней, и при этом постоянно сохраняющееся при 3 степени в течение > 72 часов
- **Неожиданные нежелательные явления:**
    - у добровольца имеется нежелательное явление 3 степени, которое рассматривается как характеризующееся возможной, вероятной или определенной взаимосвязью с вакцинацией, постоянно сохраняющееся при 3 степени в течение > 72 часов;
    - у добровольца имеется SAE, которое рассматривается как характеризующееся возможной, вероятной или определенной взаимосвязью с вакцинацией;
    - у добровольца имеет место острая аллергическая реакция или анафилактический шок после введения исследуемого вакцинного продукта.

Если у добровольца имеется острое респираторное заболевание (умеренное или тяжелое заболевание с лихорадкой или без нее) или лихорадка (оральная температура выше 37,8°C) в запланированное время введения исследуемого продукта/плацебо, то доброволец не будет включен в исследование, а будет исключен из участия в исследовании.

10. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

10.1. Описание статистических способов

Полностью детализированный план статистического анализа будет разработан и подписан главным исследователем до проведения любого анализа данных. Вкратце, анализ будет включать следующее.

10.1.1. Первичная оценка эффективности

Первичные конечные точки анализа эффективности включают: ПЦР-положительные симптоматические случаи COVID-19, зафиксированные Национальной службой здравоохранения.

В оценку эффективности будут включаться только явления, которые происходят более чем через 14 дней после вакцинации, чтобы дать время реципиентам вакцины выработать защитный иммунный ответ и обеспечить более точную оценку VE. Эффективность

вакцины (VE) будет рассчитываться как (1 – RR) x 100%, где RR представляет собой относительный риск симптоматической инфекции (ChADOx1 nCOV-19: контроль), и будут представлены 95% доверительные интервалы.

Совокупная заболеваемость симптоматическими инфекциями будет представлена с использованием способа Каплана-Мейера.

10.1.2. Первичная оценка безопасности

Все SAE будут представлены для каждой группы с использованием описательных анализов.

10.1.3. Вторичная оценка эффективности

Вторичные конечные точки анализа эффективности включают следующее:

1. Случаи госпитализации с положительным результатом ПЦР-теста на COVID-19.
2. Случаи поступления в отделение интенсивной терапии с положительным результатом ПЦР-теста на COVID-19.
3. Летальный исход, связанный с положительным результатом ПЦР-теста на COVID-19.
4. Сероконверсия в отношении антигенов SARS-CoV-2, не относящихся к шиповидному отростку.

Вторичные конечные точки эффективности будут анализироваться таким же образом, что и первичные конечные точки.

10.1.4. Безопасность и реактогенность

Для каждой группы будут представлены результаты подсчета и процентные значения для каждой местной и системной ожидаемой нежелательной реакции из дневников пациента, а также всех нежелательных AE и SAE, представляющих особый интерес.

10.1.5. Иммуногенность

В высокой степени ассиметричные данные относительно результатов ELISA будут подвергнуты логарифмическому преобразованию перед анализом. Среднее геометрическое значение концентрации и связанный с ним 95% доверительный интервал будут суммироваться для каждой группы в каждый момент времени путем вычисления антилогарифма средней разницы для логарифмически преобразованных данных.

Сравнения между группами будут выполняться с использованием U-критерия Манна-Уитни.

10.2. Число участников

Исследование призвано выявлять разницу в соотношениях количества случаев с симптоматической инфекцией COVID-19 между теми, кто получает исследуемую вакцину, и контрольной группой.

Если показатель пораженности симптоматическими инфекциями COVID-19 во время исследования составляет 10% в контрольной группе в течение периода оценки эффективности (после первых 14 дней исследования), то исследование будет демонстрировать 90% мощность (5% альфа) для выявления минимальной эффективности вакцины, составляющей 74%. Более высокая степень пораженности, составляющая 20%, будет обеспечивать возможность выявлять эффективность вакцины на уровне всего 53%. Эти расчеты предполагают отсутствие количественных потерь для последующего наблюдения, поскольку вполне вероятно, что участники будут мотивированы продолжать участие в исследовании, а период последующего наблюдения является относительно коротким.

Участники группы 3, получающие вакцинацию в режиме "прайм-буст", не будут включаться в оценку эффективности, так как в этой группе будет слишком мало участников, чтобы можно было точно оценить частоту явлений после осуществления графика вакцинации в режиме "прайм-буст".

10.3. Комбинированные анализы

Ожидается, что исследование фазы I/II (COV001) и исследование фазы 2/3 (COV002) будут проводиться параллельно в период высокой заболеваемости в Великобритании. Данные относительно эффективности, получаемые в обоих исследованиях, будут объединяться в проспективном мета-анализе, чтобы обеспечить более точную оценку параметров эффективности и безопасности.

Общий размер выборки*	**N1 Контроль**	**N2 nCOV-19**	**Соотношение вак.: контроль**	**Степень пораженности, контроль**	**Степень пораженности, nCOV-19**	**Минимальная VE, которая может быть выявлена**	**Ожидаемое число случаев в контрольной группе**	**Ожидаемое число случаев в группе nCOV-19**
500	250	250	1	0,1	0,026	0,74	25	6
500	250	250	1	0,2	0,094	0,53	50	23

10.3. Процедура учета недостающих, неиспользованных и ложных данных

Все доступные данные будут включены в анализ

10.4. Включение в анализ

Всех вакцинированных участников будут включать в анализ и анализировать в соответствии с полученной вакциной.

11.5. Качество данных

Инструменты сбора данных будут подвергнуты соответствующей валидации для обеспечения точности и полноты сбора данных. Наборы данных, предоставляемые для анализа, будут подлежать процедурам контроля качества, чтобы гарантировать, что проанализированные данные являются истинным отражением исходных данных.

Управление данными, получаемыми в испытании, будет осуществляться в соответствии с местными SOP по управлению данными. В случае возникновения необходимости в дополнительных конкретных процедурах в рамках исследования будет реализован утвержденный план управления данными.

ПРОЦЕДУРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА

11.1. Процедуры с участием исследователя

Стандартные операционные процедуры (SOP) для конкретного центра будут использоваться во всех клинических и лабораторных центрах.

11.2. Мониторинг

Регулярный мониторинг будет выполняться в соответствии с GCP монитором исследования.

14.1. Хельсинкская декларация

Исследователи будут обеспечивать проведение этого исследования в соответствии с принципами текущей редакции Хельсинкской декларации.

18. Список литературы

1. Zhu, N., et al., *A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019.* New England Journal of Medicine, 2020. **382**(8): p. 727-733.
2. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.* Lancet (London, England), 2020. **395**(10224): p. 565-574.
3. Li, F., *Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins.* Annual review of virology, 2016. **3**(1): p. 237-261.
4. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.* Nature, 2020.

5. Alharbi, N.K., et al., *ChAdOx1 and MVA based vaccine candidates against MERS-CoV elicit neutralising antibodies and cellular immune responses in mice.* Vaccine, 2017. **35**(30): p. 3780-3788.

6. Antrobus, R.D., et al., *Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens.* Mol Ther, 2014. **22**(3): p. 668-74.

7. Coughlan, L., et al., *Heterologous Two-Dose Vaccination with Simian Adenovirus and Poxvirus Vectors Elicits Long-Lasting Cellular Immunity to Influenza Virus A in Healthy Adults.* EBioMedicine, 2018.

8. Wilkie, M., et al., *A phase I trial evaluating the safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccination regimen, ChAdOx1 85A prime - MVA85A boost in healthy UK adults.* Vaccine, 2020. **38**(4): p. 779-789.

9. Modjarrad, K., *MERS-CoV vaccine candidates in development: The current landscape.* Vaccine, 2016. **34**(26): p. 2982-7.

10. Tseng, C.T., et al., *Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus.* PLoS One, 2012. 7(4): p. e35421.

11. Weingartl, H., et al., *Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets.* J Virol, 2004. **78**(22): p. 12672-6.

12. Liu, L., et al., *Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection.* JCI insight, 2019. **4**(4): p. e123158.

13. Agrawal, A.S., et al., *Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus.* Hum Vaccin Immunother, 2016. **12**(9): p. 2351-6.

14. Munster, V.J., et al., *Protective efficacy of a novel simian adenovirus vaccine against lethal MERS-CoV challenge in a transgenic human DPP4 mouse model.* NPJ Vaccines, 2017. **2**: p. 28.

15. Alharbi, N.K., et al., *Humoral Immunogenicity and Efficacy of a Single Dose of ChAdOx1 MERS Vaccine Candidate in Dromedary Camels.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 16292.

Таким образом продемонстрировано, что вакцина ChAdOx1 SARS-CoV2 является приемлемой и надежной вакциной для людей.

Пример 12. Демонстрация у млекопитающих

В данном примере полезные эффекты настоящего изобретения продемонстрированы у млекопитающих. В данном примере млекопитающими являются мыши.

Две линии мышей (BALB/c, N=5 и аутбредная CD1, N=8) вакцинировали внутримышечно (IM) с помощью ChAdOx1 nCoV-19 (конструкцию/сборку ChAdOx1 nCoV-19 см. выше, в частности примеры).

Профили подробных серологических показателей и результатов углубленного исследования клеточного иммунитета получали через 14 дней.

Данные представлены на фигуре 7 и фигуре 8.

На фигуре 7 показаны антигенспецифические ответы после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCov19 у мышей (т. е. введения мышам композиции по настоящему изобретению).

Мышам BALB/c и аутбредным (CD1) мышам вводили внутримышечно 10^8 ME ChAdOx nCoV-19, если не указано иное. Как правило, через 14 дней собирали сыворотку крови и собирали селезенки, а клетки стимулировали пептидами, охватывающими длину доменов S1 и S2 шиповидного белка nCov19.

A. Конечная точка титрования (EPT) сывороточного IgG, выявленная по отношению к белку S1 или S2 у мышей BALB/c (окружности) или CD1 (квадраты).

B. На графике показаны суммарные ответы согласно ELISpot IFNg, являющиеся специфичными в отношении шиповидного отростка, измеренные у мышей BALB/c (окружности) и аутбредных мышей CD1 (квадраты).

C. На графиках показана суммарная частота встречаемости специфичных в отношении шиповидного отростка цитокин-положительных CD4 (слева) или CD8 (справа) Т-клеток, измеренная с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов после стимуляции спленоцитов пептидами в случае мышей BALB/c (окружности) и мышей CD1 (квадраты).

На фигуре 8 показаны антигенспецифические ответы после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCov19 (т. е. введения мышам композиции по настоящему изобретению).

Мышам BALB/c и аутбредным (CD1) мышам вводили внутримышечно 10^8 ME ChAdOx nCoV-19. Через 14 дней собирали сыворотку крови и собирали селезенки, а клетки стимулировали пептидами, охватывающими длину доменов S1 и S2 шиповидного белка nCov19.

A. Подклассы антител класса IgG к белку S1 (вверху) или S2 (внизу), выявленные у мышей BALB/c (слева) или CD1 (справа).

B. Графики показывают ответы согласно ELISpot IFNg после стимуляции спленоцитов пулом S1 (черные) или пулом S2 (серые) у мышей BALB/c (окружность) и аутбредных мышей CD1 (квадрат).

C. На графиках показана частота встречаемости цитокин-положительных CD4 (вверху) или CD8 (внизу) Т-клеток, измеренная с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов после стимуляции спленоцитов пептидами пула S1 (черные) или пула S2 (серые) у мышей BALB/c (круг) и CD1 (квадрат).

D. На графиках показано кратное изменение уровней цитокинов в надосадочной жидкости от стимулированных с помощью S1 (черные) и S2 (серые) спленоцитов по сравнению с нестимулированными спленоцитами для мышей BALB/c и CD1.

Общие титры IgG были выявлены в отношении доменов S1 и S2 шиповидного белка nCoV-19 у всех вакцинированных мышей.

Преимущественно, ответ с участием Th1 измеряли по оценке профиля подклассов, вырабатываемых при ответе с участием IgG (фиг. 7A и фиг. 8A).

Иммунные ответы с участием Т-клеток, измеренные с помощью ELISpot и ICS, были выявлены по всей длине конструкции на основе шиповидного белка (фиг. 7B и фиг. 8B).

Преимущественно, ответ Th1-типа выявлялся после вакцинации, что подтверждалось высокими уровнями IFN-g, TNF-α и IL-2 и низкими уровнями IL-4 и IL-10 (фиг. 7C и фиг. 8C, D).

Не ожидалось, что у всех мышей выработаются антитела после вакцинации путем однократной инъекции (т. е. однократного введения/иммунизации однократной дозой согласно настоящему изобретению). Это свидетельствовало о том, что эффект композиции по настоящему изобретению характеризуется неожиданно высокой степенью эффективности.

Не ожидалось, что такой сильный клеточный или гуморальный ответ, который был преимущественно опосредован TH1, будет индуцирован после вакцинации путем однократной инъекции (т. е. однократного введения/иммунизации однократной дозой согласно настоящему изобретению). Это свидетельствовало о том, что иммунные ответы, индуцированные композицией по настоящему изобретению/иммунизацией по настоящему изобретению, были неожиданно сильными.

Пример 13. Демонстрация на приматах, отличных от человека (NHP)

Уведомление о подтверждении: экспериментальная работа, описанная в данном примере, была проведена в сотрудничестве с лабораториями Службы общественного здравоохранения Англии, Портон-Даун, Англия.

Заболевание, вызванное инфекцией SARS-CoV-2 у макак-резусов (*Macaca mulatta*), как представляется, схоже с таковым у людей. Макак-резусов вакцинировали с помощью 2,5 x 10^10 (2,5 x 10^{10}) вирусных частиц ChAdOx1 nCoV-19 (N=3 самца + 3 самки) посредством введения 100 мкл внутримышечно в заднюю лапу. Контрольная группа (N=3 самца + 3 самки) получала 100 мкл контрольного вещества (забуференного фосфатом физиологического раствора) посредством внутримышечного пути. Всех животных заражали вирусом SARS-CoV-2 через 4 недели после вакцинации. После введения подходящего анестетика дозу 5,0 x 10^6 (5,0 x 10^6) БОЕ вируса SARS-CoV-2 в общем объеме 3 мл PBS вводили в верхний и нижний отделы респираторного тракта каждого животного, чтобы максимизировать вероятность развития инфекции. Первые 2 мл вводили интратрахеально, затем осуществляли промывание 2 мл стерильного физиологического раствора, при этом последний 1 мл вводили интраназально, распределяя объем между ноздрями. В качестве инокулята для заражения использовали вирус SARS-CoV-2, пассаж 3 клеток VERO/hSLAM (Victoria/1/2020).

Клинические наблюдения, включая вес, температуру и поведение, проводились ежедневно. Бремя легочного заболевания оценивали путем сканирования методом компьютерной томографии (КТ), выполняемого через 5 дней после заражения, и измеряли с использованием системы количественных показателей в баллах, разработанной для оценки заболевания COVID-19 у человека. Каждая сторона легкого была разделена на 12 зон следующим образом. Каждая сторона легкого была разделена (сверху вниз) на три зоны: верхнюю зону (над килем), среднюю зону (от киля до нижней легочной вены) и нижнюю зону (ниже нижней легочной вены). Затем каждая зона была разделена на две области: переднюю область (область перед вертикальной линией, проходящей через среднюю точку диафрагмы в сагиттальном положении) и заднюю область (область после вертикальной линии, проходящей через среднюю точку диафрагмы в сагиттальном положении). Используемые количественные показатели включали общий балльный показатель выраженности заболевания (балльный показатель для узелков + балльный показатель для затемнения по типу матового стекла + балльный показатель для консолидации) и балльный показатель для распространения заболевания (число зон, пораженных заболеванием). Использовались следующие параметры системы балльных показателей:

- узелки, наблюдаемые при КТ, оценивались от 1 до 4 баллов и больше;
- затемнения по типу матового стекла (GGO) оценивались в соответствии с размером: < 1 см = 1, 1-2 см = 2, 2-3 см = 3, > 3 см = 4;

- балльный показатель для консолидации: < 1 см = 1, 1-2 см = 2, 2-3 см = 3, > 3 см = 4.

Титры нейтрализующих антител, снижающих бляшкообразование (PRNT), измеряли в сыворотке крови макак с использованием следующего способа.

Способ PRNT

Двукратные серийные разбавления сыворотки крови макаков, начиная с 1:10, получали в 96-луночных планшетах. Каждое разбавление сыворотки смешивали с равным объемом вируса (примерно 40-70 БОЕ/лунка) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После этой инкубации смесь вируса и сыворотки крови переносили на монослои клеток Vero/E6 в 24-луночные планшеты. Через 1-1,5 ч инкубации при 37°C на монослои клеток наносили по 0,5 мл среды, содержащей 1,5% карбоксиметилцеллюлозы. Через 5 дней планшеты фиксировали формальдегидом. На следующий день планшеты промывали и окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового в течение 5-15 минут. Планшеты промывали и подсчитывали бляшки. Средние титры PRNT и 95% доверительные интервалы определяли с помощью пробит-анализа.

Никаких явных различий в весе (фигура 9) или температуре (фигура 10) не наблюдалось между вакцинированными и невакцинированными группами в течение периода вплоть до 7 дней после заражения вирусом. Степень изменения веса варьировалась у разных животных, при этом некоторые из них неуклонно теряли вес на протяжении всего исследования, что вероятно происходило в результате изменения окружающей среды и социальных взаимодействий. Однако четких различий между группами не имелось.

Признаки заболевания COVID-19, выявленные исходя из результатов КТ-сканирования, полученных через 5 дней после заражения (таблица 13 и фигура 11), показали, что у животных, получавших вакцину ChAdOx1 nCoV19, было меньше легочных аномалий, типичных для заболевания у человека, чем у невакцинированных контролей.

У 4 из 6 животных в вакцинированной группе не было выявлено видимых признаков заболевания по сравнению с 2 из 6 контролей. Кроме того, распределение аномалий, вызванных COVID-19, у тех вакцинированных животных, у которых развилось заболевание, было более ограниченным, чем у контрольных животных, при этом степень поражения аномалиями затрагивала менее чем 25% легкого.

Авторы настоящего изобретения ссылаются на фигуру 9, на которой показано клиническое наблюдение относительно веса после заражения вирусом SARS-CoV2 у

макак-резусов, вакцинированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19. Животных иммунизировали внутримышечно с помощью 2,5 x 10^{10} вирусных частиц ChAdOx1 nCoV-19 (группа 1) или забуференного фосфатом физиологического раствора (группа 2) и через 4 недели заражали 5,0 x 10^{6} БОЕ вируса SARS-CoV2. Значения веса животных измеряли каждый день после заражения (DPC) и наносили на график в виде абсолютных числовых значений (A. и B.) и процентного значения изменения веса (C. и D.). Каждая линия представляет одного индивидуума.

Авторы настоящего изобретения ссылаются на фигуру 10, на которой показано клиническое наблюдение относительно температуры после заражения вирусом SARS-CoV2 у макак-резусов, вакцинированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19. Животных иммунизировали внутримышечно с помощью 2,5 x 10^{10} вирусных частиц ChAdOx1 nCoV-19 (группа 1) или забуференного фосфатом физиологического раствора (группа 2) и через 4 недели заражали 5,0 x 10^{6} БОЕ вируса SARS-CoV2. Температуру измеряли до заражения (A. и B.) и после заражения (C. и D.). Каждая линия представляет одного индивидуума. DPC = дни после заражения.

В таблице 13 показано бремя легочного заболевания, измеренное с использованием системы количественных показателей в баллах, разработанной для оценки человеческого COVID-19, у макак-резусов через 5 дней после заражения вирусом SARS-CoV2. Животных иммунизировали внутримышечно с помощью 2,5 x 10^{10} вирусных частиц ChAdOx1 nCoV-19 или забуференного фосфатом физиологического раствора (без вакцины) и через 4 недели заражали 5,0 x 10^{6} БОЕ вируса SARS-CoV2.

Пол	Статус	Балл для GGO	Консолидация	Узелки	В целом	Зоны
			Значение балльного показателя	Значение балльного показателя	Значение балльного показателя	Значение балльного показателя
Мужской	ChAdOx1 nCov-19	5		1	6	3
Мужской	ChAdOx1 nCov-19	3			3	3
Мужской	ChAdOx1 nCov-19					
Женский	ChAdOx1 nCov-19					
Женский	ChAdOx1 nCov-19					
Женский	ChAdOx1 nCov-19					
Мужской	Без получения вакцины	9	4		13	7
Мужской	Без получения вакцины					
Мужской	Без получения вакцины	4	2	1	7	5
Женский	Без получения вакцины	1	3		4	4
Женский	Без получения вакцины					
Женский	Без получения вакцины	1	8		9	5

Таблица 13

Авторы настоящего изобретения ссылаются на фигуру 11, на которой показано бремя заболевания COVID-19 согласно изображениям, полученным посредством КТ, измеренное с использованием системы количественных показателей в баллах, разработанной для оценки человеческого COVID-19, у макак-резусов через 5 дней после заражения вирусом SARS-CoV2. Животных иммунизировали внутримышечно с помощью 2,5 x 10^{10} вирусных частиц ChAdOx1 nCoV-19 или забуференного фосфатом физиологического раствора (без вакцины) и через 4 недели заражали 5,0 x 10^{6} БОЕ вируса SARS-CoV2. Наблюдались незначимые тенденции в отношении различий между группами (общий показатель, p=0,1450; показатель распределения, p=0,0907) (критерий Манна-Уитни).

Значимость

Учитывая, что между группами не было различий в установленных показателях общего веса или температуры, было удивительно, что животные, вакцинированные с помощью ChAdOx1 nCov-19, имели в среднем более низкие балльные показатели при КТ-исследовании.

Также неожиданным было то, что доза вакцины, используемая в исследовании на NHP, составляла половину полной дозы для человека, используемой в клиническом испытании. Обычно в исследованиях на NHP используют полную дозу для человека, и было неожиданным, что защита в отношении заболевания наблюдалась после однократной иммунизации при более низкой дозе.

Эти наблюдения свидетельствуют об эффективности составов по настоящему изобретению в отношении индуцирования иммунных ответов, в частности в отношении индуцирования защитных иммунных ответов.

Авторы настоящего изобретения ссылаются на фигуру 12, на которой показаны уровни nAb у 6 макак в неделю 4 после вакцинации. Более детально, на фигуре 12 показано, что титры нейтрализующих антител, снижающих бляшкообразование, были определены через четыре недели после иммунизации шести макак-резусов с помощью 2,5 x 10^{10} вирусных частиц ChAdOx1 nCoV-19. Все животные были выраженно положительными.

При тестировании сыворотки выздоравливающих людей с использованием того же анализа результаты для PRNT оказались выше 320 (верхний предел разбавления). Данные по макакам продемонстрировали уровни, составляющие 200-380, через четыре недели после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV19. Это говорит о том, что это были сильные ответы с выработкой нейтрализующих антител в диапазоне, который авторы настоящего изобретения ожидают увидеть у человека после естественного инфицирования вирусом. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что действительно правдоподобным и заслуживающим доверия является то, что составы по настоящему изобретению эффективны в индуцировании необходимых иммунных ответов у субъектов, которым вводили составы.

Пример 14. Оценка иммуногенности вакцинации в режиме "прайм-буст"

В данном примере сравнивается иммуногенность одной или двух доз ChAdOx1 nCoV-19 как у мышей, так и у свиней. В то время как однократная доза индуцировала ответы с выработкой антигенспецифических антител и участием Т-клеток, бустерная иммунизация усиливала ответы с выработкой антител, особенно у свиней, со значительным увеличением SARS-CoV-2-нейтрализующих титров. Тестирование иммуногенности либо одной, либо двух доз ChAdOx1 nCoV-19 у мышей и свиней обеспечит получение дополнительной информации для клинической разработки.

Результаты

Инбредных (BALB/c) и аутбредных (CD1) мышей, вакцинированных в режиме "прайм-буст", иммунизировали через 0 и 28 дней после вакцинации (dpv), в то время как "только примированные" мыши получали однократную дозу ChAdOx1 nCoV-19 в день 28. Селезенки и сыворотку собирали у всех мышей в день 49 (через 3 недели после бустерной или примирующей вакцинации). Анализ ответов для мышиных спленоцитов, специфичных к S-белку SARS-CoV-2, проводимый с помощью анализа ELISpot в отношении IFN-γ, не показал статистически значимой разницы между схемами

вакцинанции в режиме "только примирование" и в режиме "прайм-буст" ни у одной из линий мышей (фигура 13A). Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) в спленоцитах (фигура 13B) показало, что в обеих линиях мышей ответ в основном обусловлен $CD8^+$ Т-клетками. Преобладающим цитокиновым ответом как в случае $CD8^+$, так и в случае $CD4^+$ Т-клеток являлась экспрессия IFN-γ и TNF-α с незначительными значениями частоты встречаемости $IL\text{-}4^+$ и $IL\text{-}10^+$ клеток, что согласовывалось с предыдущими данными, предполагающими, что аденовирусная вакцинация не индуцирует доминирующего Th2-ответа. Не имелось каких-либо существенных различий в отношении $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточных цитокиновых ответов между мышами, получавшими вакцину в режиме "только примирование" и в режиме "прайм-буст".

Свиней, получавших вакцину в режиме "только примирование" и в режиме "прайм-буст", иммунизировали через 0 dpv, а свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", подвергали второй иммунизации через 28 dpv. Образцы крови собирали еженедельно до достижения 42 dpv для анализа иммунных ответов. Анализ ELISpot в отношении IFN-γ, выполняемый для свиных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), показал наличие ответов через 42 dpv (через 2 недели после бустерного введения), которые были значительно выше у свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", по сравнению с животными, получавшими вакцину в режиме "только примирование" ($p < 0,05$; фигура 13C). Ответы при режиме "прайм-буст" через 42 dpv были сильнее, чем ответы, наблюдаемые в любой группе через 14 dpv, однако вариации между животными означали, что статистическая значимость не достигалась. ICS-анализ ответов с участием свиных Т-клеток показал преобладание цитокинов Th1-типа (аналогично мышиному ответу), но с более высокой частотой S-специфических $CD4^+$ Т-клеток по сравнению с $CD8^+$ Т-клетками (фигура 13D). Однако цитокиновые ответы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток существенно не различались между группами вакцины или временными точками (14 против 42 dpv).

На фигуре 13 представлены S-специфичные ответы с участием Т-клеток в отношении SARS-CoV-2 после осуществления схем вакцинации с использованием ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "только примирование" и в режиме "прайм-буст" у мышей и свиней. Инбредных BALB/c (n=5) и аутбредных CD1 (n=8) мышей иммунизировали в дни 0 и 28 с помощью ChAdOx1 nCoV19 (режим "прайм-буст") или ChAdOx1 nCoV19 в день 28 (режим "только примирование"); свиней (n=3) иммунизировали с помощью ChAdOx1 nCoV-19 в дни 0 и 28 (режим "прайм-буст") или только в день 0 (режим "только примирование"). Чтобы проанализировать S-специфичные ответы с участием Т-клеток в отношении SARS-CoV-2,

всех мышей умерщвляли в день 49 для выделения спленоцитов, а в случае свиней осуществляли продольный забор образцов крови для выделения PBMC. После стимуляции S-пептидами SARS-CoV-2 ответы для мышиных спленоцитов (**A**) и свиных PBMC (**C**) оценивали с помощью анализов ELISpot в отношении IFN-γ. С использованием проточной цитометрии определили характеристики ответов с участием $CD4^+$ и $CD8^+$ T-клеток путем оценки экспрессии IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 и IL-10 (mice; **B**) и IFN-γ, TNF-α, IL-2 и IL-4 (свиньи; **D**). Каждая точка данных представляла собой отдельную мышь/свинью со столбцами, обозначающими медианный ответ на группу/момент времени.

На фигуре 14 представлены ответы с выработкой антител, специфичных к S-белку SARS-CoV-2, после осуществления схем вакцинации с использованием ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "только примирование" и в режиме "прайм-буст" у мышей и свиней. Инбредных BALB/c (n=5) и аутбредных CD1 (n=8) мышей иммунизировали в дни 0 и 28 с помощью ChAdOx1 nCoV19 (режим "прайм-буст") или ChAdOx1 nCoV19 в день 28 (режим "только примирование"); тогда как свиней иммунизировали с помощью ChAdOx1 nCoV-19 в дни 0 и 28 (режим "прайм-буст") или только в день 0 (режим "только примирование"). Для анализа на наличие в сыворотке крови антител, специфичных к S-белку SARS-CoV-2, всех мышей умерщвляли в день 49, а у свиней еженедельно до дня 42 отбирали образцы крови. Количество единиц или конечные титры (EPT) для антител оценивали с помощью ELISA с использованием рекомбинантного FL-S SARS-CoV-2 как для мышей (**A**), так и для свиней (**B**), и рекомбинантного RBD S-белка для свиней (**C**). Титры нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови свиней определяли с помощью VNT, результаты которого выражали в виде величины, обратной разбавлению сыворотки, которое нейтрализовало инфекционность вируса в 50% лунок (ND_{50}; **D**), и pVNT, результаты которого выражали в виде обратной величины разбавления сыворотки крови, обеспечивающей подавление проникновения псевдовируса на 50% (IC_{50}; **E**). Каждая точка данных представляла собой сыворотки крови отдельных мыши/свиньи со столбцами, обозначающими медианный титр на группу.

Титры антител, специфичных к S-белку SARS-CoV-2, в сыворотке крови определяли с помощью ELISA с использованием рекомбинантных белков растворимой формы тримерного S (FL-S) и рецептор-связывающего домена (RBD). Значительное увеличение титров антител, связывающих FL-S, наблюдалось у мышей BALB/c, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", по сравнению с их аналогами, получавшими вакцину в режиме "только примирование" ($p < 0,01$), однако разница между группами вакцины для мышей

CD1 не была значимой (фиг. 14A). Ответы с выработкой антител оценивали в продольном режиме в сыворотке крови свиней с помощью ELISA FL-S и RBD. По сравнению с сывороткой крови, полученной до вакцинации, значительные титры антител, специфичных к FL-S, были выявлены в группах, как предусматривающих только примирование, так предусматривающих режим "прайм-буст", по прошествии периода от 21 до 14 dpv соответственно ($p < 0,01$; фигура 14B). Титры антител к FL-S существенно не различались между группами до тех пор, пока после бустерной иммунизации титры у свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", не становились значительно более высокими со средним увеличением титров > 1 $\log_{10}$ ($p < 0,0001$). Титры RBD-специфичных антител продемонстрировали сходный профиль со значительными титрами в обеих группах, начиная с 14 dpv ($p < 0,05$), и дальнейшим значительным увеличением у свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", начиная с 35 dpv, которое было больше, чем у свиней, получавших вакцину в режиме "только примирование" ($p < 0,0001$; фигура 14C). Ответы с выработкой нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 оценивали с использованием теста нейтрализации вируса (VNT; фигура 14D) и теста нейтрализации псевдовируса (pVNT; фигура 14E). После примирующей иммунизации титры нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 выявляли с помощью VNT в сыворотке крови через 14 и 28 dpv у 2/3 свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", и 2/3 свиней, получавших вакцину в режиме "только примирование". Через две недели после стимулирования (42 dpv) были выявлены титры нейтрализующих антител, и при этом они увеличивались у всех свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст" на величину, которая была значительно выше, чем таковая для более ранних моментов времени и для титров, измеренных в группе животных, получавших вакцину в режиме "только примирование" ($p < 0,01$). В соответствии с этим анализом сыворотка крови, проанализированная в отношении нейтрализующих антител с использованием pVNT, показала, что титры антител в сыворотке крови свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", через 42 dpv были значительно выше, чем в более ранние моменты времени и в группе животных, получавших вакцину в режиме "только примирование" ($p < 0,001$). Статистический анализ показал корреляцию с высоким уровнем значимости между титрами, определенными в ходе pVNT и VNT (ранговая корреляция Спирмена $r = 0,86$; $p < 0,0001$).

Обсуждение

В данном примере авторы настоящего изобретения использовали модель на основе животных как мелкого, так и крупного размера для оценки иммуногенности либо одной,

либо двух доз вакцины-кандидата против COVID-19, представляющей собой ChAdOx1 nCoV-19 (теперь известной как AZD1222). Модели на основе мелких животных имеют переменный успех в прогнозировании эффективности вакцины у более крупных животных, но являются важным первым шагом для облегчения приоритизации мишеней для вакцины. Напротив, было показано, что модели на основе более крупных животных, таких как свиньи и приматы, отличные от человека, более точно предсказывают результат вакцинации у людей. Данные для мышей, полученные в этом исследовании, свидетельствовали о том, что профиль иммуногенности находился на верхнем конце кривой доза-ответ, что могло привести к насыщению иммунного ответа и в значительной степени затруднило способность авторов настоящего изобретения определять различия между схемами в режимах "только примирование" или "прайм-буст". Авторы настоящего изобретения разработали модель на основе свиньи в качестве средства для генерирования и понимания иммунных ответов на вакцинацию против вируса человеческого гриппа и Nipah. Присущая гетерогенность модели на основе аутбредных крупных животных более характерна для иммунных ответов у людей. Обширная разработка реагентов для изучения иммунных ответов у свиней в последние годы расширила полезность и применимость свиней в качестве модели для изучения инфекционного заболевания. Эти данные демонстрируют применимость свиньи в качестве модели для дальнейшей оценки иммуногенности ChAdOx1 nCoV-19 и других вакцин против COVID-19.

В данном документе авторы настоящего изобретения показали, что ответы с участием Т-клеток были сильнее у свиней, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", по сравнению таковыми, получавшими вакцину в режиме "только примирование", в день 42, в то время как сравнение ответов через 14 дней после последней иммунизации продемонстрировало, что схема в режиме "прайм-буст" имела тенденцию к более сильному ответу. Кроме того, иммунизация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 индуцировала устойчивые Th1-подобные ответы с участием $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток как у свиней, так и у мышей. Это имеет важные последствия для разработки вакцины против COVID-19, поскольку считается, что вирус-специфичные Т-клетки играют важную роль при инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Хотя для COVID-19 каких-либо коррелятов защиты обнаружено не было, недавние публикации предполагают, что титры нейтрализующих антител коррелировать с обеспечением защиты в животных моделях заражения. Однократная доза ChAdOx1 nCoV-19 индуцирует ответы с выработкой антител, но в данном документе авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что ответы с выработкой антител значительно усиливаются после гомологичной бустерной вакцинации

у одной линии мышей и в большей степени у свиней. Важно отметить, что значительное увеличение средних титров нейтрализующих антител было измерено у свиней после бустерной вакцинации, что может привести к усилению защиты в клинических исследованиях.

Способы

Заявление об этике

Исследования на мышах и свиньях проводились в соответствии с Законом Великобритании о животных (научные процедуры) 1986 г. и с одобрения соответствующего местного органа по защите животных и этической экспертизе (мыши — лицензия на проект P9808B4F1, и свиньи — лицензия на проект PP1804248).

Клетки и вирусы

Клетки Vero E6 выращивали в среде DMEM, содержащей пируват натрия и L-глутамин (Sigma-Aldrich, Пул, Великобритания), 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher, Лафборо, Великобритания), 0,2% пенициллина/стрептомицина (10000 ЕД/мл; Gibco) (поддерживающая среда) при 37°C и 5% CO_2. Исходные вирусные изоляты SARS-CoV-2 England-2 выращивали в клетках Vero E6 с использованием множественности инфицирования (MOI) 0,0001 в течение 3 дней при 37°C в среде для размножения (поддерживающая среда, содержащая 2% FBS). Исходные растворы с SARS-CoV-2 титровали на клетках Vero E6 с использованием MEM (Gibco), 2% FCS (Labtech, Хитфилд, Великобритания), 0,8% Avicel (FMC BioPolymer, Герван, Великобритания) в качестве покрытия. Для анализов бляшек фиксирование осуществляли формальдегидом (VWR, Лэйтон-Баззард, Великобритания), а окрашивание осуществляли 0,1% раствором толуидинового синего (Sigma-Aldrich). Все работы с живым вирусом SARS-CoV-2 проводились в лабораториях ACDP HG3 обученным персоналом. Размножение, очистка и оценка титров ChAdOx1 nCoV-19 были такими же, как описано ранее.

Рекомбинантные белки SARS-CoV-2 и синтетические пептиды

Синтетическая ДНК, кодирующая рецептор-связывающий домен шиповидного (S) белка (RBD; аминокислоты 330-532) SARS-CoV-2 (GenBank MN908947), кодон-оптимизированная для экспрессии в клетках млекопитающих (технология IDT), была встроена в вектор pOPINTTGneo, содержащий C-концевую метку His6. Рекомбинантный RBD временно экспрессировали в Expi293™ (Thermo Fisher Scientific, Великобритания) и белок очищали из надосадочных жидкостей культур с помощью аффинности иммобилизованного металла с последующей гель-фильтрацией в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) с pH 7,4. Конструкция на основе растворимой формы

тримерного белка S (FL-S), кодирующая остатки 1-1213 с двумя наборами мутаций, которые стабилизировали белок в конформации до слияния (удаление сайта расщепления фурином и введение двух остатков пролина; K983P, V984P) экспрессировалась так, как описано. Эндогенный вирусный сигнальный пептид сохранялся на N-конце (остатки 1-14), С-концевой домен Т4-домена сборки, включенный для содействия ассоциации мономеров в тримеры, чтобы отразить естественный трансмембранный вирусный белок, и С-концевая метка His6, включенная для аффинной очистки на основе никеля. Аналогично рекомбинантному RBD, FL-S временно экспрессировался в Expi293™ (Thermo Fisher Scientific) и белок очищали из надосадочных жидкостей культур с помощью аффинности иммобилизованного металла с последующей гель-фильтрацией в забуференном Tris физиологическом растворе (TBS) с pH 7,4.

Для анализа ответов с участием Т-клеток у свиней перекрывающиеся 16-мерные пептиды со смещением на 4 остатка, основанные на предсказанной аминокислотной последовательности всего S-белка из изолята SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (эталонная последовательность NCBI: NC_045512.2), были разработаны и синтезированы (Mimotopes, Мельбурн, Австралия) и восстановлены в стерильном 40% ацетонитриле (Sigma-Aldrich) при концентрации 3 мг/мл. Три пула синтетических пептидов, представляющих остатки 1-331 (пул 1), 332-748 (пул 2) и 749-1273 (пул 3), получали для использования в стимуляции Т-клеток в ходе анализов ELISpot в отношении IFN-γ и внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS). Для анализа ответов с участием Т-клеток у мышей конструировали и синтезировали перекрывающиеся 15-мерные пептиды со смещением на 11 остатков (Mimotopes), и их восстанавливали в стерильном 100% DMSO (Sigma-Aldrich) при концентрации 100 мг/мл. Два пептидных пула, охватывающих область S1 (пул 1: 1-77 и 317-321, пул 2: 78-167), и 2 пептидных пула, охватывающих область S2 (пул 3: 166-241, пул 4: 242-316), использовали для стимуляции спленоцитов, выполняемой для анализа ELISpot в отношении IFN-γ, и одиночные пулы S1 (пул 1 и пул 2) и S2 (пул 3 и пул 4) использовали для стимуляции спленоцитов, выполняемой для ICS.

Испытания иммуногенности

Мыши: инбредных самок BALB/cOlaHsd (BALB/c) (Envigo) и аутбредных особей Crl:CD1 (CD1) (Charles River) в возрасте по меньшей мере 6 недель случайным образом распределяли в группы вакцинации в режиме "только примирование" или в режиме "прайм-буст" (BALB/c n=5 и CD1 n=8). Мышей, получавших вакцину в режиме "прайм-буст", иммунизировали внутримышечно с помощью 10^8 инфекционных единиц (ME) (6,02 x 10^9 вирусных частиц; в. ч.) ChAdOx1 nCoV-19 и подвергали бустерной

внутримышечной вакцинации через четыре недели с помощью 1 x 10^8 ME ChAdOx1 nCoV-19. Мыши, получавшие вакцину в режиме "только примирование", получали однократную дозу 10^8 ME ChAdOx1 nCoV-19 в то же время, когда мышам, получавшим вакцину в режиме "прайм-буст", осуществляли бустерное введение. Через дополнительные 3 недели у всех животных собирали селезенки и сыворотку крови.

Свиньи: шесть 8-10-недельных самок-отъемышей кроссбредных свиней, полученных при скрещивании пород крупная белая, ландрас, хэмпшир, из коммерческого свиноводческого хозяйства случайным образом распределяли на две экспериментальные группы (n=3) – получавшие вакцину в режиме "только примирование" и получавшие вакцину в режиме "прайм-буст". Обе группы иммунизировали в день 0 с помощью 1 x 10^9 ME (5,12 x 10^{10} в. ч.) ChAdOx1 nCoV-19 в 1 мл PBS посредством внутримышечной инъекции (брахиоцефальная мышца). Свиньи, получавшие вакцину в режиме "прайм-буст", подвергались идентичной бустерной иммунизации в день 28. Образцы крови отбирали у всех свиней еженедельно через 0, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 dpv путем венопункции наружной яремной вены: 8 мл/свинья в вакуумных пробирках BD SST (Fisher Scientific) для сбора сыворотки крови и 40 мл/свинья в вакуумных пробирках с гепарином BD (Fisher Scientific) для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Выявление антител, специфичных по отношению к SARS-CoV-S, с помощью ELISA

Мыши: антитела к белку FL-S SARS-CoV-2 определяли путем проведения стандартизированного ELISA в сыворотке крови, собранной через 3 недели после примирующей вакцинации или вакцинации в режиме "прайм-буст". Планшеты MaxiSorp (Nunc) покрывали с помощью 100 нг/лунка белка FL-S в течение ночи при 4°C перед промыванием в PBS/Tween (0,05% об./об.) и блокированием с помощью блокирующего казеина в PBS. (Thermo Fisher Scientific) в течение 1 часа при комнатной температуре (к. т.). Стандартную положительную сыворотку крови (пул мышиной сыворотки крови с высоким конечным титром антител, направленных против белка FL-S), отдельные образцы мышиной сыворотки крови, отрицательный и внутренний контроль (разбавленный казеином) инкубировали в течение 2 ч. при к. т. После промывания связанные антитела выявляли путем добавления конъюгированного со щелочной фосфатазой антитела козы к IgG мыши (Sigma-Aldrich), разбавленного 1/5000 в казеине, на 1 час при к. т. и выявления антитела к IgG мыши путем добавления субстрата pNPP (Sigma-Aldrich). Произвольное число единиц ELISA относили к эталонному пулу, и значения OD каждого разбавления аппроксимировали к 4-параметрической логистической кривой с использованием программного обеспечения SOFTmax PRO. Единицы ELISA

рассчитывали для каждого образца с использованием значений OD образца и параметров стандартной кривой.

Свиньи: сыворотку крови выделяли центрифугированием пробирок SST при 1300 × *g* в течение 10 минут при к. т. и хранили при -80°C. Антитела, специфичные к RBD и FL-S SARS-CoV-2, в сыворотке крови оценивали, как подробно описано ранее, за исключением следующих двух стадий. Конъюгированное вторичное антитело заменяли HRP-конъюгированным антителом козы к IgG свиньи (Abcam, Кембридж, Великобритания) при разбавлении 1/10000 в PBS с 0,1% $Tween_{20}$ и 1% обезжиренного молока. Кроме того, после последней промывки в каждую лунку добавляли по 100 мкл TMB (однокомпонентного микролуночного субстрата пероксидазы хрена, BioFX, Cambridge Bioscience, Кембридж, Великобритания) и планшеты инкубировали в течение 7 минут при к. т. Затем для остановки реакции добавляли по 100 мкл стоп-реагент BioFX, предусматривающего считывание при 450 нм (Cambridge Bioscience), и микропланшеты считывали при 450 нм. Конечные титры антител (среднее значение для двух повторностей) рассчитывали следующим образом: log_{10} OD наносили на график относительно log_{10} разбавления образца, а регрессионный анализ линейной части этой кривой обеспечивал возможность рассчитать конечный титр с OD, вдвое превышающей средние значения OD для сыворотки крови в 0 dpv.

Оценка ответов с выработкой нейтрализующих антител к SARS-CoV-2

Способность сыворотки крови свиней нейтрализовать SARS-CoV-2 оценивали с помощью анализов нейтрализации вирусов и псевдовирусов. Для обоих анализов сыворотку крови сначала инактивировали нагреванием (HI) путем инкубации при 56°C в течение 2 часов.

Тест на нейтрализацию вируса (VNT): начиная с разбавления 1 к 5, двукратные серийные разбавления сыворотки крови получали в 96-луночных круглодонных планшетах с использованием среды DMEM, содержащей 1% FBS и 1% антибиотика-антимикотика (Gibco) (среда для разбавления). Смешивали 75 мкл разбавленной свиной сыворотки крови с 75 мкл среды для разбавления, содержащей приблизительно 64 бляшкообразующих единиц (БОЕ) SARS-CoV-2, в течение 1 часа при 37°C. Клетки Vero E6 высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном при плотности 1 x 10^5 клеток/мл в поддерживающей среде за сутки до эксперимента. Супернатанты культур заменяли на 100 мкл DMEM, содержащей 10% FCS и 1% антибиотика-антимикотика, прежде чем к клеткам Vero E6 добавляли 100 мкл смеси вируса и сыворотки крови, и полученное инкубировали в течение шести дней при 37°C. Цитопатический эффект (CPE) исследовали

с помощью светлопольной микроскопии. Клетки дополнительно фиксировали и окрашивали, как описано выше, и оценивали CPE. Каждое отдельное разбавление сыворотки крови свиньи тестировали в квадруплетах на одном и том же планшете, и контроли, предусматривающие отсутствие сыворотки крови/вирус SARS-CoV-2 и отсутствие сыворотки крови/отсутствие вируса, анализировали параллельно на каждом планшете в квадруплетах. Лунки оценивали в отношении цитопатического эффекта, а титры нейтрализации выражали в виде величины, обратной разбавлению сыворотки, которое обеспечивало полное блокирование CPE в 50% лунок (ND_{50}). Исследователей, проводивших VNT, подвергали заслеплению в отношении идентичности образцов.

Тест на нейтрализацию псевдовирусов (pVNT): псевдовирусы SARS-CoV-2 на основе лентивирусов генерировали в клетках HEK293T, инкубированных при 37°C, 5% CO_2. Клетки высевали с плотностью 7,5 *x* 10^5 в 6-луночные чашки перед трансфекцией плазмидами следующим образом: 500 нг шиповидного отростка SARS-CoV-2, 600 нг p8.91 (кодирующего gag-pol ВИЧ-1), 600 нг CSFLW (каркас лентивируса, экспрессирующего репортерный ген люциферазы светлячка) в Opti-MEM (Gibco) вместе с 10 мкл PEI (1 мкг/мл) реагента для трансфекции. Также был установлен контроль "без гликопротеина" с использованием ДНК-носителя (pcDNA3.1) вместо плазмиды, экспрессирующей SARS-CoV-2 S. На следующий день смесь для трансфекции заменяли 3 мл DMEM с 10% FBS (DMEM-10%) и инкубировали при 37°C. Как через 48, так и через 72 часа после трансфекции супернатанты, содержащие псевдотипированный SARS-CoV-2 (pps SARS-CoV-2), собирали, объединяли и центрифугировали при 1300 x *g* в течение 10 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Клетки-мишени HEK293T, предварительно трансфицированные 500 нг человеческой экспрессионной плазмиды ACE2 (Addgene, Кембридж, Массачусетс, США), высевали при плотности 2 x 10^4 в 100 мкл DMEM-10% в белый плоскодонный 96-луночный планшет за день до сбора SARS-CoV-2 pps. На следующий день pps SARS-CoV-2 титровали 10-кратно в клетках-мишенях, а остаток хранили при -80°C. Для pVNT свиную сыворотку крови разбавляли 1:20 в бессывороточной среде и 50 мкл добавляли в 96-луночный планшет в четырех повторностях и титровали 4-кратно. Фиксированный оттитрованный объем pps SARS-CoV-2 добавляли в разбавлении, эквивалентном 10^6 единиц сигнальной люциферазы, в 50 мкл DMEM-10% и инкубировали с сывороткой крови в течение 1 часа при 37°C, 5% CO_2. Затем добавляли клетки-мишени, экспрессирующие человеческий ACE2, с плотностью 2 *x* 10^4 в 100 мкл и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 72 часов. Затем активность люциферазы светлячка измеряли с помощью реагента люциферазы BrightGlo и системы

выявления Glomax-Multi$^+$ (Promega, Саутгемптон, Великобритания). Титры нейтрализации псевдовируса выражали в виде обратной величины разбавления сыворотки крови, которое ингибировало экспрессию люциферазы на 50% (IC_{50}).

Оценка специфичных ответов с участием Т-клеток в отношении SARS-CoV-2

Мыши: суспензию одиночных клеток селезенки мышей получали путем пропускания клеток через клеточные фильтры на 70 мкм и лизирования с помощью ACK (Thermo Fisher) перед ресуспендированием в полной среде (αMEM с добавлением 10% FCS, пениц.-стреп., L-глутамина и 2-меркаптоэтанола). Для анализа выработки IFN-γ с помощью анализа ELISpot спленоциты стимулировали пулами S-пептидов в конечной концентрации 2 мкг/мл в планшетах с IPVH-мембраной (Millipore), покрытых 5 мкг/мл антитела к IFN-γ мыши (клон AN18; Mabtech). После 18-20 часов стимуляции IFN-γ из пятнообразующих клеток (SFC) выявляли путем окрашивания мембран с помощью конъюгированного с биотином mAb к IFN-γ мыши (1 мкг/мл; клон R46A2, Mabtech) с последующим окрашиванием конъюгированной со стрептавидином щелочной фосфатазой (1 мкг/мл) и проявлением с помощью набора субстратов для AP-конъюгатов (Bio-Rad). Для анализа внутриклеточной выработки цитокинов клетки стимулировали с помощью 2 мкг/мл S-пептидных пулов, среды или коктейля для стимуляции клеток (содержащих PMA-иономицин, BioLegend) вместе с 1 мкг/мл GolgiPlug (BD Biosciences) и 2 мкл/мл CD107a-Alexa647 в течение 6 часов в 96-луночном планшете с U-образным дном перед помещением на хранение в течение ночи при 4°C. После окрашивания поверхности с помощью CD4-BUV496, CD8-PerCP-Cy5.5, CD62L-BV711, CD127-BV650, CD44-APC-Cy7 и LIVE/DEAD Aqua (Thermo Fisher) клетки фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином (содержащим 4% параформальдегида) и окрашивали внутриклеточно с помощью TNF-α-AF488, IL-2-PE-Cy7, IL-4-BV605, IL-10-PE и IFN-γ-e450, разбавленных в промывочном буфере Perm-Wash (BD Biosciences). Сбор данных для образцов выполняли на Fortessa (BD) и данные анализировали в FlowJo v9 (TreeStar). Порог восприимчивости был установлен как минимум на 5000 событий при гейтировании живых $CD3^+$ клеток. Антигенспецифические Т-клетки идентифицировали путем гейтирования по LIVE/DEAD-отрицательным, дублет-отрицательным (FSC-H относительно FSC-A) клеткам, по размеру (FSC-H относительно SSC), по $CD3^+$, $CD4^+$ или $CD8^+$ клеткам, а также цитокин-положительным клеткам. Общие ответы с выработкой цитокинов, специфичные в отношении S-белка SARS-CoV-2, представлены после вычитания фонового ответа, выявленного в стимулированном средой контрольном образце селезенки каждой мыши, перед суммированием частот встречаемости S1- и S2-специфичных клеток.

Свиньи: PBMC выделяли из гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности и криоконсервировали в холодном 10% DMSO (Sigma-Aldrich) в HI FBS. Восстановленные PBMC суспендировали в среде RPMI 1640 с добавкой GlutaMAX, HEPES (Gibco) с добавлением 10% HI FBS (происхождением из Новой Зеландии, Life Science Production, Бедфорд, Великобритания), 1% пенициллина-стрептомицина и 0,1% 2-меркаптоэтанола (50 мМ; Gibco) (cRPMI). Чтобы определить частоту встречаемости клеток, продуцирующих IFN-γ, специфичных по отношению к S-белку SARS-CoV-2, проводили анализ ELISpot на PBMC, полученных через 0, 14, 28 и 42 dpv. 96-луночные планшеты Multiscreen (MAHAS4510; Millipore, Fisher Scientific) предварительно покрывали 1 мкг/мл mAb к IFN-γ свиньи (клон P2G10, BD Biosciences) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После промывания и блокирования с помощью cRPMI PBMC высевали при 5 x 10^5 клеток/лунка в cRPMI в объеме 50 мкл/лунка. PBMC стимулировали в представленных в трех повторностях лунках пулами S-пептидов SARS-CoV-2 в конечной концентрации 1 мкг/мл/пептид. В качестве отрицательного контроля использовали только cRPMI в представленных в трех повторностях лунках. После 18 часов инкубации при 37°C с 5% CO_2 планшеты проявляли, как описано ранее. Количество специфичных клеток, секретирующих IFN-γ, определяли с использованием анализатора ImmunoSpot® S6 (Cellular Technology, Кливленд, США). Для каждого животного средние значения данных, предусматривающих "только cRPMI", вычитали из значений данных для S-пептидного пула 1, 2 и 3, которые затем суммировали и выражали в виде скорректированного по отношению к среде количества антигенспецифичных клеток, секретирующих IFN-γ, на 1 *x* 10^6 PBMC. Для оценки внутриклеточной экспрессии цитокинов PBMC, полученные через 14 и 42 dpv, суспендировали в cRPMI при плотности 2 x 10^7 клеток/мл и добавляли по 50 мкл/лунка в 96-луночные круглодонные планшеты. PBMC стимулировали в представленных в трех повторностях лунках с помощью пулов S-пептидов SARS-CoV-2 (1 мкг/мл/пептид). В качестве отрицательного контроля использовали нестимулированные клетки в представленных в трех повторностях лунках. После 14 часов инкубации при 37°C, 5% CO_2 секрецию цитокинов блокировали добавлением 1:1000 BD GolgiPlug (BD Biosciences) и клетки дополнительно инкубировали в течение 6 часов. PBMC промывали в PBS и поверхность метили фиксируемым красителем для определения жизнеспособности Zombie NIR (BioLegend), mAb CD4-PerCP-Cy5.5 (клон 74-12-4, BD Bioscience) и mAb CD8β-FITC (клон PPT23, Bio-Rad Antibodies). После фиксации (буфер для фиксации, BioLegend) и пермеабилизации (пермеабилизирующий промывочный буфер, BioLegend) клетки окрашивали с помощью:

mAb IFN-γ-AF647 (клон CC302, Bio-Rad Antibodies, Кидлингтон, Великобритания), mAb TNF-α-BV421 (клон Mab11, BioLegend), mAb IL-2 (клон A150D 3F1 2H2, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) и mAb IL-4 BV605 (клон MP4-25D2, BioLegend) с последующим окрашиванием антителом к IgG мыши IgG2a-PE-Cy7 (клон RMG2a-62, BioLegend). Клетки анализировали с использованием проточного цитометра BD LSRFortessa и программного обеспечения FlowJo X. Общие цитокин-положительные ответы, специфичные в отношении S-белка SARS-CoV-2, представлены после вычитания фонового ответа, выявленного в стимулированном средой контрольном образце PBMC от каждой свиньи, перед суммированием частот встречаемости клеток, специфичных в отношении S-пептидных пулов 1-3.

Список литературы

1 Zhu, F.-C. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *The Lancet*, doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31208-3 (2020).

2 van Doremalen, N. *et al.* A single-dose ChAdOx1-vectored vaccine provides complete protection against Nipah Bangladesh and Malaysia in Syrian golden hamsters. *PLoS Negl Trop Dis* **13**, e0007462, doi:10.1371/journal.pntd.0007462 (2019).

3 Folegatti, P. M. *et al.* Safety and immunogenicity of a candidate Middle East respiratory syndrome coronavirus viral-vectored vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, uncontrolled, phase 1 trial. *The Lancet. Infectious diseases*, doi:10.1016/s1473-3099(20)30160-2 (2020).

4 Munster, V. J. *et al.* Protective efficacy of a novel simian adenovirus vaccine against lethal MERS-CoV challenge in a transgenic human DPP4 mouse model. *NPJ Vaccines* **2**, 28-28, doi:10.1038/s41541-017-0029-1 (2017).

5 van Doremalen, N. *et al.* A single dose of ChAdOx1 MERS provides broad protective immunity against a variety of MERS-CoV strains. *bioRxiv*, 2020.2004.2013.036293, doi:10.1101/2020.04.13.036293 (2020).

6 van Doremalen, N. *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *bioRxiv*, 2020.2005.2013.093195, doi:10.1101/2020.05.13.093195 (2020).

7 van Doremalen, N. *et al.* A single dose of ChAdOx1 MERS provides protective immunity in rhesus macaques. *Science Advances*, eaba8399, doi:10.1126/sciadv.aba8399 (2020).

8 Suleman, M. *et al.* Antigen encoded by vaccine vectors derived from human adenovirus serotype 5 is preferentially presented to CD8+ T lymphocytes by the CD8α+ dendritic cell subset. *Vaccine* **29**, 5892-5903, doi:10.1016/j.vaccine.2011.06.071 (2011).

9 Zhang, Y. *et al.* Immunization with an adenovirus-vectored TB vaccine containing Ag85A-Mtb32 effectively alleviates allergic asthma. *J Mol Med (Berl)* **96**, 249-263, doi:10.1007/s00109-017-1614-5 (2018).

10 Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L. & Gerdts, V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in microbiology* **20**, 50-57, doi:10.1016/j.tim.2011.11.002 (2012).

11 Gerdts, V. *et al.* Large Animal Models for Vaccine Development and Testing. *ILAR Journal* **56**, 53-62, doi:10.1093/ilar/ilv009 (2015).

12 Rivera-Hernandez, T. *et al.* The contribution of non-human primate models to the development of human vaccines. *Discov Med* **18**, 313-322 (2014).

13 Holzer, B. *et al.* Comparison of Heterosubtypic Protection in Ferrets and Pigs Induced by a Single-Cycle Influenza Vaccine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **200**, 4068-4077, doi:10.4049/jimmunol.1800142 (2018).

14 Holzer, B. *et al.* Immunogenicity and Protective Efficacy of Seasonal Human Live Attenuated Cold-Adapted Influenza Virus Vaccine in Pigs. *Front Immunol* **10**, 2625, doi:10.3389/fimmu.2019.02625 (2019).

15 Morgan, S. B. *et al.* Aerosol Delivery of a Candidate Universal Influenza Vaccine Reduces Viral Load in Pigs Challenged with Pandemic H1N1 Virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **196**, 5014-5023, doi:10.4049/jimmunol.1502632 (2016).

16 McLean, R. K. & Graham, S. P. Vaccine Development for Nipah Virus Infection in Pigs. *Front Vet Sci* **6**, 16, doi:10.3389/fvets.2019.00016 (2019).

17 Pedrera, M. *et al.* Bovine Herpesvirus-4-Vectored Delivery of Nipah Virus Glycoproteins Enhances T Cell Immunogenicity in Pigs. *Vaccines (Basel)* **8**, doi:10.3390/vaccines8010115 (2020).

18 Grifoni, A. *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2020.05.015 (2020).

19 Zheng, H. Y. *et al.* Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* **17**, 541-543, doi:10.1038/s41423-020-0401-3 (2020).

20 Chen, G. *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* **130**, 2620-2629, doi:10.1172/jci137244 (2020).

21 Xiong, Y. *et al.* Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* **9**, 761-770, doi:10.1080/22221751.2020.1747363 (2020).

22 Braun, J. *et al.* Presence of SARS-CoV-2 reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. *medRxiv*, 2020.2004.2017.20061440, doi:10.1101/2020.04.17.20061440 (2020).

23 Chandrashekar, A. *et al.* SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*, doi:10.1126/science.abc4776 (2020).

24 Yu, J. *et al.* DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*, eabc6284, doi:10.1126/science.abc6284 (2020).

25 Amanat, F. *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, doi:10.1038/s41591-020-0913-5 (2020).

Анализ данных

Для графического и статистического анализа наборов данных использовали GraphPad Prism 8.1.2 (GraphPad Software, Сан-Диего, США). ANOVA или применение модели смешанных эффектов выполняли для сравнения ответов с течением времени и между группами вакцины в разные моменты времени после вакцинации, как подробно описано в результатах. Перед анализом данные относительно титров нейтрализующих антител подвергали логарифмическому преобразованию. Данные относительно титров нейтрализующих антител, полученные с помощью анализов VNT и pVNT, сравнивали с использованием непараметрической корреляции Спирмена. p-значения $< 0,05$ считались статистически значимыми.

Пример 15. Демонстрация на людях

В данном примере авторы настоящего изобретения описывают безопасность и иммуногенность вакцины ChAdOx1 nCoV-19 против SARS-CoV-2: рандомизированное контрольное испытание фазы I/II.

Авторы настоящего изобретения ссылаются на пример 1 и пример 2, где раскрыты такие испытания; авторы настоящего изобретения ссылаются на пример 4, где такие испытания раскрыты более подробно; авторы настоящего изобретения ссылаются на пример 8, где схемы испытаний раскрыты еще более подробно.

Что еще более важно, авторы настоящего изобретения специально ссылаются на приведенный выше пример 11, в котором подробно описаны клинические испытания на

людях, которые обсуждаются ниже. Понять это может помочь чтение данного примера вместе с примером 11. Опытный читатель заметит, что существует разница в количестве добровольцев в приведенном ниже обсуждении по сравнению с обсуждением в примере 11. По всем другим существенным деталям, при необходимости, можно обращаться к примеру 11.

Уровень техники

Авторы настоящего изобретения провели одностороннее слепое рандомизированное контролируемое исследование фазы 1/2 ChAdOx1 nCoV-19 по сравнению с MenACWY в качестве контрольной вакцины у здоровых взрослых в Соединенном Королевстве.

В данном примере авторы настоящего изобретения описывают иммуногенность, реактогенность и безопасность вакцинации с помощью 5 x 10^{10} в. ч. ChAdOx1 nCoV-19 через 1 месяц.

Способы

Вакцина

Вакцина ChAdOx1 nCoV-19 состоит из вектора на основе аденовируса обезьян ChAdOx1 с недостаточной репликацией, содержащего полноразмерный структурный поверхностный гликопротеин (шиповидный белок) SARS-CoV-2 (nCoV-19), с лидерной последовательностью тканевого активатора плазминогена (tPA). ChAdOx1 nCoV-19 экспрессирует кодон-оптимизированную кодирующую последовательность для шиповидного белка из последовательности генома под номером доступа в GenBank: MN908947. Рекомбинантный аденовирус был получен, как описано ранее. [9] Вакцина была изготовлена в соответствии с действующей надлежащей производственной практикой в Научно-исследовательском институте (Оксфордский университет, Оксфорд, Великобритания).

Лицензированную конъюгированную вакцину против менингококков групп A, C, W-135 и Y (MenACWY, Nimenrix, Pfizer, Великобритания) использовали в качестве активного препарата сравнения для обеспечения закрытия сведений для участников, у которых наблюдались местные или системные реакции.

План и участники исследования

Это представляет собой продолжающееся слепое для участников многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование фазы 1/2. Исследование проводили в 5 центрах Великобритании (Центре клинической вакцинологии и тропической медицины Оксфордского университета; Университетской клинике Саутгемптона Доверительного фонда Национальной службы здравоохранения, Саутгемптон; Центре клинических

исследований Королевского колледжа Лондона; Лондонском университете Святого Георгия и университетской больнице Доверительного фонда Национальной службы здравоохранения и университетских больницах Bristol и Weston Доверительного фонда Национальной службы здравоохранения). Здоровые взрослые участники в возрасте 18-55 лет были набраны через местные объявления. Все участники подвергались скрининговому визиту, во время которого в дополнение к анализам крови и мочи (ВИЧ, гепатит B и C, общий анализ крови, функциональные тесты почек и печени, анализ мочи на кровь, белок и глюкозу,а также тест на беременность у женщин детородного возраста) были собраны полная история болезни и проведено обследование. Добровольцы с лабораторно подтвержденным COVID-19 в анамнезе, лица с повышенным риском заражения COVID-19 до включения в исследование и лица с новым появлением лихорадки, кашля, одышки и аносмии/агевзии с февраля 2020 года исключались из исследования. Полная информация о критериях приемлемости описана в протоколе исследования, представленном в дополнительных материалах.

От всех участников получали письменное информированное согласие и исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и надлежащей клинической практики. Это исследование было одобрено в Великобритании Агентством по регулированию лекарственных средств и изделий медицинского назначения (ссылка 21584/0424/001-0001) и Комитетом по этике исследований Южно-Центрального Беркшира (ссылка 20/SC/0145). Использование вакцины было разрешено Комитетом по безопасности генетически модифицированных организмов Национальной службы здравоохранения больниц Оксфордского университета (ссылка GM462.20.129).

Рандомизация и маскировка

Участники были рандомизированы 1:1 для получения вакцин ChAdOx1 nCoV-19 при 5×10^{10} вирусных частиц или вакцин MenACWY. Списки рандомизации с использованием блочной рандомизации, стратифицированной по группе исследования и исследовательскому центру, были составлены статистиком исследования. Размеры блоков 2, 4 и 6 были выбраны в соответствии с размерами исследуемых групп и количеством доз, доступных на флакон, и различались между группами исследования. Компьютерная рандомизация проводилась с полным сокрытием распределения на защищенной веб-платформе, используемой для исследования eCRF (REDCap 9.5.22 - © 2020 Университет Вандербильта). Персонал испытания, вводивший вакцину, готовил вакцины вне поля зрения участника, а шприцы покрывали непрозрачным материалом, пока они не были готовы к введению, чтобы обеспечить закрытие сведений для участников.

Процедуры

Обе вакцины вводили однократно внутримышечно в дельтовидную мышцу. Был использован постадийный подход, и промежуточные обзоры безопасности проводились с независимым Советом по мониторингу данных и безопасности (DSMB), прежде чем приступить к вакцинации больших количеств добровольцев. Добровольцев считали включенными в исследование в момент вакцинации. Десять участников были включены в нерандомизированную группу в режиме "прайм-буст".

У участников брали образцы крови и выполняли клиническую оценку безопасности, а также иммунологическую оценку в дни 0, 28 и наблюдали участников в дни 184 и 364. Кроме того, участникам, включенным в компонент исследования фазы 1 и группе в режиме "прайм-буст" наносили визиты через 3, 7 и 14 дней после каждой вакцинации. Более поздняя поправка к протоколу предусматривала дополнительное тестирование стимулирующей вакцинации у подгруппы участников, результаты которой еще не были доступны и не включены в этот отчет.

Нерандомизированная подгруппа участников получала 1 г профилактического парацетамола до вакцинации, и им было рекомендовано продолжать прием по 1 г каждые 6 часов в течение 24 часов, чтобы уменьшить реакции, связанные с вакциной.

Участников наблюдали в клинике в течение 1 ч. после процедуры вакцинации и просили записывать любые нежелательные явления (AE) с использованием электронных дневников в течение 28-дневного периода последующего наблюдения. Ожидаемые и определенные протоколом местные реакции в месте инъекции (боль в месте инъекции, болезненность, повышение температуры, покраснение, припухлость, уплотнение и прурит) и системные симптомы (недомогание, миалгия, артралгия, утомляемость, тошнота, головная боль, лихорадочное состояние и объективная лихорадка, определяемая как температура в полости рта 38°C и выше) регистрировали в течение 7 дней. Все остальные явления регистрировали в течение 28 дней, а серьезные нежелательные явления регистрировали в течение всего периода наблюдения.

Тяжесть AE классифицировали по следующим критериям: легкое (преходящий или легкий дискомфорт < 48 часов, не мешает деятельности, не требует медицинского вмешательства/терапии), умеренное (ограничение активности от легкой до умеренной, может потребоваться некоторая помощь; не требуется или требуется минимальное медицинское вмешательство/терапия), тяжелое (выраженное ограничение активности, обычно требуется некоторая помощь; требуется медицинское вмешательство/терапия) и потенциально опасное для жизни (требуется оценка в отделении неотложной помощи или

госпитализация). Неожиданные АЕ анализировались в отношении причинно-следственной связи двумя клиницистами, которым были закрыты сведения о распределении по группам, и сообщалось о явлениях, которые считались возможно, вероятно или определенно связанными с исследуемыми вакцинами. Лабораторные нежелательные явления оценивали с использованием таблиц токсичности для конкретных участков, которые были адаптированы из шкалы оценки токсичности Управления по санитарному надзору за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США.

Меры иммуногенности

Гуморальный ответ на вакцинацию оценивали с использованием ELISA общего IgG против тримерного шиповидного белка SARS CoV-2, двух анализов нейтрализации живого SARS Cov2 и анализа нейтрализации псевдовируса. Ниже приведены следующие подробности.

ELISA для выявления в сыворотке крови общего антигенспецифического IgG SARS-CoV-2

Общее количество антител к SARS-CoV-2 определяли с использованием внутреннего непрямого ELISA, в котором использовалась стандартная кривая, полученная из пула образцов плазмы людей, выздоравливающих от SARS-COV-2, в каждом планшете. Вкратце, планшеты покрывали 2 мкг/мл полноразмерного тримеризованного шиповидного гликопротеина SARS-CoV-2 (собственного получения) и хранили при 4°C в течение ночи по меньшей мере 16 ч. После покрытия планшеты промывали с помощью PBS/0,05% Tween и блокировали казеином. Размороженные образцы, разбавленные казеином, высевали в трех повторностях вместе с двумя внутренними положительными контролями (контроли 1 и 2) для измерения вариаций от планшета к планшету. Контроль 1 представлял собой разбавление образца плазмы крови выздоравливающих людей, а контроль 2 представлял собой исследовательский реагент для антител к SARS-CoV-2 (код 20/130, предоставленный Национальным институтом биологических стандартов и контроля (NIBSC)). Стандартный пул использовали в двукратном серийном разбавлении с получением десяти стандартных точек, которым были присвоены произвольные единицы ELISA (EU). Антитело козы к IgG человека (специфическое к γ-цепи), конъюгированное со щелочной фосфатазой, использовали в качестве вторичного антитела, и планшеты проявляли добавлением 4-нитрофенилфосфата в диэтаноламиновый субстратный буфер. Стандартизированные ЕС определяли из одного разбавления каждого образца по стандартной кривой, построенной с использованием 4-параметрической логистической модели (Gen5 v3.09, Biotek). Каждый планшет для анализа состоял из образцов и

контролей, высеянных в трех повторностях, с десятью стандартными точками в двух экземплярах и четырьмя пустыми лунками.

Нейтрализация вируса Марбург SARS-CoV-2

Нейтрализующую активность сыворотки крови человека в отношении SARS-CoV-2 исследовали на основе ранее опубликованных протоколов для MERS-CoV (PMID: 32325038, 32325037). Вкратце, образцы инактивировали нагреванием в течение 30 мин. при 56°C и серийно разбавляли в 96-луночных планшетах, начиная с разбавления 1:8. Образцы инкубировали в течение 1 ч. при 37°C вместе с 100 50% инфицирующими дозами тканевых культур (TCID50) SARS-CoV-2 (изолят BavPat1/2020, Европейский общий архив вирусов (европейский архив вирусов Global) № 026V-03883). Цитопатический эффект (CPE) в отношении клеток VeroE6 (Vero C1008, ATCC, № по кат. CRL-1586, RRID: CVCL_0574) анализировали через 4 дня после инфицирования. Нейтрализацию определяли как отсутствие CPE по сравнению с вирусными контролями. Для каждого теста положительный контроль (плазма крови пациента, нейтрализующая COVID-19) использовался в двух повторностях в качестве межаналитического стандарта нейтрализации. (Kreer et al 2020; biorxiv "Longitudinal isolation of potent near-germline SARS-CoV-2-neutralizing antibodies from COVID-19 patients" d.o.i: 10.1101/2020.06.12.146290v1)

Анализ монограммы нейтрализации псевдотипа

Получали псевдовирусную частицу SARSCoV-2 на основе лентивируса, экспрессирующую шиповидный белок на поверхности. Анализ nAb PS CoV основан на ранее описанных методиках с использованием псевдовирионов ВИЧ-1 (Petropoulos et al., AAC 2000, Richman et al, PNAS 2003, Whitcomb et al., 2007). Вкратце, образцы сыворотки крови инактивировали нагреванием при 56°C в течение одного часа и разбавляли человеческой сывороткой крови, отрицательной на SARS CoV-2, в соотношении 1:40. Титры нейтрализующих антител (Nab) определяли путем конечных трехкратных серийных разбавлений предварительно смешанных тестируемых образцов, смешанных с $10^?$ относительных световых единиц (RLU) псевдотипированного вируса SARS-CoV2, инкубированных при 37°C в течение одного час, а затем смешанных с $10^?$ HEK 293 ACE2-трансфицированных клеток на лунку. Также отдельно с тестируемыми образцами смешивали нерелевантный контрольный псевдотипированный вирус. Планшеты инкубировали в течение 60-80 часов при 37°C, а затем анализировали в отношении экспрессии люциферазы. О титрах нейтрализации сообщали как об обратной величине разбавления сыворотки крови, предусматривающего 50% ингибирование (ID50)

псевдовирусной инфекции. % ингибирования = 100% – (((RLU (вектор + образец + разбавитель) – RLU (фон))/(RLU (вектор + разбавитель) – RLU (фон))) x 100%. Анализ nAb к SARS CoV-2 положительных и отрицательных контрольных сывороток крови включали в каждый 96-луночный планшет для анализа (1 положительный контроль, 1 отрицательный контроль, 6 образцов пациентов).

Тест нейтрализации бляшкообразования от Службы общественного здравоохранения Англии.

Титры нейтрализующих вирусов измеряли в инактивированных нагреванием (56°C в течение 30 мин.) образцах сыворотки крови. SARS-CoV-2 разбавляли до концентрации 933 БОЕ/мл (70 БОЕ/75 мкл) и смешивали в соотношении 50:50 в 1% FCS/MEM с удвоенными разбавлениями сыворотки крови от 1:20 до 1:640 в 96-луночном планшете с V-образными лунками. Планшет инкубировали при 37°C во влажном боксе в течение 1 часа, чтобы обеспечить связывание антителом вируса в образцах сыворотки крови. Разбавления вируса и сыворотки крови переносили в лунки промытого 24-луночного планшета для анализа бляшек, оставляли для адсорбции при 37°C в течение часа и покрывали слоем среды для анализа бляшек. Через 5 дней инкубации при 37°C в увлажненном боксе планшеты фиксировали, окрашивали и подсчитывали бляшки. Медианные нейтрализующие титры (ND_{50}) определяли с использованием формулы Спирмена-Карбера относительно контрольных лунок, содержащих только вирус.

Анализ микронейтрализации от Службы общественного здравоохранения Англии

Принцип MNA аналогичен PRNT. Чувствительные к вирусу монослои (клетки Vero/E6) в 96-луночных планшетах обрабатывали смесью сыворотка крови/вирус, полученной как для PRNT. Планшеты инкубировали в запечатанном увлажненном боксе в течение 1 часа перед удалением инокулята вируса и заменой слоем покрытия (1% вес/об. CMC в полной среде). Коробку повторно запечатывали и инкубировали в течение 24 часов перед фиксацией формальдегидом. Микробляшки визуализировали с использованием антитела к SARS-CoV-2, специфического к шиповидному белку RBD SARS-CoV-2, и конъюгата HRP кролика, инфицированные очаги визуализировали с использованием субстрата TrueBlue™. Окрашенные микробляшки подсчитывали с использованием анализатора ImmunoSpot® S6 Ultra-V и полученные результаты анализировали в программном обеспечении SoftMax Pro v7.0.

Мультиплексный иммуноанализ

Был разработан мультиплексный иммуноанализ для измерения антигенспецифического ответа на вакцинацию ChAdOx1 nCoV-19 и/или естественную инфекцию SARS-CoV-2

(MesoScaleDiscovery, Роквилл, Мэриленд). Изготовленный по заказу 10-луночный серологический планшет SARS-CoV2 SECTOR® покрывали шиповидными антигенами SARS-CoV2, N и RBD, полученными в MesoScaleDiscovery. Объединенная в пул человеческая сыворотка крови была разработана для внутренних контролей качества и в качестве эталонных стандартных реагентов. Для оценки антитела к шиповидному антигену и антитела к RBD , IgG, антигены наносили на планшеты в концентрации от 200 до 400 мкг/мл в PBS. Уравновешенные планшеты блокировали блокатором A в течение 1 ч. и промывали 3 раза перед добавлением эталонного стандарта, контролей и образцов. После инкубации в течение 2 часов планшеты промывали 3 раза и добавляли антитела, выявляющие IgG (конъюгированные с SULFO-TAG антитела к IGG человека, клон 2A11), в концентрации 200 мкг/мл. Планшеты инкубировали в течение 1 часа, промывали 3 раза и считывали в буфере для считывания MSD Read Buffer T.

ELISPOT IFNg ex vivo для подсчета антигенспецифических Т-клеток

Анализы ELISpot проводили с использованием свежевыделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) для определения ответов на вакцинный шиповидный антиген SARS-CoV-2 в дни 0 (до вакцинации), 7, 14, 28 и 56, а также в D35 и 42 у участников, которые получали две дозы. Анализы проводили с использованием планшетов Multiscreen IP ELISpot (Merck Millipore, Уотфорд, Великобритания), покрытых 10 мкг/мл человеческого антитела к IFN-γ, и разработанных с использованием наборов конъюгатов антител SA-ALP (Mabtech, Стокгольм, Швеция) и хромогенного субстрата BCIP NBT-плюс (Moss Inc., Пасадена, Массачусетс, США). PBMC отделяли от цельной крови с помощью литиевого гепарина путем центрифугирования по плотности в течение четырех часов от венопункции. Клетки инкубировали в течение 18-20 часов в среде RPMI (Sigma), содержащей 1000 единиц/мл пенициллина, 1 мг/мл стрептомицина и 10% инактивированной нагреванием, стерильно отфильтрованной фетальной телячьей сыворотки, предварительно подвергнутой скринингу в отношении низкой реактивности (Labtech International, Восточный Суссекс, Великобритания) с конечной концентрацией 10 мкг/мл объединенного в пул пептида. Всего для стимуляции PBMC использовали 253 синтетических пептида (15 аминокислот, перекрывающихся 10 аминокислотами), охватывающих всю вакцинную вставку, включая лидерную последовательность tPA (Pro-Immune, Оксфорд, Великобритания). Пептиды были объединены в 12 пулов для шиповидного белка SARS-CoV-2, содержащих от 18 до 24 пептидов, плюс один пул из 5 пептидов для лидерной последовательности tPA. Последовательности пептидов и объединения в пул изложены в дополнительной таблице S4. Пептиды тестировали в трех

повторностях, добавляя по 2,5 x 10^5 PBMC в каждую лунку планшета ELISpot в конечном объеме 100 мкл. Результаты выражены в виде пятно-образующих клеток (SFC) на миллион PBMC, рассчитанных путем вычитания среднего ответа отрицательного контроля из среднего значения ответа каждого пула пептидов, а затем суммирования ответа для 13 пулов пептидов. Стафилококковый энтеротоксин B (0,02 мкг/мл) и фитогемагглютинин-L (10 мкг/мл) объединяли и использовали в качестве положительного контроля. Планшеты подсчитывали с использованием автоматического счетчика AID ELISpot (AID Diagnostika GmbH, алгоритм C, Штрассберг, Германия) с одинаковыми настройками для всех планшетов и подсчет корректировали только для удаления артефактов. Использовался процесс контроля качества, при котором планшеты исключались, если ответы составляли >80 SFC/миллион PBMC в отрицательном контроле (PBMC без антигена) или <800 SFC/миллион PBMC в лунках положительного контроля. Ответы на отрицательный контроль были низкими, со средним значением XX SFC (межквартильный диапазон (IQR) XX–XX).

Исходы

Второстепенными целями являлись оценка эффективности против симптоматического вирусологически подтвержденного заболевания COVID-19 и частоты возникновения серьезных нежелательных явлений. Вторичные результаты включали профили безопасности, реактогенности и иммуногенности ChAdOx1 nCoV-19, а также эффективность против заболевания COVID-19, требующего лечения в больнице, летального исхода и сероконверсии в отношении белков, не являющихся шиповидными. В данном документе представлены предварительные результаты для вторичных конечных точек: частота возникновения признаков и симптомов местной и системной реактогенности в течение 7 дней после вакцинации; частота возникновения неожиданных нежелательных явлений в течение 28 дней после вакцинации; изменение от дня 0 (исходный уровень) до дня 28 для лабораторных мер безопасности; частота возникновения серьезных нежелательных явлений; клеточная и гуморальная иммуногенность ChAdOx1 nCoV-19.

Исследование сывороток крови от выздоравливающих пациентов с COVID-19

Образцы от индивидуумов в возрасте ≥ 18 лет с ПЦР-положительной инфекцией SARS-CoV-2 были получены из когорт пациентов, госпитализированных или находящихся под наблюдением медицинских работников. (Желудочно-кишечные заболевания в Оксфорде: дополнительное исследование COVID [Sheffield REC, ссылка: 16/YH/0247], Протокол клинической характеристики тяжелых возникающих инфекций ISARIC/BO3 [Oxford REC

C, ссылка 13/SC/0149], Проект по иммунологии сепсиса [Oxford REC C, ссылка: 19/SC/0296]).

Статистический анализ

Конечные точки безопасности описаны как частоты и процентные значения с 95% биномиальным точным доверительным интервалом (CI). Медианы и межквартильные диапазоны представлены для иммунологических конечных точек, а анализы считаются описательными, поскольку полный набор образцов еще не был проанализирован на всех платформах, и поэтому представленные в данном документе результаты являются предварительными.

Статистический анализ проводился с использованием SAS версии 9.4 и R версии 3.6.1 или более поздней.

Размер выборки для исследования определялся количеством доз вакцины, которые были доступны для использования после начального процесса клинического изготовления. Размеры выборки для оценки эффективности основаны на количестве первичных исходов, которые накапливались и представлены в протоколе, прилагаемом в виде дополнительного файла. Анализы эффективности не проводились и не включены в данный отчет.

Независимый Совет по мониторингу данных и безопасности предусматривал надзор за безопасностью (см. дополнительный файл).

Это исследование зарегистрировано в ClinicalTrials.gov, NCT04324606 и в ISRCTN, номер 15281137.

Исследование

В период от 23-го апреля до 21-го мая 2020 года 1077 участников были включены в исследование и вакцинированы контрольной вакциной либо ChAdOx1 nCoV-19, либо MenACWY. (Фигура 22).

Медианный возраст участников составлял 35 лет (IQR 28, 44 года), 50% участников были женщинами, а 91% участников были белокожими (см. таблицу ниже). Исходные характеристики были схожи между рандомизированными группами (см. таблицу ниже).

Таблица. Исходные характеристики рандомизированных участников

	ChAdOx1 N=543	**MenACWY N=534**
Женского пола (n %)	265 (49%)	271 (51%)
Возраст, лет, медиана [IQR]	34 [28, 43]	36 [28, 45]
Некурильщик	495 (91%)	485 (91%)
Непьющий	89 (16%)	60 (11%)
BMI, медиана [IQR]	24 [22, 27]	24 [22, 27]
Этническая принадлежность		
Араб	2 (<1%)	2 (<1%)
Негроидная	4 (1%)	2 (<1%)
Восточная монголоидная	5 (1%)	4 (1%)
Южная монголоидная	15 (3%)	20 (4%)
Смешанный	12 (2%)	9 (2%)
Другая	11 (2%)	10 (2%)
Нет данных	1 (<1%)	1 (<1%)
Европеоидная	493 (91%)	486 (91%)

Среди тех, кто не получал профилактического парацетамола, 67% участников с ChAdOx1 nCoV-19 и 38% участников с MenACWY сообщали о боли после вакцинации, которая была в основном легкой или умеренной интенсивности. При профилактическом приеме парацетамола боль уменьшалась на 50% у участников с ChAdOx1 nCoV-19 и 32% участников с MenACWY. О болезненных ощущениях преимущественно легкой степени сообщали 83% участников с ChAdOx1 nCoV-19 без парацетамола и 77% с парацетамолом, а также 58% без парацетамола и 46% с парацетамолом реципиентов с MenACWY. (Фигура 15, таблица S2 ниже).

Таблица S2. Запрашиваемые побочные местные и системные реакции с профилактическим приемом парацетамола и б
него согласно электронному дневни

Симптом	**Группа вакцины**	**Парацетамол**	**Отсутствие**	**Легкая**	**Умеренная**	**Тяжелая**	**Госпитализация**
Боль	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	28 (50%, 36%-64%)	22 (39%, 26%-53%)	5 (9%, 3%-20%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	159 (33%, 28%-37%)	258 (53%, 48%-57%)	66 (14%, 11%-17%)	4 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	39 (68%, 55%-80%)	15 (26%, 16%-40%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	296 (62%, 58%-67%)	160 (34%, 29%-38%)	18 (4%, 2%-6%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Покраснение	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	55 (98%, 90%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	472 (97%, 95%-98%)	8 (2%, 1%-3%)	6 (1%, 0%-3%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	56 (98%, 91%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	465 (98%, 96%-99%)	4 (1%, 0%-2%)	6 (1%, 0%-3%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)

Повышение температуры	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	45 (80%, 68%-90%)	10 (18%, 9%-30%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	365 (75%, 71%-79%)	121 (25%, 21%-29%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	47 (82%, 70%-91%)	10 (18%, 9%-30%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	376 (79%, 75%-83%)	96 (20%, 17%-24%)	3 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Зуд	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	49 (88%, 76%-95%)	6 (11%, 4%-22%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	452 (93%, 90%-95%)	35 (7%, 5%-10%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	55 (96%, 88%-100%)	2 (4%, 0%-12%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	450 (95%, 92%-97%)	23 (5%, 3%-7%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Припухлость	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	55 (98%, 90%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	466 (96%, 93%-97%)	10 (2%, 1%-4%)	10 (2%, 1%-4%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	53 (93%, 83%-98%)	3 (5%, 1%-15%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)

		Без парацетамола	461 (97%, 95%-98%)	8 (2%, 1%-3%)	6 (1%, 0%-3%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Уплотнение	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	56 (100%, 94%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	470 (97%, 94%-98%)	13 (3%, 1%-5%)	3 (1%, 0%-2%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	54 (95%, 85%-99%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	466 (98%, 96%-99%)	7 (1%, 1%-3%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Болезненность	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	13 (23%, 13%-36%)	38 (68%, 54%-80%)	5 (9%, 3%-20%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	84 (17%, 14%-21%)	333 (68%, 64%-72%)	66 (14%, 11%-17%)	4 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	31 (54%, 41%-68%)	26 (46%, 32%-59%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	201 (42%, 38%-47%)	256 (54%, 49%-58%)	17 (4%, 2%-6%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Лихорадочное состояние	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	36 (64%, 50%-77%)	8 (14%, 6%-26%)	12 (21%, 12%-34%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	237 (49%, 44%-53%)	99 (20%, 17%-24%)	111 (23%, 19%-27%)	40 (8%, 6%-11%)	0 (0%, 0%-1%)

	MenACWY	Парацетамол	52 (91%, 81%-97%)	5 (9%, 3%-19%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	437 (92%, 89%-94%)	36 (8%, 5%-10%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Лихорадка ≥ 38°C	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	47 (84%, 72%-92%)	6 (11%, 4%-22%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	400 (82%, 78%-85%)	46 (9%, 7%-12%)	33 (7%, 5%-9%)	8 (2%, 1%-3%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	57 (100%, 94%-100%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	473 (100%, 98%-100%)	2 (0%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Зябкость	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	41 (73%, 60%-84%)	10 (18%, 9%-30%)	5 (9%, 3%-20%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	215 (44%, 40%-49%)	121 (25%, 21%-29%)	112 (23%, 19%-27%)	39 (8%, 6%-11%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	52 (91%, 81%-97%)	5 (9%, 3%-19%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	429 (90%, 87%-93%)	42 (9%, 6%-12%)	4 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Боль в суставах	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	40 (71%, 58%-83%)	12 (21%, 12%-34%)	4 (7%, 2%-17%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)

		Без парацетамола	337 (69%, 65%-73%)	97 (20%, 16%-24%)	47 (10%, 7%-13%)	6 (1%, 0%-3%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	51 (89%, 78%-96%)	4 (7%, 2%-17%)	2 (4%, 0%-12%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	429 (90%, 87%-93%)	37 (8%, 6%-11%)	8 (2%, 1%-3%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Мышечная боль	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	29 (52%, 38%-65%)	14 (25%, 14%-38%)	13 (23%, 13%-36%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	193 (40%, 35%-44%)	168 (34%, 30%-39%)	107 (22%, 18%-26%)	19 (4%, 2%-6%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	42 (74%, 60%-84%)	14 (25%, 14%-38%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	358 (75%, 71%-79%)	104 (22%, 18%-26%)	13 (3%, 1%-5%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Утомляемость	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	16 (29%, 17%-42%)	23 (41%, 28%-55%)	14 (25%, 14%-38%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	147 (30%, 26%-34%)	176 (36%, 32%-41%)	134 (28%, 24%-32%)	30 (6%, 4%-9%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	31 (54%, 41%-68%)	19 (33%, 21%-47%)	7 (12%, 5%-24%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	249 (52%, 48%-57%)	169 (36%, 31%-40%)	56 (12%, 9%-15%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)

Головная боль	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	22 (39%, 26%-53%)	25 (45%, 31%-59%)	8 (14%, 6%-26%)	1 (2%, 0%-10%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	156 (32%, 28%-36%)	168 (34%, 30%-39%)	136 (28%, 24%-32%)	27 (6%, 4%-8%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	36 (63%, 49%-76%)	18 (32%, 20%-45%)	3 (5%, 1%-15%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	280 (59%, 54%-63%)	166 (35%, 31%-39%)	26 (5%, 4%-8%)	3 (1%, 0%-2%)	0 (0%, 0%-1%)
Недомогание	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	29 (52%, 38%-65%)	11 (20%, 10%-32%)	14 (25%, 14%-38%)	2 (4%, 0%-12%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	191 (39%, 35%-44%)	136 (28%, 24%-32%)	124 (25%, 22%-30%)	36 (7%, 5%-10%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	51 (89%, 78%-96%)	5 (9%, 3%-19%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	393 (83%, 79%-86%)	70 (15%, 12%-18%)	11 (2%, 1%-4%)	1 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)
Тошнота	ChAdOx1 nCoV-19	Парацетамол	37 (66%, 52%-78%)	14 (25%, 14%-38%)	5 (9%, 3%-20%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)
		Без парацетамола	363 (75%, 70%-78%)	81 (17%, 13%-20%)	33 (7%, 5%-9%)	10 (2%, 1%-4%)	0 (0%, 0%-1%)
	MenACWY	Парацетамол	46 (81%, 68%-90%)	10 (18%, 9%-30%)	1 (2%, 0%-9%)	0 (0%, 0%-6%)	0 (0%, 0%-6%)

Без парацетамола	427 (90%, 87%-92%)	41 (9%, 6%-12%)	7 (1%, 1%-3%)	0 (0%, 0%-1%)	0 (0%, 0%-1%)

Таблица S3. Ожидаемые местные и системные реакции после вакцинаций с примированием и бустингом у участников группы 3

Симптом	1-я доза (N=10)					2-я доза (N=10)				
	Отсутствие	**Легкая**	**Умеренная**	**Тяжелая**	**Госпитализация**	**Отсутствие**	**Легкая**	**Умеренная**	**Тяжелая**	**Госпитализация**
Боль	5 (50%, 19%-81%)	4 (40%, 12%-74%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Покраснение	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Повышение температуры	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Зуд	9 (90%, 55%-100%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	9 (90%, 55%-100%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Припухлость	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Уплотнение	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Болезненность	5 (50%, 19%-81%)	4 (40%, 12%-74%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	5 (50%, 19%-81%)	5 (50%, 19%-81%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)

Симптом	1-я доза (N=10)					2-я доза (N=10)				
	Отсутствие	**Легкая**	**Умеренная**	**Тяжелая**	**Госпитализация**	**Отсутствие**	**Легкая**	**Умеренная**	**Тяжелая**	**Госпитализация**
Лихорадочное состояние	3 (30%, 7%-65%)	2 (20%, 3%-56%)	5 (50%, 19%-81%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	1 (10%, 0%-45%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Лихорадка >= 38 град.	5 (50%, 19%-81%)	5 (50%, 19%-81%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Зябкость	2 (20%, 3%-56%)	5 (50%, 19%-81%)	3 (30%, 7%-65%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Боль в суставах	7 (70%, 35%-93%)	2 (20%, 3%-56%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	10 (100%, 69%-100%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Мышечная боль	4 (40%, 12%-74%)	4 (40%, 12%-74%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Утомляемость	5 (50%, 19%-81%)	4 (40%, 12%-74%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	6 (60%, 26%-88%)	3 (30%, 7%-65%)	1 (10%, 0%-45%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Головная боль	3 (30%, 7%-65%)	3 (30%, 7%-65%)	4 (40%, 12%-74%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	6 (60%, 26%-88%)	4 (40%, 12%-74%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Недомогание	6 (60%, 26%-88%)	0 (0%, 0%-31%)	4 (40%, 12%-74%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)
Тошнота	6 (60%, 26%-88%)	1 (10%, 0%-45%)	3 (30%, 7%-65%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	8 (80%, 44%-97%)	2 (20%, 3%-56%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)	0 (0%, 0%-31%)

Усталость и головная боль были наиболее частыми системными реакциями, о которых сообщалось. Усталость была зарегистрирована у 70% и 71% (без парацетамола, с парацетамолом) участников с ChAdOx1 nCoV-19 и 48% и 46% (без парацетамола, с парацетамолом) реципиентов MenACWY, в то время как головные боли возникали у 68% и 61% (без парацетамола, с парацетамолом). участников с ChAdOx1 nCoV-19 и 41% и 37% (без парацетамола, с парацетамолом) реципиентов MenACWY.

Другие системные побочные реакции были распространены в группе ChAdOx1 nCoV-19: мышечная боль 60%, 48% (без парацетамола, с парацетамолом) недомогание 61%, 48% (без парацетамола, с парацетамолом); зябкость 56%, 37% (без парацетамола, с парацетамолом) и лихорадочное состояние 51%, 36% (без парацетамола, с парацетамолом). 18% и 16% участников с ChAdOx1 nCoV-19 (без парацетамола, с парацетамолом) сообщали о температуре $\geq 38^{o}C$, а 2% имели температуру $\geq 39^{o}C$ без парацетамола. Для сравнения < 0,5% из тех, кто получал MenACWY, сообщали о повышенной температуре $\geq 38^{\circ}C$, и ни один из тех, кто получал парацетамол профилактически. (Фигура 15, таблица S2).

Тяжесть и интенсивность местных и системных реакций были максимальными в день 1 исследования (фигура 15).

Скорректированный анализ эффект профилактического парацетамола в отношении побочных реакций любой степени тяжести в первые 2 дня после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 показал значительное уменьшение боли, лихорадочное состояние, зябкость, мышечную боль, головную боль и недомогание (фигуры 23 и 24).

Десять человек получили стимулирующую дозу ChAdOx1 nCoV-19, и требуемые местные и системные реакции измеряли в течение 7 дней после примирующей и стимулирующей доз. Профиль реактогенности после второй дозы оказался менее тяжелым в данной подгруппе, хотя число участников в данной группе было небольшим, что привело к широким доверительным интервалам (фигура 16, таблица S3).

Неожиданные нежелательные явления в течение 28 дней после вакцинации, которые, как считалось, возможно, вероятно или определенно связаны с ChAdOx1 nCoV-19, носили преимущественно легкий и умеренный характер и разрешались в течение периода наблюдения. Лабораторные нежелательные явления, которые считались, по меньшей мере возможно, связанными с исследуемым вмешательством, были самоограничивающимися и преимущественно легкой или средней степени тяжести (см. таблицу). Временные гематологические изменения по сравнению с исходным уровнем (лейкопения,

лимфопения, нейтропения и тромбоцитопения) наблюдались у % участников группы ChAdOx1 nCoV-19 по сравнению с %, получавших MenACWY.

Было одно серьезное нежелательное явление, состоящее из нового диагноза гемолитической анемии, случившееся через 9 дней после вакцинации. Участник был клинически здоров на протяжении всего времени наблюдения. Об этом явлении сообщалось как о SUSAR, относящемся к вакцине MenACWY.

В группе ChAdOx1 nCoV-19 антитела к шиповидному белку SARS-CoV-2 достигали пика к дню 28 (медиана 157, IQR 96, 317) и оставались повышенными до дня 56 (медиана 119, IQR 70, 203) у 43 участников, получавших только одну дозу и повышались до медианы 639 (IQR 360, 792) у 10 участников, получавших стимулирующую дозу (фигура 17).

Сходное усиление гуморального ответа как на шиповидный белок, так и на рецептор-связывающий домен к дню 28 и после стимулирующей дозы наблюдалось при измерении в мультиплексном анализе (фигура 18).

Ответы IFN-гамма в ELISpot против шиповидного белка SARS-CoV-2 достигали пика на уровне 856 пятнообразующих клеток на миллион PBMC (SFC) в день 14 (IQR 493,3-1802 SFC), снижаясь до 424 (IQR 221, 799) ко дню 56 после вакцинации (фигура 19).

После однократной дозы ChAdOx1 nCoV-19 у 27% участников уровень антител был достаточным для полного ингибирования проникновения вирусных клеток ко дню 28, а к 56 дню этот показатель увеличивался до 38% участников в анализе на нейтрализацию вируса SARS-CoV-2, как измерено по IC100 (Марбург). После бустерной дозы вирусные титры индуцировали полное ингибирование вируса SARS-CoV-2 у всех участников (фигура 21, верхние панели).

В двух отдельных анализах нейтрализации живого вируса, проведенных в Службе общественного здравоохранения Англии, 100% участников достигли титров PRNT50 на 28-й день, и аналогичные результаты были получены при микронейтрализации (фигура 21, нижние панели). Титры анализа нейтрализации псевдовируса коррелировали с титрами анализа нейтрализации живого вируса и ELISA.

Обсуждение примера 15

Результаты авторов настоящего изобретения показывают, что вакцина-кандидат ChAdOx1 nCoV-19, введенная в виде однократной дозы, была безопасной и переносимой, несмотря на более высокий профиль реактогенности, чем у контрольной вакцины MenACWY. Серьезных побочных реакций на ChAdOx1 nCoV-19 не наблюдалось. Большинство зарегистрированных AE были легкой или умеренной степени тяжести, и все

они проходили самостоятельно. Профиль нежелательных явлений, описанный в данном документе, аналогичен таковому для других вакцин на основе вектора ChAdOx1 и других близкородственных аденовирусов обезьян, таких как вакцины на основе векторов ChAdOx2, ChAd3 и ChAd63, экспрессирующие несколько различных антигенов (ChAdOx1, Folegatti 2020 ChAdOx2, Vaccines 2019, 7, 40; doi:10.3390/vaccines7020040 ChAd63, doi: 10.1038/s41598-018-21630-4 ChAd3, doi: 10.1056/NEJMoa1411627) при данном уровне дозы. Доза 5 x 10^{10} в. ч. была выбрана на основании предыдущего опыта авторов настоящего изобретения с MERS ChAdOx1, где несмотря на повышенную реактогенность наблюдалась зависимость доза-ответ с нейтрализующими антителами.[7] Протокол был написан, когда пандемия в Великобритании развивалась ускоренными темпами, и при этом была выбрана однократная, более высокая доза для обеспечения наибольшей вероятности быстрого индуцирования нейтрализующих антител. В контексте волны пандемии, когда однократная, более высокая, но более реактогенная доза может с большей вероятностью быстро индуцировать защитный иммунитет, использование профилактического парацетамола, по-видимому, повышало переносимость и уменьшало неопределенность с симптомами COVID-19, которые могут быть вызваны непродолжительными симптомами, связанными с вакциной.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что однократная доза ChAdOx1 nCoV-19 вызывала выработку специфических к шиповидному антигену антител ко дню 14 у 64% вакцинированных, которые были очевидными у 95% вакцинированных ко дню 28. У небольшого числа (3%) участников до вакцинации имелись выявляемые антитела к шиповидному белку SARS-CoV-2. Эти ранее существовавшие ответы, вероятно, связаны с бессимптомной инфекцией, поскольку потенциальные участники с недавними симптомами, подобными COVID-19, или с положительным тестом ПЦР на SARS-CoV-2 были исключены из исследования. Из трех человек, сероположительных в день вакцинации в собственном ELISA авторов настоящего изобретения, двое получали ChAdOx1 nCoV-19 и получали ответ на стимулирование.

Нейтрализующие антитела, нацеленные на различные эпитопы шиповидного гликопротеина, были ассоциированы с защитой от заболевания COVID в ранних доклинических исследованиях макак-резусов (Barouch). Хотя коррелят защиты от COVID-19 не был определен, у выздоравливающих людей были продемонстрированы высокие уровни нейтрализующих антител в широком диапазоне, как подтверждено в исследовании авторов настоящего изобретения. Нейтрализующие антитела к живому вирусу SARS-CoV-2 были выявлены у 27% и 100% участников ко дню 28 (IC100 и IC50 соответственно) с

использованием различных анализов. Титры нейтрализующих антител и показатели сероконверсии были увеличены по схеме с двумя дозами, и в настоящее время проводится дальнейшее изучение этого подхода. Корреляция анализов нейтрализации с количественным определением IgG указывала на то, что в случае подтверждения простого ELISA может быть достаточно для прогнозирования защиты, если было бы продемонстрировано, что нейтрализующие антитела обладают защитным действием у людей. Авторы настоящего изобретения представили данные из 3 различных анализов живых нейтрализующих антител и анализа псевдонейтрализации, которые продемонстрировали тесную корреляцию друг с другом, однако дали очень разные титры нейтрализующих антител. Этот аспект подчеркнул острую необходимость в централизованной лабораторной инфраструктуре, дающей возможность связывать вакцины-кандидаты и ускорять доступность нескольких продуктов, чтобы обеспечить глобальный потенциал для прекращения пандемии. Если какая-либо из вакцин-кандидатов продемонстрирует эффективность, то сопоставление этого результата с другими вакцинами-кандидатами посредством тщательно проводимых лабораторных анализов станет критической проблемой для глобального здравоохранения.

Важно отметить, что у пациентов с COVID накапливались данные, свидетельствующие о том, что ответы Т-клеток играют важную роль в смягчении последствий заболевания COVID-19; у индивидуумов, которые подверглись воздействию, но у которых бессимптомно развился устойчивый ответ Т-клеток памяти, который предупреждал заболевание в отсутствие измеримого гуморального ответа.[10-12] Вакцинация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 приводила к значительному усилению специфичных по отношению к шипу SARS CoV-2 Т-клеточных ответов уже в день 7 с пиком в день 14 и сохранявшихся до дня 28 и составляла ? с помощью бустерной вакцинации.

Тяжелые и смертельные случаи SARS CoV-2 непропорционально поражают пожилых людей. Поэтому крайне важно, чтобы вакцины, разработанные против SARS CoV-2, подходили для введения в старших возрастных группах. Иммуногенность вакцины на основе вектора ChAdOx1 против гриппа была продемонстрирована у пожилых людей (50-78 лет). На следующей стадии клинической разработки будут набраны пожилые люди и оценены в отношении безопасности и иммуногенности ChAdOx1 nCoV-19, которую следует вводить в виде схемы с однократной или двукратной дозами. Кроме того, испытания фазы III, которые проходят в Великобритании, Бразилии и Южной Африке, дадут возможность оценить эффективность вакцины.

Ограничения этого исследования включают короткое последующее наблюдение и односторонне слепой проект. Участников, набранных в данном исследовании, будут наблюдать в течение как минимум 1 года, и дальнейшие результаты по безопасности, переносимости и иммуногенности (в дополнение к эффективности) будут сообщены, когда будут доступны данные (Weingartl, H. et al. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. J Virol 78, 12672-12676, doi:10.1128/JVI.78.22.12672-12676.2004 (2004). Bolles, M. et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. J Virol 85, 12201-12215, doi:10.1128/JVI.06048-11 (2011). Liu, L. et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. JCI Insight 4, doi:10.1172/jci.insight.123158 (2019).).

В заключение, ChAdOx1 nCoV-19 была безопасной, переносимой и иммуногенной, при этом реактогенность снижалась парацетамолом. Однократная доза вызывала как гуморальный, так и клеточный ответы против SARS-CoV-2, при этом бустерная иммунизация повышала титры нейтрализующих антител. Предварительные результаты этого первого клинического испытания, впервые проводящегося с участием людей, подтверждают переход клинической разработки к испытаниям фазы 2 и 3. Будут набирать пожилые возрастные группы с сопутствующими заболеваниями, медицинских работников и лиц с повышенным риском заражения SARS-CoV-2 и оценивать в отношении эффективности, безопасности и иммуногенности ChAdOx1 nCoV-19, которую следует вводить в виде схемы введения с однократной или двукратной дозами в дополнительных испытаниях, проводившихся в Великобритании и за рубежом.

Авторы настоящего изобретения также ссылаются на фигуру 25, на которой показано, что нейтрализация псевдотипа (IC50) у реципиентов ChAdOx1 nCoV-19 коррелировала со стандартизированным ELISA и с нейтрализацией живого вируса, как измерено по IC100 (Марбург).

Авторы настоящего изобретения также ссылаются на приведенную ниже таблицу – Сводная статистика для анализов антител и Т-клеточных ответов.

Анализ	**День исследования**		**MenACWY**		**Примирование с помощью ChAdOx1**		**Режим "прайм-буст" с помощью ChAdOx1**
		N	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**
Multiplex MSD – IgG RBD (AU/мл)	0	487	15,6 [10,1, 32,7]	488	18,5 [10,9, 38,8]		
	28	485	15,8 [10,2, 32,4]	482	3182,5 [1426,3, 6800,4]		
	42					9	16825,4 [13118,9, 20937,9]
Multiplex MSD – IgG к шиповидному белку (AU/мл)	0	487	45,5 [26,1, 98,2]	488	57,6 [29,1, 125,8]		
	28	485	43,9 [23,9, 94,5]	482	10471,8 [5378,6, 20517,3]		
	42					9	33830,8 [25674,3, 52251,8]
IgG к шиповидному белку с использованием стандартизированного ELISA (EU/мл)	0	131	1 [1, 1]	129	1 [1, 1]	10	1 [1, 2,3]
	7	44	1 [1, 1]	42	1 [1, 1,8]	10	1 [1, 2,4]
	14	44	1 [1, 1]	44	102,7 [43,7, 186]	10	137 [46,4, 206,8]
	28	130	1 [1, 1]	127	157,1 [96,2, 316,9]	10	210,7 [149,4, 321,6]
	35					10	821,1 [578,1, 1298,4]
	42					9	997,5 [648,5, 1214]
	56	44	1 [1, 2,6]	43	119 [70,3, 203,4]	10	639,2 [360, 792,2]

Ответ IFN-γ в ELISpot на шиповидный белок SARS-CoV-2 (пятнообразующие клетки на миллион PBMC)	0	73	64 [48, 132]	71	60 [48, 114]	10	108 [90,8, 150,2]
	7	43	67,3 [48, 113]	40	183,2 [79,5, 345]	10	258 [209,8, 432,2]
	14	44	55,3 [48, 99,3]	43	856 [493,3, 1802]	10	1642,3 [1423,7, 2009,5]
	28	69	61,3 [48, 88]	68	554,3 [311,3, 1017,7]	10	528,7 [376,3, 603]
	56	42	66,7 [48, 123,3]	43	424 [221,3, 798,7]	10	614 [437,3, 666]

Краткое описание

Авторы настоящего изобретения провели однократное слепое рандомизированное контролируемое испытание фазы I/II для оценки безопасности, иммуногенности и эффективности вакцины на основе аденовирусного вирусного вектора шимпанзе (ChAdOx1), экспрессирующего шиповидный белок SARS-CoV-2, в дозе 5 x 10^{10} вирусных частиц у здоровых взрослых в возрасте 18-55 лет по сравнению с менингококковой конъюгированной вакциной (MenACWY) в качестве контроля. Нерандомизированная подгруппа добровольцев предусматривала график с двумя дозами. Авторы настоящего изобретения оценили безопасность, клеточный и гуморальный иммунные ответы. Исследование было зарегистрировано под номером ISRCTN 15281137 и ClinicalTrials.gov, NCT04324606.

Результаты

В период от 23-го апреля 2020 г. до 21-го мая 1077 добровольцев рандомизировали 1:1 для получения вакцин на основе ChAdOx1 nCoV-19 или MenACWY. Местные реакции чаще встречались в группе ChAdOx1 nCoV-19, включая боль (67%) и болезненность (83%) в месте инъекции. Часто сообщалось о системных реакциях, включая головную боль (68%), утомляемость (70%), зябкость (56%), лихорадочное состояние (51%), недомогание (61%) и мышечную боль (60%), однако уменьшенных посредством профилактического применения парацетамола и снижающихся после второй дозы. Серьезных нежелательных явлений, связанных с ChAdOx1 nCoV-19, не было. Т-клеточные ответы на шиповидный белок достигали пика в день 14. Ответы IgG против шиповидного белка были выявляемыми ко дню 14 после иммунизации и продолжали расти до дня 28. Ответы нейтрализующих антител живого коронавируса IC50 были выявляемыми у 100% вакцинированных через один месяц после одной дозы (38% в анализе IC100) и у 100% после 2 доз (100% в анализе IC100) и сильно коррелировали с ответами антител ELISA и ответами в анализе на нейтрализацию псевдовируса.

Интерпретация

ChAdOx1 nCoV-19 был переносимым после вакцинации, при этом реактогенность снижалась за счет профилактического применения парацетамола. Шиповидный белок IgG коррелировал с реакцией нейтрализующих антител, а иммуногенность улучшалась после второй дозы.

Дополнительная ценность данного исследования Это исследование являлось первым клиническим исследованием ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222). Вакцина была безопасной и переносимой, с пониженной реактогенностью при профилактическом применении

парацетамола в течение первых 24 часов после вакцинации. В небольшой группе, получавшей вторую дозу, реактогенность снижалась после второй дозы. Четырехкратное усиление гуморального ответа на шиповидный белок SARS-CoV-2 было индуцировано у 95% участников ко дню 28, а клеточный ответ был индуцирован у всех участников ко дню 14. Нейтрализующие антитела были индуцированы у большей части участников после введения второй дозы вакцины. Исследование проводилось в Великобритании.

Значения всех имеющихся доказательств Вакцина против SARS-CoV-2 может использоваться для предупреждения заражения, заболевания и/или смерти всего населения, при этом приоритетным направлением вакцинации являются группы высокого риска, такие как работники больниц и пожилые люди. Иммунные корреляты защиты от SARS-CoV-2 еще не были определены. Иммунизация с помощью ChAdOx1-nCoV-19 приводила к быстрому индуцированию гуморального и клеточного иммунных ответов против SARS-CoV-2 с усилением ответа после второй дозы. Необходимо провести дополнительные клинические исследования этой вакцины, в том числе у пожилых людей. Ссылки на пример 15.

1. World Health Organisation. Draft Landscape of COVID-19 candidate vaccines. 2020. https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines.

2. Fidler S, Stohr W, Pace M, et al. Antiretroviral therapy alone versus antiretroviral therapy with a kick and kill approach, on measures of the HIV reservoir in participants with recent HIV infection (the RIVER trial): a phase 2, randomised trial. Lancet 2020; 395(10227): 888-98.

3. Hanke T. Aiming for protective T-cell responses: a focus on the first generation conserved-region HIVconsv vaccines in preventive and therapeutic clinical trials. Expert Rev Vaccines 2019; 18(10): 1029-41.

4. Mothe B, Manzardo C, Sanchez-Bernabeu A, et al. Therapeutic Vaccination Refocuses T-cell Responses Towards Conserved Regions of HIV-1 in Early Treated Individuals (BCN 01 study). EClinicalMedicine 2019; 11: 65-80.

5. Coughlan L, Sridhar S, Payne R, et al. Heterologous Two-Dose Vaccination with Simian Adenovirus and Poxvirus Vectors Elicits Long-Lasting Cellular Immunity to Influenza Virus A in Healthy Adults. EBioMedicine 2018; 29: 146-54.

6. van Doremalen N, Haddock E, Feldmann F, et al. A single dose of ChAdOx1 MERS provides protective immunity in rhesus macaques. Science Advances 2020; 6(24): eaba8399.

7. Folegatti PM, Bittaye M, Flaxman A, et al. Safety and immunogenicity of a candidate Middle East respiratory syndrome coronavirus viral-vectored vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, uncontrolled, phase 1 trial. Lancet Infect Dis 2020; 20(7): 816-26.

8. van Doremalen N, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques BioRxiv (under review) 2020.

9. Dicks MD, Spencer AJ, Edwards NJ, et al. A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. PLoS One 2012; 7(7): e40385.

10. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. Cell 2020; 181(7): 1489-501.e15.

11. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. bioRxiv 2020: 2020.06.29.174888.

12. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. Science Immunology 2020; 5(48): eabd2071.

Пример 16. Безопасность и иммуногенность вакцины на основе ChAdOx1 nCoV-19, вводимой по схеме в режиме "прайм-буст" у пожилых людей (COV002)

Пример 16 относится к однократному слепому рандомизированному контролируемому испытанию фазы 2/3, его следует рассматривать вместе с предыдущими примерами, в частности с примерами 11 и 15.

Уровень техники

Пожилые люди подвергаются более высокому риску тяжелого заболевания и характеризуются более высокой смертностью, если у них развивается COVID-19, а поэтому они являются приоритетными для иммунизации, в случае разработки эффективной вакцины. Иммуногенность вакцин часто ниже у пожилых людей вследствие "старения" иммунитета. Недавно авторы настоящего изобретения сообщили об иммуногенности новой вирусной вакцины на основе вектора ChAdOx1 nCoV-19 у молодых людей, а теперь описывают безопасность и иммуногенность этой вакцины у пожилых людей.

Две рекомбинантные вакцины на основе вирусных векторов тестировали в клинических испытаниях. Однократная вакцина на основе вектора аденовируса-5 (Ad5) (CanSino Biological/Пекинский институт биотехнологии, Китай) вызывала нейтрализующие антитела и Т-клеточный ответ дозозависимым образом, но была менее иммуногенной у индивидуумов старше 55 лет. Схема введения с примированием-бустингом гетерологичной вакцины на основе вектора Ad5/Ad26 (НИИ им. Гамалеи,

Россия) вызывала нейтрализующие антитела и клеточный ответ у взрослых в возрасте до 60 лет.

Краткое описание

Здоровые взрослые в возрасте 18-55, 56-69 или > 70 лет были рандомизированы для получения либо внутримышечного введения ChAdOx1 nCoV-19 (либо в низкой, либо в стандартной дозе), либо контрольной вакцины MenACWY в рамках фазы II компонента фазы II/III рандомизированного контролируемого испытания. Анализы проводились по группам участников, получавших вакцину. В данном документе авторы настоящего изобретения сообщают предварительные данные о безопасности, реактогенности, клеточных и гуморальных иммунных ответах. Исследование продолжается и было зарегистрировано на Clinicaltrials.gov, NCT 04400838 и ISRCTN, 15281137.

Местные и системные реакции были более распространены в группах ChAdOx1 nCoV-19, чем в контрольных группах, и по своему характеру были аналогичны тем, о которых сообщалось ранее (боль в месте инъекции, лихорадочное состояние, мышечная боль, головная боль), но наблюдались реже у пожилых людей, чем у более молодых взрослых. В течение периода исследования произошло одиннадцать серьезных нежелательных явлений (SAE), все из которых считались не связанными с исследуемыми вакцинами. Общие ответы IgG и нейтрализующих антител после первой дозы были ниже у тех, кто получал вакцину в низкой дозе, и у пожилых людей, однако ответы были аналогичными во всех группах после введения бустерной дозы. Реакция нейтрализующих антител была выше в группах с бустингом по сравнению с группами без бустинга. Т-клеточные ответы достигали пика в день 14 и были одинаковыми во всех возрастных группах.

ChAdOx1 CoV-19 лучше переносилась пожилыми людьми, чем молодыми, и имела одинаковую иммуногенность во всех возрастных группах после стимулирующей дозы.

Это исследование являлось четвертым клиническим испытанием вакцины против SARS-CoV-2, протестированной в популяции пожилых взрослых людей. Вакцина была безопасной и хорошо переносимой, с пониженной реактогенностью у пожилых людей. Ответы антител против шиповидного белка SARS-Cov-2 были индуцированы во всех возрастных группах и усиливались и сохранялись через 28 дней после бустерной вакцинации, в том числе в группе людей старше 70 лет. Клеточные иммунные ответы также индуцировались во всех возрастных и дозовых группах, достигая пика в день 14 после вакцинации.

Иммунизация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 приводит к выработке нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у 100% участников, включая пожилых людей, с более высокими уровнями в группах бустинга по сравнению с группами без бустинга.

Введение

Иммуностарение относится к постепенному ухудшению и снижению функции иммунной системы, вызванному старением. Считается, что возрастные различия в функциональности и доступности популяций Т- и В-клеток играют ключевую роль в снижении иммунного ответа. Иммуностарение связано с повышенной восприимчивостью к инфекциям и сниженными ответами на вакцину у пожилых людей и может способствовать неблагоприятным исходам в этой возрастной группе. Было стремление разработать вакцины и адъювантные составы, специально предназначенные для пожилых людей, чтобы преодолеть этот сниженный иммунный ответ после вакцинации. Поэтому оценка иммунных реакций у пожилых людей имела важное значение для разработки вакцин против COVID-19, которые могли бы защитить эту уязвимую популяцию.

Предварительные результаты фазы 1/2 клинического испытания ChAdOx1 nCov-19 у взрослых в возрасте 18-55 лет показывают, что вакцина хорошо переносится и опосредует сильные нейтрализующие антитела и клеточный иммунный ответ против шиповидного гликопротеина (8). В данном документе авторы настоящего изобретения представляют результаты многоцентрового исследования фазы 2/3 с использованием ChAdOx1 nCOV-19 в 2 разных дозах у взрослых, включая лиц старше 70 лет, и по схеме с 1 или 2 дозами.

Способы и процедуры

В предыдущем исследовании фазы I/II использовалась однократная стандартная доза 5×10^{10} в. ч. ChAdOx nCov-19, основываясь на предыдущем опыте с конструкцией MERS ChAdOx1 (9). В данном исследовании авторы настоящего изобретения оценивали более низкую дозу $2,2 \times 10^{10}$ в. ч. со стандартной дозой $3,5\text{-}6,5 \times 10^{10}$ в. ч. у взрослых с разных возрастных когорт. В связи с необходимостью быстрого получения большого количества доз вакцины, изготовленной согласно GMP, чтобы обеспечить своевременную включение в исследование в клиническом испытании фазы II/III, в данном исследовании использовались две разные партии вакцины: изготовленные и расфасованные во флаконы Advent .r.I. (Pomezia, Италия) и изготовленные COBRA Biologics Ltd (Киль, Великобритания) и расфасованные во флаконы Symbiosis. Обе были изготовлены в соответствии с надлежащей производственной практикой, как описано в досье исследуемого лекарственного препарата, и одобрены регулирующим органом Великобритании, MHRA.

Аналитическая оценка сопоставимости серий показывает, что партии являются сопоставимыми.

ChAdOx1 nCoV-19 вводили в виде схемы с однократной или двукратной дозами (с интервалом 4-6 недель) либо в низкой дозе (LD) $2{\cdot}2 \times 10^{10}$ в. ч., либо в стандартной дозе (SD) от $3{\cdot}5$ до $6{\cdot}5 \times 10^{10}$ вирусных частиц, измеренных с помощью УФ-спектроскопии (Symbiosis) или qPCR (Advent). Ее вводили в виде однократной внутримышечной инъекции в дельтовидную мышцу в соответствии с SOP конкретного исследования. Вакцина MenACWY была предоставлена Министерством здравоохранения и социального обеспечения Великобритании и вводилась в соответствии с краткими характеристиками продукта при стандартной дозе 0,5 мл: https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/26514#gref.

Участники из каждой группы были проинструктированы заполнять дневник пациента для записи и оценки тяжести нежелательных явлений. Все группы должны были сообщать как об ожидаемых, так и о неожиданных AE в течение 7 дней, а подгруппы также сообщать о неожиданных AE в течение полных 28 дней. Определенные протоколом ожидаемые местные нежелательные явления включали боль в месте инъекции, болезненность, повышение температуры, покраснение, припухлость, уплотнение и зуд, а ожидаемые системные нежелательные явления включали недомогание, мышечную боль, боль в суставах, утомляемость, тошноту, головную боль, зябкость, лихорадочное состояние (т. е. сообщенное пациентом ощущение наличия лихорадки) и объективную лихорадку, определяемую как температура в полости рта 38°C или выше.

Тяжесть нежелательных явлений классифицировали по следующим критериям: легкая (временный или легкий дискомфорт в течение < 48 ч., отсутствие нарушений деятельности и отсутствие необходимости в медицинском вмешательстве или терапии), умеренная (ограничение деятельности от легкой до умеренной степени и отсутствие или потребность в минимальном медицинском вмешательстве), тяжелая (заметное ограничение деятельности и требуется медицинское вмешательство или терапия) и потенциально опасное для жизни (требуется оценка в отделении неотложной помощи или госпитализация). Неожиданные нежелательные явления анализировались в отношении причинно-следственной связи двумя клиницистами, которым были закрыты сведения о распределении по группам, и сообщалось о явлениях, которые считались возможно, вероятно или определенно связанными с исследуемыми вакцинами. Лабораторные нежелательные явления оценивались с использованием таблиц токсичности для конкретных участков, которые были адаптированы из шкалы оценки токсичности

Управления по санитарному надзору за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США.

Все участники в возрастных группах 56-69 и 70+ лет, а также участники в группах SD/SD 18-55 лет, прошли клиническую оценку и оценку иммуногенности через 0, 7, 14 и 28 дней после вакцинаций с примированием и бустингом. Участники в группе LD/LD 18-55 лет прошли клиническую оценку и оценку иммуногенности через 0 и 28 дней после вакцинаций с примированием и бустингом.

Клеточные ответы оценивали с применением метода иммуноферментных пятен с использованием интерферона-γ (ELISpo) *ex-vivo* для подсчета антигенспецифических Т-клеток. Гуморальные ответы на исходном уровне и после вакцинации оценивали с использованием стандартизированного ELISA общего IgG против тримерного шиповидного белка SARS CoV-2, мультиплексного иммунологического анализа (мультиплексного иммуноанализа Meso Scale Discovery [MIA] против шипа и рецептор-связывающего домена), анализов нейтрализации живого SARS-CoV-2 (анализа микронейтрализации Службы общественного здравоохранения Англии [PHE] [MNA IC_{80}]) и анализа нейтрализации псевдовирусов (Monogram PseudoNA IC_{50}). Уровень нейтрализующего антитела к вектору ChAdOx1 измеряли с использованием анализа с секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазой-репортером (SEAP), с помощью которого измеряли обратную величину разбавления сыворотки крови, необходимую для снижения экспрессии *in vitro* SEAP, экспрессируемого вектором, на 50%, через 24 часа после трансдукции.

Статистический анализ

Конечные точки безопасности описаны как частоты (%) с 95% биномиальными точными CI. Медианы и IQR представлены для иммунологических конечных точек. Участники были проанализированы в соответствии с группой, в которую они были рандомизированы. Чтобы оценить взаимосвязь между ответами на различные анализы, линейная регрессия использовалась для анализа логарифмически преобразованных значений после исходного уровня. Статистический анализ выполнялся с использованием SAS версии 9.4 и R версии 3.6.1 или более поздней.

Результаты

Фигуры 26-31 относятся к примеру 16 и показывают данные, относящиеся к примеру 16.

К сентябрю 2020 года к испытанию COV002 было привлечено 9869 участников. 5079 участников были вакцинированы с помощью ChAdOx1 nCov-19, а 4790 получили

MenACWY. Из тех, о которых сообщается в данном документе, 102 были зарегистрированы в группе 18-55 LD (низкая доза)/LD, 60 в группе 18-55 SD (стандартная доза)/SD, 80 в группе 56-69 LD/LD, 80 в группе 56-69 SD/SD, 120 в группе > 70 LD/LD и 120 в группе > 70 SD/SD. Все рандомизированные участники были вакцинированы. Исходные характеристики участников в каждой группе казались аналогичными между распределениями рандомизации.

Боль и чувствительность в месте инъекции были наиболее распространенными ожидаемыми местными побочными реакциями и чаще всего возникали в первые 48 часов после вакцинации. По меньшей мере один локальный симптом от легкого до умеренного был зарегистрирован после примирующей вакцинации с помощью ChAdOx1 nCOV-19 у 88,0%, 73,3% и 60,0% участников в группе 18-55 SD/SD, 56-69 SD/группе SD и группе > 70 SD/SD соответственно. Аналогичные пропорции местных симптомов были зарегистрированы после бустерной вакцинации с помощью ChAdOx1 nCOV-19, где 75,5%, 72,4% и 55,1% участников в группе 18-55 SD/SD, группе 56-69 SD/SD и группе > 70 SD/SD соответственно сообщали о по меньшей мере одном локальном симптоме со степенью тяжести от легкой до умеренной. Аналогичный паттерн наблюдался в возрастных группах для возрастных групп LD/LD, но с меньшим количеством нежелательных реакций. Местные симптомы со степенью тяжести от легкой до тяжелой наблюдались у 56,7%, 40,0% и 28,2% индивидуумов в возрасте 18-55, 56-69 и > 70 лет после примирующей вакцинации с помощью MenACWY и у 86,4%, 36,8 % и 20,0% после бустерных вакцинаций с помощью MenACWY соответственно.

Усталость, головная боль, лихорадка и миалгия были наиболее частыми системными побочными реакциями. Как минимум один системный симптом со степенью тяжести от умеренной до тяжелой был зарегистрирован после примирующей вакцинации с помощью ChAdOx1 nCOV-19 у 86,0%, 76,7% и 64,0% участников в группе 18-55 SD/SD, группе 56-69 SD/SD и группе > 70 SD/SD соответственно. Тяжесть симптомов уменьшалась после бустерной вакцинации с помощью ChAdOx1 nCOV-19, и только один участник сообщил о тяжелой реакции. 65,3%, 72,4% и 42,9% участников в группе 18-55 SD/SD, группе 56-69 SD/SD и группе > 70 SD/SD соответственно сообщали о по меньшей мере одной системной нежелательной реакции со степенью тяжести от легкой до тяжелой после бустинга с помощью ChAdOx1-nCOV19. Встречаемость объективно измеренной лихорадки была низкой и составляла 26,0% в группе 18-55 SD/SD, и не наблюдалась ни в одной из групп 56-69 SD/SD, и > 70 SD/SD после примирующей вакцинации с помощью ChAdOx1 nCOV-19. Ни у одного из участников любого возраста не наблюдалось

объективной лихорадки после бустерной вакцинации. Аналогичная картина наблюдалась в возрастных группах для возрастных групп LD/LD, но с меньшим количеством нежелательных симптомов. Системные симптомы со степенью тяжести от легкой до тяжелой наблюдались у 61,7%, 47,5% и 30,8% индивидуумов в возрасте 18-55, 56-69 и > 70 лет после примирующей вакцинации с помощью MenACWY и у 67,8%, 31,6 % и 25,0% после бустерных вакцинаций с помощью MenACWY соответственно.
Неожиданные нежелательные явления в течение 28 дней после вакцинации, которые, как считалось, по меньшей мере возможно связаны с ChAdOx1 nCoV-19, были преимущественно от легкой до умеренной степени тяжести и разрешались в течение периода наблюдения. Лабораторные нежелательные явления, которые считались, по меньшей мере возможно, связанными с исследуемым вмешательством, были самоограничивающимися и преимущественно легкой или умеренной степени тяжести. На сегодняшний день было зарегистрировано 11 серьезных нежелательных явлений, ни одно из которых не считалось связанным с исследуемой вакциной.
С использованием мультиплексного иммуноанализа (MIA), который выявил общий IgG против рецептор-связывающего домена и тримерного шиповидного белка, авторы настоящего изобретения наблюдали, что у участников, которые получали стандартное примирование с помощью ChAdOx1 nCOV-19, обычно развивались более высокие титры антител к дню 28 после вакцинации, чем у тех, кто получал более низкую дозу (медиана 18-55 LD 6349 единиц поглощения [AU], IQR 4438-10640 по сравнению с медианой 18-55 SD 9807 AU, IQR 5847-17220; медиана 56-69 LD 5032 AU, IQR 2753-9578 по сравнению с медианой 56-69 SD 6693 AU, IQR 2814-1370; медиана > 70 LD 4168 AU, IQR 1542-8846, медиана > 70 SD 3454 AU, IQR 1974-11702. Через 28 дней после бустерной вакцинации аналогичные титры антител наблюдались во всех группах независимо от возраста или дозы вакцины (медиана 18-55 LD/LD 15114 AU, IQR 9996-22084 по сравнению с медианой 18-55 SD/SD 27294 AU, IQR 16256-37055; медиана 56-69 LD/LD 19156 AU, IQR 8918-26348 по сравнению с медианой 56-69 SD/SD 16170 AU, IQR 10233-40353; медиана > 70 LD/LD 16972 AU, IQR 5735-29176 по сравнению с медианой > 70 SD/SD 17561, IQR 10717-338177 (см. фигуру 30). Антитела к шиповидному белку не наблюдались.
Титры анализа нейтрализации псевдовируса (монограмма PseudoNA IC_{50}) показаны для групп с низкой дозой и стандартной дозой для всех возрастов (фиг. 29). Ответы в группах с низкой дозой достигали пика в дни 42, через 14 дней после бустерной вакцинации, следуя той же схеме ответа, что и при ELISA. Не было существенной разницы в титрах нейтрализации в возрастных группах, получавших одинаковую дозу (низкая доза: медиана

18-55 лет 172, IQR 111-335 по сравнению с медианой 56-69 лет 113, IQR 68-192 по сравнению с медианой 70+ лет 164, IQR 81-248, p=0,2440). Ответы в группах стандартной дозы следовали той же тенденции, с очень похожими титрами, достигающими пика в день 42 (медиана 18-55 лет 170, IQR 72-283, медиана 56-69 лет 146, IQR 86-443 по сравнению с медианой 70+ лет SD/SD 128, IQR 70-296, p=0,6555).

Реципиенты стандартной дозы характеризовались аналогичными титрами в день 42, как те, кто получал только низкие дозы вакцин (18-55 лет, p=0,5115, 56-69 лет, p=0,4516, 70+ лет, p=0,7664). Фигура 29, см. также таблицу 29S ниже.

Таблица 29S. Сводная статистика ответов в ELISpot на интерферон-γ

Группа исследования	***Визит***	***N***	***Одна доза ChAdOx1***	***N***	***Две дозы ChAdOx1***
56-69 лет LD/LD	0	29	57 [48 ,103]	30	67 [48 ,109]
	14	30	1001 [662 ,1965]	30	1341 [536 ,2029]
	28	28	511 [264 ,790]	29	488 [255 ,1043]
	42			29	501 [253 ,905]
	56	30	207 [111 ,422]	29	333 [179 ,505]
70+ лет LD/LD	0	49	48 [48 ,68]	41	48 [48 ,71]
	14	50	1027 [488 ,2247]	45	1009 [401 ,1873]
	28	48	405 [234 ,716]	44	395 [207 ,709]
	42			44	291 [172 ,533]
	56	35	166 [118 ,379]	44	266 [120 ,463]
18-55 лет SD/SD	0			25	58 [48 ,108]
	14			24	1187 [841 ,2428]
	28			10	292 [178 ,803]
	42			23	413 [245 ,675]
56-69 лет SD/SD	0	25	48 [48 ,65]	30	63 [48 ,84]
	14	21	677 [411 ,1503]	29	797 [383 ,1817]
	28	29	335 [162 ,523]	30	591 [238 ,922]
	42			28	798 [462 ,1186]
70+ лет SD/SD	0	48	63 [48 ,95]	47	73 [48 ,100]
	14	49	971 [447 ,1527]	48	977 [458 ,1914]
	28	48	566 [359 ,979]	49	300 [157 ,492]
	42			47	307 [161 ,516]

В анализе микронейтрализации живого вируса (MNA80), проведенном в Службе общественного здравоохранения Англии, средние титры достигали пика в большинстве групп с бустерной вакцинацией ко дню 42. Не было значительных различий в титрах нейтрализации между возрастными группами в день 42 (низкая доза p=0,946, стандартная доза p=0,300), и внутри каждой возрастной группы не было существенной разницы в титрах нейтрализации между реципиентами вакцины с низкой и стандартной дозами в тот же момент времени (18-55 лет: p=0,3160, 56-69 лет: p=0,1468, 70+ лет: p=0,745). Фигура 31.

Ответы ELISpot IFN-g против шиповидного белка SARS-CoV-2 достигали пика через 14 дней после первой дозы и незначительно увеличивались после второй дозы (p=0,4622 из парного t-критерия дня 28 по сравнению с днем 42). Данные ELISpot были недоступны для когорты 18-55 LD/LD. У тех, кто получал две стандартные дозы, наблюдалась значительная разница между возрастными группами: у участников в возрасте 56-69 лет наблюдались более высокие ответы в день 42, чем у других возрастных групп, получавших ту же вакцину (медиана IQR 413 [245, 675] у лиц 18-55 лет по сравнению с 798 [462, 1186] у лиц 56-69 лет (p=0,0154) и 307 [161, 516] у лиц 70+ лет и старше (p=5943).

Титры нейтрализующих антител к ChAdOx1 в разных возрастных и дозовых группах увеличивались при примирующей вакцинации ChAdOx1 во всех группах до сопоставимых уровней, но не повышались дополнительно после введения второй дозы вакцины в день 28. Это было в отличие от антител к шиповидному белку SARS-CoV-2, бустинг которых происходил через 28 дней после второй дозы вакцины. Титры нейтрализующих антител к ChAdOx1 во время действия бустерной вакцины отрицательно коррелировали со стандартизированными значениями ELISA через 28 дней после бустерной вакцинации (P=0,0374), однако не было статистически значимой корреляции между нейтрализующими титрами антител к ChAdOx1 до бустинга и ответами ELISpot через 14 дней после бустерной дозы (p=0,221).

Обсуждение

Устойчивый иммунный ответ, полученный у популяции пожилых взрослых людей, участвующих в исследовании авторов настоящего изобретения, был неожиданным, учитывая, что ряд исследований продемонстрировал, что снижение иммунной функции с возрастом приводит к более слабым иммунным ответам на вакцины. Это относилось к вакцинам, таким как вакцина от гриппа, у которых уже существовала иммунная память, и вакцинам, вызывающим первичные иммунные ответы, например на гепатит B. Другие

платформы аденовирусных векторов против SARS-CoV-2 продемонстрировали сниженную иммуногенность в более старшей возрастной группе (хотя это схема с одной дозой и поэтому не сравнима напрямую со схемой в режиме "прайм-буст") или еще не тестировались на популяции пожилых людей.

Примечательно, что ответы антител к шиповидному отростку в исследовании авторов настоящего изобретения усиливались после бустерной вакцинации с интервалом в 1 месяц, однако ответы нейтрализующих антител к векторам не усиливались. Также не было различий в иммунитете против антител к векторам по возрасту.

В отсутствие четкого серологического коррелята защиты от SARS-CoV-2 клинические исследования были сосредоточены на нейтрализующих антителах, которые предусматривают защиту от заражения в животных моделях. Анализы нейтрализации живых вирусов являются трудоемкими и могут выполняться только в специализированных лабораториях в условиях биологической безопасности категории 3. В данном документе авторы настоящего изобретения показывают, что титры рецептор-связывающего домена и шиповидного белка MIA коррелируют с титрами нейтрализующих антител в разных возрастных группах. Это говорит о том, что если бы было показано, что нейтрализующие антитела обладают защитным действием у людей, MIA можно было бы использовать для стандартизированной оценки защиты, достигаемой предполагаемыми вакцинами-кандидатами в клинических испытаниях.

Пример 17. Бустерная доза вирусного вектора ChAdOx1 nCoV-19 индуцировала многофункциональные ответы антител и хорошо переносилась

Пример 17 относится к рандомизированному контролируемому испытанию фазы I/II, его следует рассматривать вместе с предыдущими примерами, в частности с примерами 11, 15 и 16. На фигурах 32-38 показаны данные, относящиеся к примеру 17.

Краткое описание

Исследования на животных продемонстрировали, что уровень нейтрализующих антител (NAb) к шиповидному белку может коррелировать с защитой, но другие функции антител могут быть важными для предупреждения инфекции и контроля ранней клеточной инвазии вируса. Ранее авторы настоящего изобретения сообщали о ранней иммуногенности и безопасности вакцины против коронавируса на основе вирусного вектора ChAdOx1 nCoV-19. В данном документе авторы настоящего изобретения демонстрируют в рандомизированном контролируемом исследовании фазы I/II, что две дозы ChAdOx1 nCoV-19 вызывают более сильный общий и нейтрализующий ответы антител, чем одна доза, и что аналогичные ответы наблюдаются при бустинге либо через

1, либо через 2 месяца после первой дозы у здоровых взрослых в возрасте до 55 лет. Более высокие дозы вакцины, используемой для бустинга, вызывали более сильный ответ антител, но аналогичный Т-клеточный ответ по сравнению с дозосберегающей половинной бустерной дозой. Кроме того, авторы настоящего изобретения продемонстрировали Fc-опосредованные функциональные ответы антител (антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов/моноцитов, активация комплемента и активация NK-клеток), которые существенно усиливались бустерной дозой вакцины. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что вторая доза вакцины переносилась лучше, чем первая доза, после чего реакции были аналогичны тем, о которых сообщалось ранее. Эти данные подтверждают режим вакцинации с двумя дозами, который в настоящее время проходит фазу III клинических испытаний.

Введение

Хотя доклинические данные свидетельствуют о том, что иммунные реакции, вызванные инфекцией SARS-CoV-2, важны для защиты от повторного инфицирования в животных моделях, относительный вклад различных иммунных функций не оценивался.

Нейтрализация была наиболее часто измеряемой функцией антител, поскольку нейтрализующие антитела обладают способностью связываться с поверхностью вириона SARS-CoV-2 и предупреждать проникновение в клетку-хозяина, потенциально способствуя передаче стерилизующего иммунитета. Однако другие функции антител могут играть роль в выздоровлении или защите от явного заболевания.

В данном документе авторы настоящего изобретения описывают дальнейшую оценку иммунных ответов после вакцинации индивидуумов, набранных для участия в фазе I/II клинических испытаний вакцины ChAdOx1 nCoV-19. Сравнивали различные графики бустинга и дозосбережения бустерной дозы, включая количество и качество индуцированного иммунного ответа. Индивидуумы подвергались схеме с однократной или двукратной дозой ChAdOx-1 nCoV-19 с интервалом в 28 или 56 дней. Описан клеточный иммунитет и специфические к шиповидному антигену антитела были количественно определены и функционально охарактеризованы с использованием широкого спектра анализов.

Результаты

MIA и титры нейтрализующих антител

Антитела IgG к шиповидному отростку SARS-CoV-2 и домен связывания рецептора (RBD) измеряли в мультиплексном серологическом иммуноанализе. В обоих случаях титры антител повышались после первой вакцинации с дальнейшим увеличением после

второй. Через 14 дней после второй дозы титры IgG существенно не отличались между теми, кто получал стимулирующую дозу через 28 дней (GMT 35990, 95% CI 24408, 53068) или через 56 дней (SD/SD D56: GMT 44485, 95% CI 31714, 62400, p=0,426 и SD/LD D56: GMT 25667, 95% CI 18814, 35015, p=0,250). Однако у тех, кто получал половинную бустерную дозу титры были ниже через 14 дней после бустинга, чем у тех, кто получал стандартную дозу (p=0,020). Аналогичные результаты были получены для антител к шиповидному отростку и IgG к RBD с использованием MIA (фигура 32, таблица 17S2 ниже). Еще 30 участников были сероположительными на момент получения одной вакцинации.

Таблица S2. Антитела к шиповидному отростку и IgG к RBD в мультиплексном иммуноанализе

Визит	**N**	**MenACWY**		**N**	**SD/SD, D28**		**N**	**SD/SD, D56**		**N**	**SD/LD D56**	
		GMC (95% CI)	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**
IgG к шиповидному отростку												
0	10	58 (27, 124)	72 [24, 131]	10	141 (24, 809)	71 [46, 249]	20	89 (39, 204)	84 [22, 178]	32	52 (36, 76)	45 [31, 87]
14				10	7040 (2114, 23451)	6358 [3588, 12840]						
28	10	49 (24, 101)	74 [18, 88]	10	13843 (5809, 32988)	11453 [5775, 20988]	19	8611 (4647, 15956)	6185 [3985, 18973]	32	7410 (5280, 10400)	6866 [4203, 14222]
35				10	51762 (30279, 88489)	44205 [33772, 66548]						
42				9	**35990 (24408, 53068)**	**34081 [26583, 45472]**						
56	10	56 (26, 122)	93 [20, 110]	10	**34175 (20915, 55842)**	**33307 [20281, 43775]**	20	7722 (4759, 12532)	8790 [3565, 15437]	32	5191 (3625, 7435)	6038 [3304, 8119]

Визит	**N**	**MenACWY**		**N**	**SD/SD, D28**		**N**	**SD/SD, D56**		**N**	**SD/LD D56**	
		GMC (95% CI)	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**
70	10	53 (29, 96)	55 [27, 94]				19	**44485 (31714, 62400)**	**48979 [28038, 83258]**	29	**25667 (18814, 35015)**	**21660 [14953, 45349]**
								P=0,4263 (t-критерий по сравнению с группой SD/SD D28 в день 42)			P=0,2504 (t-критерий по сравнению с группой SD/SD D28 в день 42) P=0,0201 (t-критерий по сравнению с группой SD/SD D56 в день 70)	
84	10	48 (23, 101)	67 [20, 80]				19	**40176 (27816, 58027)**	**41927 [21197, 85118]**	31	**15761 (7688, 32310)**	**17965 [11238, 47038]**
IgG к RBD												
0	10	16 (9, 28)	10 [9, 33]	10	47 (9, 255)	27 [16, 42]	20	18 (9, 36)	12 [8, 24]	32	15 (11, 20)	13 [9, 21]
14				10	1584 (331, 7573)	1274 [396, 3612]						
28	10	17 (10, 29)	12 [11, 33]	10	5356 (1959, 14641)	4494 [2245, 9729]	19	2729 (1330, 5599)	2252 [925, 8231]	32	1823 (1154, 2879)	2521 [865, 4099]

Визит	**N**	**MenACWY**		**N**	**SD/SD, D28**		**N**	**SD/SD, D56**		**N**	**SD/LD D56**	
		GMC (95% CI)	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**		**GMC (95% CI)**	**Медиана (IQR)**
35				10	29478 (18735, 46381)	25572 [20912, 31747]						
42				9	21992 (15400, 31405)	23576 [15516, 24870]						
56	10	15 (8, 28)	10 [6, 27]	10	19764 (12476, 31311)	17670 [12041, 22502]	20	3125 (1842, 5302)	3352 [1548, 5583]	32	1459 (931, 2287)	1536 [708, 2969]
70	10	18 (10, 32)	14 [10, 30]				19	21045 (14800, 29925)	24181 [11779, 34420]	29	10565 (7343, 15200)	9030 [6467, 19581]
84	10	15 (7, 29)	14 [6, 35]				19	20627 (14327, 29696)	20373 [13502, 36658]	31	7423 (3663, 15044)	9260 [4187, 21572]

После вакцинации титры антител IgG к шиповидному отростку увеличивались в 10 раз. На фигуре 32 показана динамика ответов IgG в зависимости от времени для трех групп ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "прайм-буст"; SD/SD: две стандартные дозы, вводимые с интервалом 28 или 56 дней, SD/LD: стандартная примирующая доза с последующей низкой бустерной дозой с интервалом 56 дней и для двух доз вакцины сравнения MenACWY. Пунктирные линии показывают моменты времени, когда происходил бустинг. На графике показаны медиана и межквартильный диапазон. AU/мл = произвольные единицы измерения/мл. Левая панель – ответы на антитела к RBD (рецептор-связывающий домен). Правая панель – ответы на антитела к шиповидному отростку (шиповидный белок SARS-COV-2). Пунктирная линия указывает на ответы у 30 участников, которые получали только одну дозу ChAdOx1 nCoV-19 и были сероположительными на исходном уровне (порог сероположительности определялся как > 1000 AU/мл антител IgG к шиповидному отростку).

Нейтрализующие антитела анализировали с помощью анализа микронейтрализации, сообщающего об обратной величине разбавлении сыворотки крови, необходимой для снижения инфицирования отдельных клеток живым SARS-CoV-2 на 80% (MNA_{80}). NAb индуцировались после примирующих вакцинаций и значительно увеличивались после бустерной дозы во всех 3 группах ChAdOx1 nCoV-19. Медиана титров NAb через 14 дней после бустинга составляла 136 (IQR 115, 241) для SD/SD D28, 169 (IQR 134, 372) для SD/LD D56 и 315 (IQR 224, 531) для SD/SD D56.

На фигуре 33 показана зависимость титра микронейтрализации от времени при IC_{80} для трех групп ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "прайм-буст"; SD/SD: две стандартные дозы, вводимые с интервалом 28 или 56 дней, SD/LD: стандартная примирующая доза с последующей низкой бустерной дозой с интервалом 56 дней и для двух доз вакцины сравнения MenACWY. Планки погрешностей показывают медианы и межквартильные диапазоны.

В группе MenACWY активность NAb не наблюдалась. Нейтрализующие антитела также определяли в анализе нейтрализации псевдовирусов с указанием IC_{50}. Средние титры NAb в анализе псевдовируса через 14 дней после бустинга составляли 451 (IQR 212, 627) для SD/SD D28, 253 (IQR 100, 391) для SD/LD D56 и 424 (IQR 229, 915) для SD/SD D56 (см. фигуру 38 и таблицу 17 S3 ниже).

Таблица 17 S3. Уровень нейтрализующего антитела, измеренный в анализе псевдовируса (монограмма IC50)

Визит	**N**	**SD/SD, D28 Медиана (IQR)**	**N**	**SD/SD, D56 Медиана (IQR)**	**N**	**SD/LD D56 Медиана (IQR)**
0	10	40 [40, 40]	20	40 [40, 40]	32	40 [40, 40]
28	10	163 [61, 346]				
35	7	334 [179, 529]				
42	9	451 [212, 627]				
56			20	68 [40, 151]	32	40 [40, 76]
70			19	424 [229, 915]	29	253 [100, 391]

Класс и подкласс антител

Были определены классы и подклассы антител в ответе на антитела к шиповидному отростку. Основываясь на предыдущем изотипическом анализе после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 (D. Barouch et al. 2018) авторы настоящего изобретения сосредоточились на измерении титров IgA и IgM антител к шиповидному SARS-CoV-2. Вакцинация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 повышала титры IgM и IgA с пиковым ответом, измеренным через 28 дней после примирования для IgM. Не было никакой разницы в ответе, измеренном через 14 дней после бустерной дозы SD или LD, а ответ после бустерной дозы был такой же величины, как SD/SD с интервалом 28 дней. На фигуре 34 показаны ответы с выработкой изотипа иммуноглобулина, специфического для шиповидного отростка SARS-CoV-2, индуцированные схемами введения ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "прайм-буст". Добровольцы получали стандартную дозу (SD) ChAdOx1 nCoV-19 в день 0 с последующей второй вакцинацией SD в день 56 (левая панель), или низкую дозу (LD) ChAdOx1 nCoV-19 в день 56 (средняя панель), или SD в день 28 (правая панель). Ответы IgA и IgM, специфичные для тримера шиповидного SARS-CoV-2 количественно оценивали с помощью ELISA и выражены в единицах ELISA. Сплошные линии соединяют образцы от одного и того же участника. Жирные сплошные линии показывают медиану с IQR.

Образцы сыворотки крови, которые были IgG-положительными через 28 дней после вакцинации, анализировали на наличие подклассов антител IgG к шиповидному отростку. Ответы IgG1 и IgG3 были легко выявляемыми в день 28 и были на том же уровне в день 56 при схемах с 56-дневным интервалом. После бустерной вакцинации медианный ответ на IgG1 не увеличивался у тех, кто подвергался стандартной схеме дозирования с 28-дневным интервалом, хотя это может быть ограничено небольшим размером группы. Ответы IgG1 увеличивались через 14 дней после бустерной дозы SD или LD в схемах с 56-

дневным интервалом, без измеренного различия ввиду дозы. Ответы IgG3 были усилены после бустерной вакцинации по всем трем схемам, независимо от интервала или дозы. Ответ был преимущественно на IgG1 и IgG3 с низкими уровнями IgG2 и IgG4.

На фигуре 35 показаны ответы подкласса IgG, специфического для шиповидного отростка SARS-CoV-2, индуцированного схемами в режиме "прайм-буст" ChAdOx1 nCoV-19. Добровольцы получали стандартную дозу (SD) ChAdOx1 nCoV-19 в день 0 с последующей второй вакцинацией SD в день 56 (левая панель), или низкую дозу (LD) ChAdOx1 nCoV-19 в день 56 (средняя панель), или SD в день 28 (правая панель). Добровольцев с измеримым IgG, специфическим к шиповидному отростку SARS-CoV-2, в день 28 анализировали на наличие подклассов IgG. Ответы антител, специфических к шиповидному отростку SARS-CoV-2, были количественно оценены с помощью ELISA. Ответы IgG1 и IgG3 выражали в единицах ELISA, а ответы IgG2 и IgG4 выражали в виде OD при 405 нм. Сплошные линии соединяют образцы от одного и того же участника. Жирные сплошные линии показывают медиану с IQR.

Этот преобладающий ответ на IgG Th1-типа согласовывается с другими исследованиями, изучающими примирующие вакцины на основе аденовирусного вектора у людей. Эти анализы подчеркивают сходство в ответе антител, индуцированном после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19, независимо от интервала или бустерной дозы.

Функциональность антител

Функцию антител исследовали дополнительно для определения способности антител, индуцированных вакцинацией, поддерживать антителозависимый фагоцитоз моноцитов (ADMP) и фагоцитоз нейтрофилов (ADNP). Обе функции индуцировались первой вакцинацией и значительно усиливались второй, с тенденцией к большему усилению, когда интервал между дозами составлял 56, а не 28 дней, и когда стимулирующая доза была SD, а не LD (см. фигуру 36A и 36B и таблицу 17 S4 ниже).

Таблица 17 S4. Антителозависимый фагоцитоз моноцитов (ADMP), фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), отложение комплемента (ADCD) и активация естественных клеток-киллеров (ADNKA) у участников исследования, плазма крови выздоравливающих людей и плазма крови до пандемии

Группа	**Момент времени**	**ADNP**		**ADMP**		**ADCD (log10 единиц)**		**ADNKA**	
		N	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**
MenACWY	**0**	2	0,02 [0,01, 0,02]	2	0,17 [0,14, 0,2]	2	2,27 [2,14, 2,40]	2	0,58 [0,53, 0,63]
MenACWY	**56**	3	0,02 [0,02, 0,03]	3	0,11 [0,1, 0,19]	3	1,99 [1,98, 2,31]	2	0,87 [0,80, 0,93]
MenACWY	**70**	3	0,02 [0,01, 0,02]	3	0,19 [0,17, 0,24]	3	2,68 [2,61, 2,81]	2	1,63 [1,45, 1,82]
SD/LD D56	**0**	20	0,01 [0,01, 0,02]	24	0,13 [0,1, 0,18]	11	2,53 [2,41, 2,73]	22	0,4 [0,22, 0,94]
SD/LD D56	**56**	24	0,07 [0,04, 0,18]	24	0,29 [0,21, 0,38]	12	2,84 [2,53, 2,91]	22	2,03 [1,43, 3,13]
SD/LD D56	**70**	23	0,68 [0,32, 0,77]	22	0,73 [0,49, 0,96]	12	3,2 [3,01, 3,56]	22	5,29 [3,61, 6,13]
SD/SD, D28	**0**							4	1,17 [0,21, 2,95]
SD/SD, D28	**14**	8	0,09 [0,02, 0,14]	9	0,23 [0,19, 0,41]			8	2,35 [2,15, 4,73]
SD/SD, D28	**28**	9	0,11 [0,03, 0,4]	9	0,3 [0,13, 0,61]			9	3 [2,06, 5,66]
SD/SD, D28	**35**	10	0,67 [0,55, 0,73]	10	0,89 [0,64, 1,01]			10	5,69 [5,12, 7,42]
SD/SD, D28	**42**	7	0,76 [0,71, 0,88]	9	1,02 [0,82, 1,05]			8	3,96 [3,44, 5,36]
SD/SD, D28	**56**	9	0,67 [0,41, 0,8]	10	0,73 [0,54, 0,97]			9	3,91 [3,05, 5,25]
SD/SD, D56	**0**	16	0,02 [0,01, 0,03]	18	0,18 [0,12, 0,31]	10	2,6 [2,37, 2,76]	19	0,96 [0,12, 1,32]
SD/SD, D56	**56**	18	0,08 [0,04, 0,26]	19	0,32 [0,25, 0,38]	10	3,01 [2,74, 3,57]	19	2,27 [1,31, 3,21]

Группа	**Момент времени**		**ADNP**		**ADMP**		**ADCD (log10 единиц)**		**ADNKA**
		N	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**	**N**	**Медиана (IQR)**
SD/SD, D56	**70**	18	1,02 [0,79, 1,17]	19	1,14 [0,75, 1,42]	10	4,83 [4,15, 5,4]	19	5,78 [4,33, 7,7]
До 2020		14	0 [0, 0,01]	19	0,18 [0,12, 0,19]			16	1,4 [0,78, 2,69]
Conv - легкой степени		33	0,31 [0,1, 0,62]	36	0,39 [0,23, 0,65]	24	3,88 [3,33, 4,49]	21	5,31 [2,97, 8,77]
Conv – умерен./тяж. степени		6	0,96 [0,92, 1,03]	6	1,28 [1,23, 1,33]	6	5,53 [5,41, 5,57]	4	6,57 [4,93, 9,63]
Conv - бессимпт.		6	0,34 [0,2, 0,58]	6	0,4 [0,23, 0,56]	7	3,75 [3,01, 3,8]	3	1,21 [0,86, 8,94]

На фигуре 36 показаны антителозависимый фагоцитоз моноцитов (A) и фагоцитоз нейтрофилов (B), отложение комплемента (C) и активация естественных клеток-киллеров (D) у участников испытаний, плазма крови выздоравливающих и плазма крови до пандемии, а также продольная Fc-зависимая функциональность антител у реципиентов вакцины ChAdOx1-nCoV19, выздоравливающих пациентов с COVID-19 и образцов до пандемии. На фигуре 36 показано следующее. (a) Оценки антителозависимого моноцитарного фагоцитоза (ADMP) для реципиентов вакцины, получавших либо 2 стандартные дозы с интервалом 28 дней (SD/SD D28, n=10), либо с интервалом 56 дней (SD/SD D56, n=19), либо одну стандартную и одну низкую дозу с интервалом 56 дней (SD/LD D56 n=24). Также показаны выздоравливающие пациенты с COVID-19 (Conv, n=48) и контроли до пандемии (до 2020, n=19). Медиана и межквартильный диапазон нормализованных ответов показаны для каждого изучаемого момента времени.

(b) Показатели антителозависимого нейтрофильного фагоцитоза (ADNP) для реципиентов вакцины, выздоравливающих пациентов с COVID-19 и контролей до пандемии. SD/SD D28 n=10, SD/SD D56 n=18, SD/LD D56 n= 24, Conv n=45, до 2020 n=14. Медиана и межквартильный диапазон нормализованных ответов показаны для каждого изучаемого момента времени.

(c) Антителозависимое отложение комплемента (ADCD). Медианы средней интенсивности флуоресценции (MFI) за вычетом фона и межквартильные диапазоны показаны для реципиентов вакцины, получавших 2 стандартные дозы с интервалом 56 дней (n=10) или одну стандартную и одну низкую дозу с интервалом 56 дней (n=12). Также показаны выздоравливающие пациенты с COVID-19 (Conv, n=37).

(d) Антителозависимая активация естественных клеток-киллеров (ADNKA). Медиана и межквартильный диапазон процентного содержания NK-клеток CD107a+ по отношению к контрольным лункам показаны для реципиентов вакцины, получавших либо 2 стандартные дозы с интервалом 28 дней (n=10) или 56 дней (n=19), либо одну стандартную и одну низкую дозу с интервалом 56 дней (n=22) и выздоравливающих пациентов с COVID-19 (n=28) и контролей до 2020 (n=16).

(E-H) Полярные графики данных нормализованные по всем временным точкам и группам с использованием нормализации мин.-макс. Размер каждого графика представляет среднее значение для каждого анализа в день 14 после бустерной дозы. Для групп с бустингом указанный момент времени составлял 14 дней после бустинга.

По сравнению с образцами сыворотки крови и плазмы крови, взятыми у выздоравливающих пациентов с COVID между 28 и 91 днями после положительного теста

ПЦР, как ADMP, так и ADNP были выше в вакцинированной группе после второй дозы. Образцы сыворотки крови, взятые до 2020 года, были отрицательными в обоих анализах, и у участников, которые получали вакцину MenACWY, эти функции не изменялись.

Антителозависимое отложение комплемента (ADCD) также индуцировалось примирующей вакцинацией и значительно увеличивалось после бустерных доз в D56. Более высокая медианная интенсивность флуоресценции (MFI) наблюдалась у реципиентов стандартной бустерной дозы по сравнению с реципиентами, получавшими половинную дозу (фигура 36C).

Также исследовали способность вакцины ChAdOx1 nCoV-19 индуцировать антителозависимую активацию NK-клеток (ADNKA) у людей, и при этом сообщалось, что она способна запускать экспрессию CD107a (фигура 36D). Результаты показали, что однократная доза ChAdOx1 nCoV-19 индуцировала низкие ответы ADNKA, которые усиливались второй дозой, введенной либо в день 28, либо в день 56. Доза, используемая для бустинга в день 56, не оказывала влияния на результирующую ADNKA, измеренную в день 70 (медиана SD/SD 56 5,78, IQR 4,33, 7,7, медиана SD/LD 56 5,29, IQR 3,61, 6,13), тогда как ADNKA, измеренная в день 42 после бустинга в D28 была ниже (медиана 3,96, IQR 3,44, 5,36). Ответы, наблюдаемые после введения двух доз вакцин, были в том же диапазоне, что и ответы, выявленные в когорте из 21 выздоравливающего пациента с COVID (медиана 5,31, IQR 2,97, 8,77), тогда как после вакцинации с помощью MenACWY не было выявлено никаких изменений.

На фигуре 37 показан ответ согласно ELISpot IFNγ в отношении пептидов, охватывающих предусматриваемую вакциной вставку, представленную шиповидным отростком SARS-CoV-2, после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19. Общий T-клеточный ответ ex vivo на введение вакцины с вставкой, представленной шиповидным отростком SARS-CoV-2, закодированным в вакцине, показан в зависимости от времени (ELISpot IFNγ; пятнообразующих клеток на 10^6 PBMC; рассчитано путем суммирования ответов на пулы пептидов с поправкой на фон; материалы и способы). Ответ показан как медиана с межквартильным диапазоном для схемы вакцинации; одна доза ChAdOx1: одна стандартная доза ChAdOx1 nCoV-19, SD/SD: две стандартные дозы ChAdOx1 nCoV-19, SD/LD: стандартная примирующая доза и низкая бустерная доза. Участники получали бустерную дозу ChAdOx1 nCoV-19 в день 28 (SD/SD D28) или в день 56 (SD/SD D56, SD/LD D56. LLD составляла 48 SFC и обозначена пунктирной линией.

Обсуждение

Авторы настоящего изобретения представляют убедительные доказательства того, что бустинг повышал как титр, так и функциональность ответа антител, что подтверждало предварительные данные относительно иммуногенности ChAdOx1 nCoV-19. Кроме того, авторы настоящего изобретения приводят четкие доказательства того, что бустерная доза является менее реактогенной, чем первая доза. Представленные в данном документе данные сыграли ключевую роль в поддержке решения о переходе от схемы с одной дозой к схеме с двумя дозами для испытаний фазы III ChAdOx1-nCoV19, которые проводятся в настоящее время.

Переносимость вакцин важна для общественного признания, и ожидаемый профиль реактогенности различных продуктов, которые можно использовать для контроля SARS-CoV-2, должен быть полностью охарактеризован и доведен до сведения будущих реципиентов вакцины до ее широкого использования. В более ранних примерах наблюдалась тенденция к снижению реактогенности после введения второй дозы ChAdOx1 nCoV-19 у небольшого числа вакцинированных. Теперь этот вывод был подтвержден в данном документе в большей когорте, в которой вторые дозы были последовательно менее реактогенными, чем первые, независимо от интервала между дозами. Наблюдение за снижением реактогенности второй дозы контрастирует с зарегистрированными профилями двух mRNA-вакцин против COVID19 и технологии вакцины с белковым адъювантом, в которой, хотя в целом она хорошо переносилась, реактогенность увеличивалась со второй дозой. Это явление заслуживает внимания, поскольку вполне возможно, что в будущем могут потребоваться дополнительные дозы для поддержания иммунитета. Графики, в которых различные вакцинные технологии смешиваются в гетерологичных схемах с примированием-бустингом, могут максимизировать иммуногенность, ограничивая при этом реактогенность, и могут привести в результате к инновационным стратегиям, использующим сильные стороны различных технологий.

Не было выявлено ассоциации между реактогенностью и присутствием или отсутствием антител к SARS-CoV-2 или к ChAdOx1 во время вакцинации. Это является важным выводом при рассмотрении вопроса о расширенном использовании вакцины после лицензирования, когда скрининг на антитела не будет проводиться до вакцинации, а некоторая часть населения уже подверглась воздействию SARS-CoV-2. Антитела против вектора ChAdOx1 индуцировались первой вакцинацией, но не предотвращали бустинг и их уровень не повышался в дальнейшем второй вакцинацией с интервалом либо 4 недели, либо 8 недель.

В данном документе авторы настоящего изобретения рассматривают индуцирование IgA и IgM в дополнение к антителозависимым функциональным активностям ADMP, ADNP, ADCD и ADNKA, которые усиливаются после второй дозы.

В то время как титр нейтрализующих антител, способных предотвращать клеточную инвазию, оказался наиболее сильным коррелятом защиты в доклинических исследованиях вакцины против SARS-CoV-2, функциональные активности, не являющиеся нейтрализующими, все чаще признаются важными медиаторами вирусного контроля, работающими в тандеме с CD8+ Т-клетками для уничтожения инфицированных вирусом клеток у хозяина (Excler et al. 2014; DiLillo et al. 2014). В доклинических исследованиях вакцинации против SARS-CoV-2 функции Fc-опосредованных антител, включая ADCD и ADNKA, коррелировали с защитой от инфекции после заражения вирусом и в комбинации с нейтрализующими антителами повышали способность различать полностью защищенных макак-резусов от тех, которые становились инфицированными (Atyeo et al. 2020; Yu et al. 2020; Mercado et al. 2020). В данном исследовании ответы ADNP, ADMP и ADNKA, индуцированные ChAdOx1 nCoV-19, были в том же диапазоне или выше, чем наблюдаемые в наборе образцов от выздоравливающих индивидуумов, собранных более чем через месяц после заболевания. Исследование, сравнивающее гуморальные ответы на SARS-CoV-2 у тех пациентов, которые выжили, по сравнению с теми, которые умерли, показало, что S-специфические гуморальные ответы, включая Fc-опосредованные функциональные активности, были выше у индивидуумов, которые выжили, в то время как нуклеокапсид-специфические ответы были повышены у умерших индивидуумов (нуклеокапсидные антитела не индуцировались посредством ChAdOx1 nCOV-19) (Atyeo et al. 2020). Эти данные свидетельствуют о том, что функциональные антитела против S-белка могут играть важную роль в разрешении болезни.

Способы

Анализ активации антителозависимых естественных клеток-киллеров (ADNK)

Для оценки антигенспецифической антителозависимой активации NK-клеток (ADNKA) 96-луночные планшеты для ELISA Nunc Maxisorp (Thermo Fisher) покрывали рекомбинантным шиповидным белком SARS-CoV-2 в концентрации 2,5 мкг/мл в растворе карбоната/бикарбоната (Sigma Aldrich) в течение 16 часов при 4°C. Планшеты промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и блокировали с помощью 5% BSA в PBS. Образцы сыворотки крови и плазмы крови высевали в неразбавленном виде в двух повторностях. После инкубации в течение двух часов при 37°C планшеты промывали и добавляли 10^5 естественных клеток-киллеров на лунку (клеточная линия NK92.05-CD16, Американская

коллекция типовых культур, описанная в Binyamin et al. (Binyamin et al., 2008) в присутствии брефельдина A (10 мкг/мл, Sigma Aldrich), Golgi Stop (BD Biosciences) и CD107a (PE, клон H4A3, BD Biosciences). Образец клеток отдельно окрашивали с помощью CD56 (BV786, клон NCAM16, BD Biosciences) и CD16 (AF594, клон GRM-1, Santa Cruz Biotechnology) для проверки последовательной экспрессии CD16. Через 5 часов инкубации клетки переносили в планшеты с V-образными лунками и окрашивали для анализа FACS. Живые NK-клетки идентифицировали с помощью фиксируемого окрашивания LIVE/DEAD (R780, BD Biosciences). Клетки фиксировали и собирали данные с помощью BD Fortessa. Процентное значение CD107a+ NK-клеток относительно контрольных лунок с шиповидным белком и блокирующим буфером определяли только в программном обеспечении FlowJo (версия 10.7.1). Допандемический пул от трех доноров и пул от шести госпитализированных инфицированных SARS-CoV-2 индивидуумов высевали в трех повторностях на каждый планшет для контроля качества каждого анализа.

Связывание гранул для анализов ADMP и ADNP

Красные флуоресцентные (580/605) микросферы, меченые NeutrAvidin (Thermo Fisher, F-8875), заново связывали с биотинилированным шиповидным белком SARS-CoV2 для каждого анализа. Шиповидный белок (в концентрации 0,388 мкл/мл) связывали с гранулами в соотношении 3:1 и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Гранулы промывали дважды с помощью 0,1% BSA и разбавляли 100-кратно в 0,1% BSA. В каждую лунку добавляли по 10 мкл в анализах ADNP и ADMP.

Антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP)

Анализ ADNP основан на ранее описанном протоколе (Karsten et al. 2019) с некоторыми модификациями. Цельную донорскую кровь, собранную в пробирки с натрием-гепарином, обрабатывали лизирующим буфером из аммония-хлорида-калия (ACK) (Thermo Fisher, A1049201) в течение 5 минут с последующим центрифугированием для сбора лейкоцитов. Клетки промывали с помощью DPBS (Sigma, D8537), подсчитывали и доводили до 2,5 x 10^5 клеток/мл в среде, состоящей из среды Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma, R5886) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина (Sigma, P4458) и 20 ммоль/л L-глутамина (Sigma, G7513).

Сыворотку крови, разбавленную в 100-кратно в RPMI, добавляли к антиген-связанным гранулам в 96-луночном планшете и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Все образцы анализировали в двух повторностях, и при этом каждый планшет содержал 2 образца контроля качества (QC) в дополнение к соответствующим отрицательным

контролям. Лунки промывали с помощью DPBS и добавляли всего 500000 лейкоцитов на лунку с последующим инкубированием в течение 1 часа при 37°C. Затем клетки окрашивали смесью CD3 Alexa700 (BD, 557943), CD14 APC-Cy7 (BD, 557831) и CD66b Pacific Blue (Biolegend, 305112) и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После промывки и фиксации с использованием 4% параформальдегида (PFA, Santa Cruz Biotechnology, SC-281692) с использованием проточной цитометрии (BD, Fortessa X20) определяли долю клеток, содержащих флуоресцентно меченые гранулы.

Данные анализировали с помощью Flowjo (BD, версия 10) с использованием стратегии гейтирования для выбора нейтрофилов. Нормализованные фагоцитарные баллы рассчитывали путем умножения процентного значения гранул-положительных клеток на среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) гранул в этих клетках и нормализация относительно образца QC была установлена на 1. Поскольку во время эксперимента использовалось несколько планшетов, то планшеты отбраковывали, если какое-либо из средних значений образца QC выходило за пределы среднего диапазона +/- 2 SD для этого конкретного QC по планшетам. Кроме того, образцы исключались из дальнейшего анализа, если в повторах коэффициент вариации (CV) превышал 25%. Все данные в данной статье получены из одного эксперимента.

Антителозависимый фагоцитоз моноцитов (ADMP)

Анализ ADMP основан на ранее описанном протоколе (Ackerman et al. 2011) с некоторыми модификациями. Вкратце, моноцитарную клеточную линию человека THP-1 (ATCC) выращивали и поддерживали в соответствии с инструкциями поставщика. Сыворотку крови разбавляли 4000-кратно в RPMI и добавляли к антиген-связанным гранулам в 96-луночном планшете и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Все образцы анализировали в двух повторностях, и при этом каждый планшет содержал 2 образца контроля качества (QC) в дополнение к соответствующим отрицательным контролям. В конце 2-часового периода инкубации лунки промывали с помощью RPMI и в каждую лунку добавляли по 250000 клеток THP-1, разбавленных в среде, состоящей из среды Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Sigma, R5886) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина/стрептомицина (Sigma, P4458) и 20 ммоль/л L-глутамина (Sigma, G7513). Клетки инкубировали с гранулами, покрытыми антителами, в течение 18 часов при 37°C. После 18-часового периода инкубации клетки промывали с помощью PBS и фиксировали с помощью 4% PFA. Долю клеток, содержащих флуоресцентно меченые шарики, измеряли с помощью проточной цитометрии (BD, Fortessa X20).

Данные анализировали с помощью Flowjo (BD, версия 10) с использованием стратегии гейтирования для выбора клеток THP-1. Нормализованные фагоцитарные баллы рассчитывали путем умножения процентного значения гранул-положительных клеток со средней интенсивностью флуоресценции (MFI) гранул в этих клетках и нормализация относительно образца QC была установлена на 1. Поскольку во время эксперимента использовалось несколько планшетов, то планшеты отбраковывали, если какое-либо из средних значений образца QC выходило за пределы среднего диапазона +/- 2 SD для этого конкретного QC по планшетам. Кроме того, образцы исключались из дальнейшего анализа, если в повторах коэффициент вариации (CV) превышал 25%. Все данные в данной статье получены из одного эксперимента.

Антителозависимое отложение комплемента (ADCD)

Карбоксильные магнитные синие флуоресцентные гранулы SPHERO™ (Spherotech, США) связывали с цельным шиповидным белком SARS-CoV-2 (Lake Pharma, США, ссылка 46328) с использованием двухстадийного процесса Sulpho-NHS/EDC, подробно описанного у Brown *et al*. Шиповидный белок был включен при уровнях насыщения, а связывание подтверждалось связыванием IgG от выздоравливающего донора с Covid-19, о котором было известно, что у него высокие уровни IgG к шиповидному белку.

Инактивированную нагреванием тестовую сыворотку крови (2,5 мкл, в двух повторностях) добавляли к 22,5 мкл блокирующего буфера (PBS, 2% BSA, BB) и отбирали 5 мкл для серийных 5-кратных разбавлений с получением окончательных разбавлений 1:20, 1:100, 1:500, 1:2500. Добавляли 20 мкл магнитных гранул, покрытых шиповидным белком SARS-CoV-2 (50 шариков на мкл), и смесь инкубировали при 25°C в течение 30 минут при встряхивании со скоростью 900 об./мин. Гранулы промывали дважды в 200 мкл промывочного буфера (BB + 0,05% Tween-20), затем ресуспендировали в 50 мкл BB, содержащего 10% обедненной на IgG и IgM человеческой плазмы крови (полученной согласно (Lesne et al. 2020)) и инкубировали при 37^{0}C в течение 15 мин. при встряхивании при 900 об./мин. Затем гранулы промывали дважды с помощью 200 мкл промывочного буфера и ресуспендировали в 100 мкл FITC-конъюгированного поликлонального антитела кролика к C3c человека (Abcam, Великобритания) и инкубировали при комнатной температуре в темноте. После еще двух промывок с помощью 200 мкл промывочного буфера образцы ресуспендировали в 60 мкл сбалансированного солевого раствора Хенкса и анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США) и программного обеспечения CytExpert. Для каждого образца собирали по меньшей мере 100 гранул. Медиану флуоресценции FITC только комплемента, без контрольных

антител вычитали из каждого тестируемого образца с получением антителозависимой медианы флуоресценции FITC. Интерполированные конечные титры рассчитывали в Microsoft Excel для определения разбавления, при котором антителозависимая медиана FITC пересекала отрицательный порог теста (флуоресценция, полученная с использованием образцов до 2020, подтвержденных как отрицательные с помощью ELISA + 3-кратное стандартное отклонение).

Мезомасштабный мультиплексный исследовательский иммуноанализ (MIA)

Антигенспецифические ответы на вакцинацию ChAdOx1 nCoV19 и/или естественную инфекцию SARS-CoV-2 измеряли с помощью мультиплексного иммунологического анализа (MIA). MIA был разработан и выполнялся компанией Meso Scale Discovery (MSD), Роквилл, Мэриленд, США, и описан в Folegatti *et al* (Folegatti et al. 2020). Вкратце, высушенные планшеты, покрытые шиповидными отростками SARS-CoV-2 и RBD, блокировали, промывали и инкубировали с образцами, эталонными стандартами и контролями. Внутренний контроль качества и эталонные стандартные реагенты были разработаны на основе объединенной в пул человеческой сыворотки крови. После стадий инкубации и промывки добавляли выявляющее антитело (MSD SULFO-TAG™ Anti-Human IgG Antibody), инкубировали и снова промывали планшеты. Добавляли буфер B для считывания MSD GOLD™ и планшеты считывали с помощью считывающего устройства MESO® SECTOR S 600. Образцы с нижним пределом количественного определения устанавливали на 2,58 для шиповидного отростка и 2,60 для RBD, тогда как образцы с верхним пределом устанавливали на 320000 для шиповидного отростка и 317073 для RBD.

Анализ микронейтрализации от Службы общественного здравоохранения Англии (PHE MNA80)

С использованием способа, аналогичного описанному выше для PHE MNA80 (и описанному в (Folegatti et al. 2020), с помощью анализа микронейтрализации (MNA) измеряли микробляшки с использованием анализатора ImmunoSpot® S6 Ultra-V. Вкратце, смеси сыворотки крови/вируса добавляли к монослоям восприимчивых к вирусу клеток Vero/E6 в течение одного часа перед заменой инокулята покрытием (1% вес/об. CMC в полной среде). После 24-часовой инкубации клетки фиксировали формальдегидом. Микробляшки выявляли с помощью антитела к SARS-CoV-2, специфического к шиповидному белку RBD SARSCoV-2, и конъюгата HRP кролика. Инфицированные микробляшки выявляли с помощью субстрата TrueBlueTM. Полученные в результате подсчеты анализировали в программном обеспечении SoftMax Pro v7.0.

Анализ нейтрализации псевдотипа Monogram Biosciences (PseudoNA)

Титры нейтрализующих антител (Nab) определяли с использованием частиц псевдовируса SARSCoV-2 на основе лентивируса, экспрессирующих шиповидный белок (номер доступа: MN908947.3). Анализ нейтрализации псевдотипа nAb CoV описан в (Folegatti et al. 2020) и основан на ранее описанных методиках с использованием псевдовирионов ВИЧ-1 (Petropoulos et al. 2000; Richman et al. 2003; Whitcomb et al. 2007).

Вкратце, инактивированные нагреванием разбавленные образцы сыворотки крови инкубировали с псевдотипированным вирусом SARS-CoV2. Титры Nab определяли путем создания 9 серийных трехкратных разбавлений тестовых образцов. В качестве контроля использовали нерелевантный псевдотипированный вирус. После инкубации разбавленной сыворотки крови и частиц псевдовируса добавляли клетки, трансфицированные ACE2 клетки HEK 293, планшеты инкубировали и измеряли экспрессию люциферазы. О титрах Nab сообщали как об обратной величине разбавления сыворотки крови, предусматривающей 50% ингибирование (ID50) псевдовирусной инфекции. % ингибирования = 100% – (((RLU (вектор + образец + разбавитель) – RLU (фон))/(RLU (вектор + разбавитель) – RLU (фон))) x 100%. Анализ nAb к SARS CoV-2 положительных и отрицательных контрольных сывороток крови включали в каждый 96-луночный планшет для анализа.

Пример 18. Подробное фенотипирование иммунного ответа, индуцированного вакциной ChAdOx1 nCoV-19, в клиническом испытании фазы 1/2

Пример 18 относится к рандомизированному контролируемому испытанию фазы I/II, его следует рассматривать вместе с предыдущими примерами, в частности с примерами 11, 15, 16 и 17. На фигурах 39-44 показаны данные, относящиеся к примеру 18.

Краткое описание

Ожидалось, что сильные Т-клеточные ответы со сдвигом по Th1 были оптимальными для управления защитными гуморальными иммунными ответами, контролирующими инфекцию клеточно-опосредованными иммунными ответами и снижением потенциала для усиления заболевания. В данном документе авторы настоящего изобретения подробно описывают иммунный ответ у взрослых в возрасте 18-55 лет после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCOV-19, демонстрируя индуцирование Th1-обусловленного ответа, характеризующегося секрецией цитокинов IFN-γ и TNFα $CD4^+$ Т-клетками и выработку антител преимущественно подклассов IgG1 и IgG3, последний из которых коррелировал с нейтрализующей активностью. Также были индуцированы $CD8^+$ Т-клетки монофункционального, полифункционального и цитотоксического фенотипов. В

совокупности эти результаты свидетельствуют о благоприятном иммунном профиле, индуцированном вакциной ChAdOx1 nCoV-19.

В данном документе авторы настоящего изобретения приводят подробное описание иммунного ответа после введения одной или двух доз ChAdOx1 nCoV-19. Важно отметить, что с помощью нескольких методик (мультиплексный анализ цитокинов, анализ ICS и оценка профиля антител) авторы настоящего изобретения демонстрируют, что вакцинация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 индуцирует преимущественно Th1-ответ, смягчая опасения по поводу вызываемого Th2 заболевания, усиленного вакциной, и указывая на потенциально защитный уровень иммунного ответа, индуцированного с помощью вакцинации.

Вакцинировали 98 здоровых взрослых в возрасте от 18-55 лет с помощью 5 x 10^{10} вирусных частиц вакцины-кандидата ChAdOx1 nCov-19 как часть клинического испытания фазы I/II. Образцы крови собирали в день вакцинации и через 7, 14, 28 и 56 дней после вакцинации. Десять вакцинированных получали вторую дозу той же вакцины через четыре недели (день 28) и у этих участников в дни 35 и 42 брали дополнительные образцы крови.

Клетки адаптивного и врожденного иммунитета активируются и пролиферируют после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 с секрецией цитокинов, обусловленной Th1

Беспристрастный подход применяли для измерения грубых фенотипических и клеточных изменений, вызванных поствакцинальным воздействием, в дни 7, 14 и 28 после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 (фигуры 39a-e).

Проточный цитометрический анализ дискретных иммунных популяций проводили на нестимулированных замороженных PBMC. Комбинированный анализ tSNE 26 добровольцев, вакцинированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19, сформировал дискретные популяции Т-клеток, NK-клеток и В-клеток в день 0-й и дни 7, 14 и 28, что указывало на фенотипические изменения в этих клеточных популяциях после вакцинации. Внутри этих кластеров были идентифицированы отдельные популяции пролиферирующих (Ki-67^{+}) или активированных ($CD69^{+}$) клеток (фигуры 39b-e). Популяции активированных клеток заметно сгруппированы в популяциях IgG^{+} В-клеток, популяциях $CD4^{+}$Т-клеток и популяциях NK-клеток.

В-клетки, особенно популяция IgG+ В-клеток, повышали уровень маркера клеточной пролиферации Ki-67 во все моменты времени после вакцинации (фигуры 39f и g). В

общей популяции В-клеток явный сдвиг в сторону активированного фенотипа достигал пика в день от 7 до 28, а для популяции IgG^+ В-клеток в дни 7-14 (фигуры 39f и g).

$CD4^+$ Т-клетки характеризовались повышенной экспрессией маркера активации CD69 от дня 7 до дня 28 после вакцинации и тенденцией к повышению экспрессии Ki-67 в дни 7 и 14 после вакцинации (фигуры 39f и g). $CD8^+$ Т-клетки экспрессировали аналогичный паттерн экспрессии Ki-67 и CD69 между днями 7 и 28 после вакцинации (фигуры 39f и g). Не было повышения экспрессии маркеров терминальной дифференцировки CD57 и KLRG1 в $CD8^+$ Т-клетках после вакцинации, что указывало бы на снижение цитотоксической способности после вакцинации[32]. После стимуляции пептидом в день 14 также наблюдалось увеличение выработки TNFα и IFNγ $CD4^+$ Т-клетками (фигура 39h). Эти маркеры активации типичны для ответа, вызванного Th1. Аналогичный паттерн экспрессии Ki-67 и CD69 между днями 7 и 28 после вакцинации (фигуры 39f и g). Не было повышения экспрессии маркеров терминальной дифференцировки CD57 и KLRG1 в $CD8^+$ Т-клетках после вакцинации, что в случае обнаружения указывало бы на снижение цитотоксической способности после вакцинации. После стимуляции пептидом в день 14 также наблюдалось увеличение выработки TNFα и IFNγ $CD4^+$ Т-клетками (фигура 39h). Эти маркеры активации типичны для ответа, вызванного Th1.

NK-клетки могли вызывать цитотоксический ответ на вирусные инфекции и в ответ на вакцинацию. В данном документе авторы настоящего изобретения демонстрируют, что после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 процентное значение комбинированных $CD56^+CD16^+$ и $CD56^{++}CD16^-$ NK-клеток немного увеличивалось в дни 7 и 14 после вакцинации, и что экспрессия Ki-67 NK-клетками неуклонно возрастала до пика в день 28 (фигура 39f). Не было значительных изменений в экспрессии CD57, указывающих на терминальную дифференцировку или активацию рецептора NKG2C.

Мультиплексный анализ цитокинов проводили в день 7 после вакцинации после антигенспецифической стимуляции PBMC. Из девяти проанализированных цитокинов пять (IL1β, IL12, IL4, IL13 и IL8) не продемонстрировали различий в уровнях экспрессии после стимуляции. Секреция IFNγ и IL2 была значительно повышена у вакцинированных с помощью ChAdOx1 по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0001$ и $p=0,0003$ соответственно, критерий Манна-Уитни) с умеренным повышением уровня TNFα ($p=0,09$, критерий Манна-Уитни). Уровни IL4 и IL13 не повышались у вакцинированных с помощью ChAdOx1 после стимуляции PBMC ($p > 0,05$ для обоих), однако было измерено умеренное повышение IL10 ($p=0,005$). Величина секреции цитокинов, измеренная у вакцинированных с помощью ChAdOx1, была выше для IFNγ (медиана 36,4 пг/мл,

межквартильный диапазон [IQR] 15-67) и IL2 (медиана 10,7 пг/мл, IQR 1,7-22), чем для IL10 (медиана 1,4 пг/мл, IQR 0,9-2,6), что указывало на сильное смещение в сторону секреции цитокинов Th1 (фигура 39i).

Иммунные ответы на ChAdOx1 nCoV-19 не зависят от пола

Пациенты женского пола с COVID-19 демонстрируют более сильную активацию Т-клеток, чем пациенты мужского пола, а плохой Т-клеточный ответ отрицательно коррелировал с возрастом пациентов, что было ассоциировано с худшим исходом заболевания у пациентов мужского пола. Ранее также было продемонстрировано, что у женщин более сильные противовирусные иммунные ответы. Ранее сообщалось о сильном иммунитете, индуцированном с помощью ChAdOx1 nCOV-19, против шиповидного антигена SARS-CoV-2, измеренном посредством *ex vivo* IFNγ ELISpot и общего IgG ELISA. Авторы настоящего изобретения проанализировали эти два основных показателя иммунологических исходов в разбивке по полу и возрасту. Авторы настоящего изобретения не обнаружили половых различий в ответе на вакцину после однократной дозы вакцины в любой из измеренных моментов времени ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни). Авторы настоящего изобретения не выявили ассоциации между возрастом и величиной иммунного ответа для любого из критериев эффективности ($p=0,7$, корреляция Спирмена) в этой популяции в возрасте от 18 до 55 лет.

Вакцинация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 индуцировала IgM и IgA, специфические к SARS-CoV-2, а также IgG после схем примирующей вакцинации или режима вакцинации "прайм-буст".

Был проведен комплексный анализ изотипа (IgM, IgA и IgE) антител к шиповидному отростку SARS-CoV-2. Как сообщалось ранее, авторы настоящего изобретения включили анализ IgG с включением дополнительных точек данных. Реакцию антител, специфических к шиповидному отростку SARS-CoV-2, количественно оценивали с помощью стандартизированного ELISA для участников испытания, получавших вакцину на основе MenACWY или ChAdOx1 nCoV-19, и она показана на фигуре 40.

Общие ответы IgG против шиповидного белка были выявляемыми в день 14, достигали пика в день 28 и сохранялись в день 56 (фигура 40A; таблица 1). Вакцинация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 также приводила к повышенным уровням IgM и IgA, специфических к SARS-CoV-2, с пиковыми ответами в день 14 или день 28 соответственно (фигуры 40B и C; таблица 1).

Как описано ранее, общие ответы IgG увеличивались после введения второй дозы ChAdOx1 nCoV-19 через 4 недели после первой дозы (фигура 40A; таблица 1). В этой

подгруппе вакцинированных пиковый ответ выявляли в день 42 после первоначальной вакцинации. Ответы IgM и IgA сохранялись на одинаковых уровнях после примирующей и бустерной вакцинации (фигура 40B и C; таблица 1) без существенных различий в день 56 в группе в режиме "прайм-буст" по сравнению с только группой примирования (p=0,767 и p= 0,092 соответственно, критерий Манна-Уитни). Подробная оценка профиля изотипов иммуноглобулинов выполнялась на образцах плазмы крови выздоравливающих пациентов с COVID-19. В то время как ответы IgG, специфические к шиповидному отростку SARS-CoV-2, у этих индивидуумов были на тех же уровнях, что и у вакцинированных с помощью ChAdOx-1 nCoV-19 после схемы в режиме "прайм-буст", ответы IgM и IgA, вызванные вакцинацией, в целом были ниже, чем те, которые были вызваны после естественной инфекции (фигуры 40A, B и C). После вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 были выявлены низкие ответы IgE, специфические к шиповидному отростку SARS-CoV-2, которые были аналогичны результатам, измеренным после естественного воздействия SARS-CoV-2.

Авидность IgG, специфических к шиповидному SARS-CoV-2, от добровольцев, у которых в день 28 наблюдался поддающийся количественной оценке ответ IgG, оценивали с помощью ELISA с заменой тиоцианата натрия. Авидность IgG увеличивалась от дня 28 (медиана 0,66, межквартильный интервал 0,60-0,76; n=45) до дня 56 только в группе примирования (медиана 0,88, межквартильный интервал 0,74-0,94, n=44), и в группе в режиме "прайм-буст" (день 28, медиана 0,54, IQR 0,52-0,68; n=10; медиана в день 56 0,94, IQR 0,83-1,15; n=10) (фигура 40D). Хотя значения авидности были сопоставимы в день 56 между обеими схемами вакцинации, наблюдалось более высокое кратное изменение по сравнению с исходным уровнем между значениями в день 28 и в день 56 в группе в режиме "прайм-буст" (среднее значение 1,58, стандартное отклонение 0,39; n=10) при сравнении с группой только примирования (среднее значение 1,30, стандартное отклонение 0,27; n=44) (p=0,0093, непарный t-критерий) (фигура 40E). Авидность IgG, создаваемая одной дозой ChAdOx1 nCoV-19 ко дню 56 или стимулирующей дозой ChAdOx1 nCoV-19 ко дню 35, превышала авидность IgG, измеренную в образцах от выздоравливающих пациентов с COVID-19 (медиана 0,77, IQR 0,62-0,92; n=49).

Анализ подклассов после примирующей вакцинации или вакцинации "прайм-буст" с помощью ChAdOx1 nCoV-19

Образцы от участников, вакцинированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19, с выявляемыми уровнями общего IgG в день 14 после вакцинации анализировали на наличие подклассов IgG к шиповидному отростку (фигура 41). Ответы IgG1 и IgG3,

специфические к SARS-CoV-2, были легко выявляемыми в день 14, усиливались ко дню 28 и возвращались к уровню, аналогичному уровню, измеренному в день 14, ко дню 56 (фигуры 41a и b; таблица 1). В то время как ответы IgG3 поддавались количественному определению у подавляющего большинства вакцинированных (день 14 39/44; день 28 42/44 и день 56 39/44), ответы на IgG1 поддавались количественному определению примерно у половины вакцинированных (день 14 24/44; день 28 23/44 и день 56 22/44). После бустерной вакцинации медиана ответа IgG1 у добровольцев не превышала исходный уровень с аналогичными уровнями в день 56 по сравнению с группой только примирования (p=0,8; критерий Манна-Уитни). Ответы IgG3 усиливались после бустерной вакцинации и были значительно сильнее в день 56 по сравнению с группой только примирования (p=0,003, критерий Манна-Уитни). Средние уровни IgG2 и IgG4 были низкими во всех группах и во все моменты времени (фигуры 41c и d). Подобный смешанный профиль IgG3/IgG1 с низкими уровнями IgG2 и IgG4 был измерен в образцах плазмы крови выздоравливающих людей. В соответствии с ранее опубликованными данными ответы IgG1, специфические к шиповидному отростку SARS-CoV-2, были ниже предела количественного определения в некоторых образцах плазмы крови выздоравливающих людей (фигуры 41a, b, c и d). Наконец, авторы настоящего изобретения проанализировали корреляцию между уровнями IgG3 и способностью к нейтрализации для тех же вакцинированных, как сообщалось ранее (анализ микронейтрализации (MNA_{80})), демонстрируя корреляцию между уровнями IgG3 и MNA_{80} (по Спирмену r=0,73; 95% CI 0,51-0,86; $p < 0,001$) (фигура 41e).

ChAdOx1 nCoV-19 индуцировал обширный Т-клеточный ответ на субъединицы S1 и S2 шиповидного антигена SARS-CoV-2

Т-клеточные ответы измеряли с помощью ELISpot IFNγ до и после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 с пиком в день 14. Ответы проанализировали против 13 пулов перекрывающихся пептидов (таблица S1), охватывающих длину вставки вакцинного антигена, которая включает субъединицы S1 и S2, и экзогенного пептида лидерной сигнальной последовательности человеческого тканевого активатора плазминогена (tPA), ранее показанного для усиления иммуногенности вакцин-кандидатов против MERS-CoV у мышей. Все пулы пептидов, за исключением сигнального пептида tPA, вызывали положительный ответ (определяемый как среднее значение отрицательного контроля плюс 4 SD) у по меньшей мере 25% участников, что указывало на распознавание множественных эпитопов в обеих субъединицах шиповидного отростка. Наиболее часто распознаваемыми пулами были 4 и 2, которые охватывали аминокислоты от 311 до 430 и

от 101 до 200 домена S1 и вызывали положительный ответ с помощью ELISpot IFNγ у 88% и 86% участников соответственно.

Поскольку положительные ответы на некоторые пулы пептидов были выявляемыми у небольшой части участников до вакцинации (фигура 42a), то ответы на отдельные пулы в день 14 были нанесены на график в виде кратности изменения по сравнению с днем 0 (фигура 42b и фигура 43). Наибольшее увеличение было выявлено в отношении пулов 4 и 2, соответствующих субъединице S1. Эти пулы вызывали медианный ответ 165 SFC/10^6 PBMC и 124 SFC/10^6 PBMCS соответственно в день 14, что соответствовало медиане 28- и 19-кратного изменения от исходного уровня. Ответы Т-клеток были выявлены как в субъединицах S1, так и в субъединицах S2, однако ответы Т-клеток на сигнальную последовательность tPA в конструкции вакцины не были выявлены.

Вакцинация индуцировала Th1-обусловленный ответ $CD4^+$ Т-клеток и цитотоксический ответ $CD8^+$ Т-клеток против шиповидных пептидов SARS-CoV-2

Проточная цитометрия с внутриклеточным окрашиванием цитокинов PBMC, стимулированных пептидами, охватывающими субъединицы S1 и S2 шиповидного белка SARS-CoV-2, продемонстрировала антигенспецифическую секрецию цитокинов как $CD4^+$ (GM 0,1%, 95% CI 0,08-0,13), так и $CD8^+$ (0,05%, 95% CI 0,03-0,08) Т-клеток через 14 дней после однократной дозы ChAdOx1 nCoV-19. После второй дозы частота увеличилась как для $CD4^+$ (GM 0,16%, 95% CI 0,1-0,24), так и для $CD8^+$ (0,11%, 95% CI 0,05-0,23) Т-клеток, хотя увеличение не было статистически значимым (фигура 44a). $CD8^+$ Т-клетки экспрессировали маркер дегрануляции CD107a, указывающий на цитотоксическую функцию (GM 0,03%, 95% CI 0,02-0,05), которая снова увеличивалась после бустинга (GM 0,05%, 95% CI 0,015-0,14) (фигура 44b). Ответы $CD4^+$ были сильно смещены в сторону секреции цитокинов Th1 (IFNγ и IL2), а не Th2 (IL5 и IL13, фигура 44c), и соотношение секреции цитокинов дополнительно увеличивалось в сторону фенотипа со смещением в сторону Th1 после бустинга (фигура 44d). Частота цитокин-положительных клеток, как правило, была выше в популяции $CD4^+$ Т-клеток, чем в популяции $CD8^+$, и цитокиновые ответы были выявлены в день 14 у участников с положительной предварительной вакцинацией. Ответы Т-клеток и антител на SARS-CoV-2 (фигура 44e). При оценке комбинаций цитокинов в популяциях $CD4^+$ или $CD8^+$ было выявлено несколько многофункциональных Т-клеток (фигуры 44f и g). В ответах доминировали Т-клетки, экспрессирующие одиночные цитокины, в частности монофункциональные $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ Т-клетки и многофункциональность ответа не увеличивалась при гомологичном бустинге

второй дозой. Были выявляемыми некоторые двойные положительные $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие комбинацию IFNγ и TNFα.

Фигуры для примера 18 являются следующими.

Фигура 39. Активация популяций лимфоцитов после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19

(A-E) Анализ tSNE популяций лимфоцитов PBMC от 26 участников испытания вакцины на основе ChAdOx1 nCoV-19: A) глобальное скопление иммунных клеток во всех образцах, B-E) анализ популяции tSNE в день 0 и в дни 7, 14 и 28 после вакцинации. Области кластера активности Ki-67+ (желтые) в IgG^+ B-клетках (1), NK-клетках (2) и $CD4^+$ Т-клетках (3) после вакцинации. Анализ проводили на нестимулированных клетках.

(F-H) Анализ карты интенсивности маркеров активации, экспрессируемых иммунными клетками, в дни 0, 7, 14 и 28 после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19. F) Экспрессия Ki-67 с помощью IgG^+ B-клеток и NK-клеток (два верхних ряда), а также NK-клеток (три верхних ряда). Экспрессия CD69 $CD4^+$ Т-клетками и $CD8^+$ Т-клетками (два нижних ряда). G) Экспрессия Ki-67 B-клетками, $CD4^+$ Т-клетками и $CD8^+$ Т-клетками. H) Экспрессия TNFα и IFNγ $CD4^+$ Т-клетками. Анализ экспрессии TNFα и IFNγ проводили на клетках, стимулированных пулами шиповидных гликопротеиновых пептидов, за вычетом нестимулированных значений. Все остальные анализы проводили на нестимулированных клетках.

I. Мультиплексный анализ цитокинов проводили в день 7 после вакцинации с использованием супернатантов после антигенспецифической стимуляции PBMC. Группа ChAdOx1 nCov-19 показана синим цветом, а группа MenACWY показана красным. Значительная разница наблюдалась между IFNγ ($P < 0,0001$), IL-2 ($P=0,0003$) и IL-10 ($P=0,0051$) по Манну-Уитни. Линии показаны посередине с планками погрешностей, демонстрирующими IQR.

Фигура 40. Изотипические ответы иммуноглобулина, индуцированные вакцинацией с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или MenACWY.

Добровольцы в основной группе получали одну вакцину ChAdOx1 nCoV-19 или MenACWY в день 0. Добровольцы в контрольной группе с бустерной иммунизацией получали ChAdOx1 nCoV-19 в день 0 и день 28. Показаны данные для образцов плазмы крови выздоравливающих людей (CONV) от пациентов, выздоровевших от SARS-CoV-2. Символы CONV окрашены в зависимости от тяжести заболевания: зеленый — отсутствие симптомов, серый — легкие симптомы, желтый — умеренные симптомы, оранжевый — тяжелые симптомы и красный — критические симптомы. Группа MenACWY показана

синим цветом. Группа примирования с помощью ChAdOx1 показана красным цветом. Группа в режиме "прайм-буст" с помощью ChAdOx1 показана фиолетовым.

(A-C) Ответы антител, специфических к тримеру шиповидного отростка SARS-CoV-2, количественно определяли с помощью стандартизированного ELISA и выражали в единицах ELISA (EU). Пунктирные линии показаны на пределе количественного определения каждого анализа, подробности которого приведены в материалах и способах. Линии показаны в среднем с планками погрешностей, демонстрирующими IQR.

(D) Авидность ответов антител IgG, специфических к тримеру шиповидного отростка SARS-CoV-2, измеряли с помощью ELISA с химическим замещением NaSCN и выражали в виде IC50. Линии показаны в среднем с планками погрешностей, демонстрирующими IQR.

(E) Изменение кратности авидности между днем 56 и днем 28. Линии показаны в среднем с планками погрешностей, демонстрирующими 95% CI. Пунктирная линия представляет отсутствие изменений в авидности. Значение больше единицы указывает на увеличение авидности от дня 28 до дня 56.

Таблица 18_1. Сводные данные по антителам (см. ниже)

Уровни антител к иммуноглобулинам шиповидного отростка SARS-CoV-2 в сыворотке крови добровольцев (n) после примирующей вакцинации или вакцинации "прайм-буст" с помощью ChAdOx1-nCoV-19, представленные в виде медианы с межквартильным диапазоном (IQR).

Таблица 18_1

Таблица 1. Уровни иммуноглобулинов к шиповидному отростку SARS-CoV-2 в сыворотке крови

Примирующая иммунизация с помощью ChAdOx1 nCoV-19

	IgG			IgM			IgA			IgG1			IgG3		
(EU)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)	n	Медианное значение	IQR* (25-75%)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)
D0	44	**1,00**	1,00-1,00	44	**14,17**	12,00-22,35	44	**12,00**	12,00-12,00						
D7	44	**1,00**	1,00-2,00	44	**19,07**	12,00-27,10	44	**12,00**	12,00-12,00						
D14	44	**103,00**	38,50-188,80	44	**44,80**	25,71-66,05	44	**26,09**	17,21-57,64	44	**30,90**	18,00-224,60	44	**46,62**	20,16-89,94
D28	44	**165,00**	105,00-336,50	44	**39,90**	26,85-73,64	44	**28,26**	14,08-47,28	44	**62,59**	18,00-504,70	44	**59,78**	33,71-123,20
D56	43	**121,00**	73,00-217,00	43	**22,85**	13,26-32,38	43	**14,23**	12,00-26,57	43	**37,98**	18,00-246,30	43	**36,62**	19,13-64,50

Иммунизация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 в режиме "прайм-буст"

	IgG			IgM			IgA			IgG1			IgG3		
(EU)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)	n	Медианное значение	IQR (25-75%)
D0	10	**1,00**	1,00-4,50	10	**12,00**	12,00-15,08	10	**12,00**	12,00-12,52						
D7	10	**1,00**	1,00-3,00	10	**12,48**	12,00-18,08	10	**12,00**	12,00-13,32						
D14	10	**137,00**	29,75-256,30	10	**37,97**	17,64-86,71	10	**20,88**	16,06-138,1	10	**18,00**	18,00-104,90	10	**64,09**	17,93-143,30
D28	10	**211,00**	135,30-376,00	10	**45,57**	18,52-97,15	10	**14,59**	12,57-152,8	10	**18,00**	18,00-262,00	10	**110,80**	32,87-219,80
D35	10	**821,00**	538,30-1419,0	10	**43,50**	24,13-74,48	10	**31,70**	16,86-112,30	10	**19,66**	18,00-1040,00	10	**167,50**	58,04-246,60
D42	9	**997,00**	598,00-1338,0	9	**24,24**	16,98-86,69	9	**22,40**	14,64-49,12	9	**18,00**	18,00-876,90	9	**186,00**	58,04-241,00
D56	10	**639,50**	349,30-860,80	10	**17,86**	14,47-36,16	10	**24,52**	16,35-95,69	10	**18,00**	18,00-860,00	10	**133,50**	83,21-190,60

*IQR - межквартильный диапазон

Фигура 41. Ответы подкласса IgG, вызванные однократной дозой или схемой в режиме "прайм-буст" с помощью ChAdOx1 nCoV-19.

Добровольцы в группе однократной (примирование) дозы (красные) получали вакцину ChAdOx1 nCoV-19 в день 0. Добровольцы в группе в режиме "прайм-буст" (фиолетовые) получали вакцину ChAdOx1 nCoV-19 в день 0 и день 28.

(A-B) Ответы антител, специфических к тримеру шиповидного отростка SARS-CoV-2, количественно определяли с помощью стандартизированного ELISA и выражали в единицах ELISA (EU). Пунктирные линии показаны на пределе количественного определения каждого анализа, подробности которого приведены в материалах и способах.

(C-D) Ответы антител, специфических к тримеру шиповидного отростка SARS-CoV-2, измеряли с помощью непрямого ELISA и выражали в виде OD_{405}. Добровольцы, которые были серопозитивными в отношении общего IgG в день 0 или сероотрицательными в день 28, были исключены из анализа независимо от статуса вакцинации. Данные показывают только добровольцев, вакцинированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19. Пунктирные линии показывают среднее значение порога отсечения для каждого анализа. Пороги отсечения рассчитывали для каждого планшета в соответствии с материалами и способами.

(A-D) Линии показаны в среднем с планками погрешностей, демонстрирующими IQR. Показаны ответы для образцов плазмы крови выздоравливающих людей (CONV) от пациентов, выздоровевших от SARS-CoV-2. Символы CONV окрашены в зависимости от тяжести заболевания: зеленый — отсутствие симптомов, серый — легкие симптомы, желтый — умеренные симптомы, оранжевый — тяжелые симптомы и красный — критические симптомы.

(E) Связь между данными анализа микронейтрализации (MNA IC80) и уровнями специфических к тримеру IgG3 и IgG1. Диаграмма рассеяния матрицы корреляции (E) и коэффициент корреляции Спирмена (среднее значение с доверительным интервалом 95%), проанализированные в день 28.

Фигура 42. Ответы IFNγ посредством ELISPOT на пулы 15-мерных пептидов, покрывающих вакцину ChAdOx1-nCOV19

(A) Общий ответ на S1 и S2 (сумма из 6 пулов пептидов каждый) в D0 и D14 после вакцинации. Столбцы показывают медиану SFC на миллион PBMC, а столбцы с планками погрешностей представляют IQR. Пунктирная линия представляет нижний предел

выявления анализа (48 SFC). (B) Карта интенсивности кратности изменения SFC для каждого пула пептидов для каждого участника от исходного уровня (D0) до D14 после вакцинации. Показаны данные только от вакцинированных с помощью ChAdOx1.

Фигура 43. Кратное изменение SFC для каждого пула пептидов для каждого участника, вакцинированного с помощью ChAdOx1, от исходного уровня (D0) до D14 после вакцинации Кружки показывают изменение средней кратности со столбцами, представляющими IQR.

Фигура 44. Т-клеточные ответы на шиповидные пептиды SARS-CoV-2, измеренные с помощью проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием цитокинов

(A) Частота CD4+ или CD8+ Т-клеток, экспрессирующих IFNγ, IL2 или TNFα, через 2 недели после примирующей или бустерной дозы (n=7). Кружки обозначают отдельных участников, а линии — геометрические средние значения. (B) Частота CD8+ Т-клеток, экспрессирующих CD107a+, через 2 недели после примирующей или бустерной дозы. (C) Частота секреции цитокинов Th1 и Th2 CD4+ Т-клетками через 2 недели после введения одной дозы (n=36). (D) Соотношение секреции цитокинов Th1 и Th2 через 2 недели после первой или второй дозы. (E) Частота CD4+ или CD8+ Т-клеток, экспрессирующих соответствующие отдельные цитокины. Пунктирные линии показывают нижний предел выявления (LLD). (F) и (G) Экспрессия комбинаций цитокинов из CD4+ (F) и CD8+ (G) Т-клеток. На всех панелях n=39 участников после примирования и n=7 после бустинга. Показаны данные только от вакцинированных с помощью ChAdOx1.

Обсуждение

Авторы настоящего изобретения подробно описали в данном документе профиль экспрессии цитокинов как $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, так и состав подкласса IgG ответа антител на вакцину ChAdOx1 nCoV-19. Сильная активация и пролиферация В-клеток наблюдаются после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19, а антитела IgA и IgG к шиповидному белку SARS-CoV-2 легко выявляются в сыворотке крови добровольцев, вакцинированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19. Временная выработка подклассов антител была аналогична той, о которой сообщалось у пациентов с COVID-19, и последняя напоминала типичную вирусную инфекцию с ранними ответами короткоживущих экстрафолликулярных В-клеток, за которыми следовали реакции клеток зародышевого центра и ответы долгоживущих В-клеток памяти. Ответы антител IgG к шиповидному отростку на пике ответа после вакцинации демонстрируют поляризованный ответ IgG1, который согласовывается с естественными антителами к SARS CoV-2. Повышение уровня IgG3 после бустинга позволяет предположить, что этот подкласс

может лежать в основе функционального повышения титра нейтрализующих антител. IgG3, вырабатываемый на ранних стадиях после вирусных инфекций, координирует множественные эффекторные функции антител, которые имеют решающее значение для быстрого клиренса и могут способствовать выздоровлению после инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. Смешанный ответ IgG1 и IgG3 с низкими уровнями IgG2 у подгруппы добровольцев и небольшим количеством выявляемого IgG4 согласовывается с ранее опубликованными отчетами, описывающими индуцирование подклассов человеческого IgG Th1-типа (IgG1 и IgG3) после аденовирусного примирования.

Патология, согласующаяся с заболеванием, усиленным вакциной, и в одном случае антителозависимое усиление инфекции (ADE) были продемонстрированы на животных моделях для некоторых вакцин-кандидатов против SARS-CoV-1, и есть опасения, что аналогичный патологический ответ мог быть вызван у людей после вакцинации против SARS-CoV-2. Заболевание, усиленное вакциной, приводит к увеличению тяжести заболевания, когда вакцинированные субъекты впоследствии подвергаются воздействию естественного вируса или заражению им. В ряде доклинических исследований вакцин-кандидатов против SARS-CoV-1 на моделях мышей, хорьков и приматов, отличных от человека (NHP), сообщалось об усилении заболевания, когда вакцинированных животных заражали живым вирусом. Явление напоминает заболевание, наблюдаемое при ранней разработке вакцин против респираторно-синцитиального вируса (RSV), при котором патология была ассоциирована с высоким соотношением ненейтрализующих антител к нейтрализующим антителам, ролью нейтрофилов, эозинофилов и преимущественно Th2-обусловленным ответом. Заболевание, усиленное вакциной, отличалось от ADE и исходного антигенного симптома (OAS) или импринтинга. Первое явление может наблюдаться после флавивирусной инфекции или вакцинации, а второе легко наблюдается после рецидивирующей инфекции гриппа. Вакцинация с помощью вакцины на основе вектора MVA, экспрессирующей шиповидный белок SARS-CoV-1, была связана с ADE в модели инфекции у хорьков. Ответы нейтрализующих антител, вызванные вакцинацией, были низкими, и при этом было продемонстрировано, что антитела, способные к нейтрализации при высоких титрах, могут приводить к ADE при низких титрах. Напротив, титры нейтрализующих антител, индуцированные после первой дозы ChAdOx1 nCoV-19, являются высокими, еще больше увеличиваются после второй дозы и приводили к снижению заболеваемости у вакцинированных и зараженных NHP. Относительная способность аденовирусных вакцин и вакцин на основе вектора MVA вырабатывать после примирования нейтрализующие антитела против кодируемого

антигена была четко продемонстрирована Anywaine *et al*, давая основания предположить, что вакцины на основе вектора MVA против SARS-CoV-2 могут лучше всего применяться в виде второй части гетерологичной схемы в режиме "прайм-буст". Также будет важно исследовать альтернативные схемы в режиме "прайм-буст" с использованием технологий, которые можно быстро и устойчиво масштабировать, включая схемы в режиме "прайм-буст" с гетерологичными аденовирусами.

ChAdOx1 nCoV-19 индуцировала обширный и устойчивый Т-клеточный ответ на обе субъединицы S-антигена, и наблюдаемая в данном документе функциональность Т-клеточного ответа была аналогичной по фенотипу таковым, наблюдаемым с другими аденовирусными векторами с дефицитом репликации, при этом в ответах доминировали отдельные Т-клетки, секретирующие одиночные, а не множественные цитокины. То, представляют ли индуцированные вакциной монофункциональные или полифункциональные Т-клетки большую защитную ценность, по-видимому зависит от заболевания и является неясным для инфекции, вызываемой SARS-CoV-2 и COVID-19. Анализ секреции цитокинов после пептидной стимуляции PBMC показал, что секреция IFNγ и IL2 повышалась у вакцинированных с помощью ChAdOx1 по сравнению с контрольной группой и, что важно с точки зрения безопасности, уровни IL4 и IL13 не повышались. Фенотипирование с помощью проточного цитометрического анализа показало, что ответы $CD4^+$ были смещены в сторону секреции цитокинов Th1 (IFNγ, IL2 и TNFα), а не Th2 (IL5 и IL13). Склонность, которую авторы настоящего изобретения наблюдали в отношении секреции цитокинов Th1-типа индуцированными вакциной Т-клетками, также была отмечена для других вакцин-кандидатов в клинических испытаниях с использованием различных вакцинных технологий. Важно отметить, что с помощью нескольких методологий (мультиплексное профилирование цитокинов, анализ ICS и профилирование изотипа антител) авторы настоящего изобретения демонстрируют, что вакцинация с помощью ChAdOx1 nCoV-19 индуцирует преимущественно Th1-ответ, и применение этих слегка отличающихся подходов дает возможность выделить нюансы в Т-клеточные ответах.

Важным аспектом в эпидемиологии заболевания COVID-19 была заметная разница в показателях смертности от заболевания между мужчинами и женщинами, несмотря на одинаковые коэффициенты заболеваемости. Поэтому авторы настоящего изобретения разделяли на составляющие данные по ключевым показателям иммунологических результатов в этих исследованиях и не продемонстрировали различий в величине клеточного или общего ответа антител IgG между участниками мужского и женского пола

или с увеличением возраста. Было важно продолжить анализ разделенных на составляющие данных по разным этническим группам, разным возрастным группам, а также для оценки устойчивости иммунного ответа с учетом сопутствующих заболеваний, которые могли в дальнейшем влиять на иммунитет, индуцированный вакцинами.

Хотя не существует определенных иммунных коррелятов защиты от COVID-19, общепринято, экстраполируя результаты исследований на животных, что высокие титры нейтрализующих антител с сильным цитотоксическим $CD8^+$ Т-клеточным ответом и Th1-обусловленным эффекторным ответом $CD4^+$ будут оптимальными для защитного иммунитета после воздействия SARS-CoV-2. Добавление клеточно-опосредованного компонента к вакцине, индуцирующей антитела, приемлемо в случае если иммунные корреляты заболевания неизвестны, а индуцирование цитотоксического ответа $CD8^+$ Т-клеток, как описано в данном документе, является полезным дополнением к индуцированию нейтрализующих антител. Определение точного порога и фенотипа иммунных ответов, связанных с защитой, будет важным для установления связи между популяциями и вакцинами, если бы какая-либо из этих вакцин продемонстрировала полезную эффективность против инфекции или заболевания. Подробное иммунофенотипирование индуцированного вакциной иммунитета, описанное в данном документе, демонстрирует как сильный гуморальный, так и клеточный иммунный ответы после однократной дозы, характеризующейся ответом с преобладанием Th1.

Процедуры исследования и обработка образцов

В данном документе обсуждалась полная информация об осуществлении фазы I/II рандомизированного контролируемого испытания ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222), включая протокол испытания. Это исследование было зарегистрировано в ISRCTN [15281137] и ClinicalTrials.gov [NCT04324606].

В моменты времени для иммунологических анализов образцы крови собирали как в простые, так и в гепаринизированные пробирки для сбора. Образцы обрабатывали в течение 4 часов после забора крови. Пробирки с плоским дном обрабатывали для сбора сыворотки крови. Пробирки центрифугировали при 1800 об./мин. в течение 5 минут и собирали сыворотку крови для хранения при -80°C до востребования. Пробирки с гепарином обрабатывали для сбора мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и плазмы крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Кровь декантировали в пробирки Leucosep (Greiner Bio-One), содержащие Lymphoprep (STEMCELL Technologies), и центрифугировали при 1000 x g в течение 13 минут с выключенным торможением. Фракцию плазмы крови собирали и хранили при -80°C, в то

время как оставшийся образец декантировали в свежую пробирку Falcon и добавляли доверху среду R0 (среда для культивирования клеток RPMI-1640, содержащую 1% пенициллина/стрептомицина и 2 мМ L-глютамина (все от Sigma-Aldrich). Образцы снова центрифугировали при 1800 об./мин. в течение 5 мин., сливали надосадочную жидкость и ресуспендировали клеточный осадок еще раз в R0 для промывки. После центрифугирования клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл среды R10 (RPMI-1640), содержащей 1% пенициллина/стрептомицина, 2 мМ L-глутамина и 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS, Labtech Intl.) для подсчета.

Клетки подсчитывали с использованием CasyCounter (OMNI Life Science) для использования в свежих анализах или для криоконсервации. Анализы, проведенные на свежих клетках, представляли собой окрашивание ELISPOT и только внутриклеточных цитокинов (описано ниже). Все оставшиеся клетки замораживали при концентрации 8-12 x 10^6 PBMC на мл. После центрифугирования (1800 об./мин., 5 мин.) клетки ресуспендировали в холодной FCS в половине общего объема замораживания. Клетки помещали в холодильник (2-8°C) на 20 мин., после чего добавляли равный объем холодной FCS, содержащей 20% диметилсульфоксида. Получали по 1 мл аликвот и быстро переносили в CoolCells (Corning) для замораживания при -80°C в течение ночи. Затем пробирки переносили в морозильную камеру со сверхнизкой температурой -150°C до востребования.

Образцы плазмы крови от выздоравливающих взрослых (≥ 18 лет) с ПЦР-положительной инфекцией SARS-CoV-2 получали от пациентов, поступивших в больницу, или в результате наблюдения за медицинскими работниками, все из которых были включены в клинические исследования (Желудочно-кишечные заболевания в Оксфорде: подисследование COVID [ссылка на Шеффилдский комитет по этике исследований: 16/YH/0247], Протокол клинической характеристики тяжелых возникающих инфекций ISARIC/ВОЗ [Оксфордский исследовательский комитет по этике С, ссылка 13/SC/0149] и Проект по иммунологии сепсиса [Оксфордский исследовательский комитет по этике С, ссылка 19/SC/0296]). Для каждого анализа были протестированы участники как без симптомов, так и с симптомами. Различные образцы были проанализированы для разных анализов в зависимости от наличия образцов, возможностей лаборатории и конкретных требований к анализу. Если для одного и того же участника было доступно несколько образцов в результате длительного наблюдения, то в анализ в этой статье включали только один момент времени, и при этом выбирали

самый ранний момент времени (по меньшей мере 20 дней после появления первых симптомов).

Пептиды и стимуляции

Пептиды, охватывающие всю длину последовательности шиповидного белка SARS-CoV-2, были синтезированы для использования в антигенспецифических анализах Т-клеток (Proimmune Ltd.). Всего было синтезировано 253 пептида в виде 15-меров, перекрывающихся 10 аминокислотами.

Были также синтезированы пептиды для лидерной последовательности N-концевого тканевого активатора плазминогена (tPA), которая была включена для увеличения экспрессии вакцинного антигена из аденовирусного вектора. Пептид 1 начинался с аминокислотного положения 1 и имел последовательность MFVFLVLLPLVSSQC (SEQ ID NO: 19); пептид 2 начинался с аминокислотного положения 6 и имел последовательность VLLPLVSSQCVNLTT (SEQ ID NO: 20); пептид 3 начинался с аминокислотного положения 11 и имел последовательность VSSQCVNLTTRTQLP (SEQ ID NO: 21) и так далее. Пептиды 254-258 являлись таким же образом перекрывающимися 15-мерами, но содержали последовательность из tPA. . Вкратце, для анализа проточной цитометрии Cytek™ Aurora, анализа профиля цитокинов MSD Th1/Th2 и окрашивания внутриклеточных цитокинов были созданы два отдельных пула пептидов, охватывающих субъединицы S1 (134 пептида) и S2 (119 пептидов) шиповидного белка SARS-CoV-2. Для анализа ELISPOT получали 12 пулов из 18-24 пептидов, состоящих из 6 пулов для каждой из субъединиц S1 и S2. В этот анализ включали отдельный пул (5 пептидов) лидерных последовательностей tPA. Пул 1. S1 – пептиды 1-20; пул 2: (S1) – пептиды 21-40; пул 3 – пептиды 41-62; пул 4 – пептиды 63-86; пул 5 – пептиды 87-110; пул 6 – пептиды 111-134; пул 7: S2 – пептиды 135-154; пул 8: (S2) – пептиды 155-174; пул 9 – пептиды 175-195; пул 10 – пептиды 196-215; пул 11 – пептиды 216-235; пул 12 – пептиды 236-253; пул tpa (5 пептидов – пептиды 254-258).

Проточная цитометрия, проведенная на спектральном анализаторе Cytek Aurora

Проточную цитометрию выполняли из замороженных аликвот мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) 30 доноров от дней 0, 7, 14 и 28 после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV19 (n=26). Клетки размораживали в среде, содержащей > 5 ЕД/мл бензоназы и повторно суспендировали в полной среде RPMI с добавлением 10% FCS, L-глутамина и пенициллина/стрептомицина в концентрации 2 x 10^7 клеток/мл. Высевали 2 x 10^6 PBMC на лунку в 96-луночный планшет и стимулировали синтетическими пептидами, включающими шиповидный белок SARS-CoV-2,

разделенный на два отдельных пула для субъединиц S1 и S2 (таблица S2) при конечной концентрации 2 мкг/мл, или средой в качестве контроля. Одну лунку на донора стимулировали форболом-12-миристатом-13-ацетатом и иономицином (коктейль для активации клеток, BioLegend) в качестве положительного контроля. PBMC совместно стимулировали в присутствии антител к человеческим CD28, CD49d (1 мкг/мл, Life Technologies Ltd) и CD107a-BV785 (BioLegend) в течение двух часов при 37°C с 5% CO_2, а затем инкубировали еще 16 часов после добавления 1 мкг/мл брефельдина A и монензина в каждую лунку (BioLegend).

PBMC промывали в буфере FACS (фосфатно-солевой буфер с 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 1% EDTA) и окрашивали коктейлем поверхностных антител, включая антитела к человеческим живым/инактивированным Zombie UV, CD4-AF700, CD19-Spark NIR 685, CD56-APC, CCR7-PerCP/Cy5.5, PD1-PE/Dazzle 594, CD57-PE/Cy7(BioLegend) CD8-AF405, CD45RA-SuperBright 702, CD27-PerCP eF710, CD20-AF532 (ThermoFisher Scientific) CD16-BUV495, CD3-BUV661, CD138-BUV805, NKG2A-BV480, IgM-BB515 (BD Biosciences), NKG2C-PE, KLRG1-VioBlue (Miltenyi) в буфере FACS с 10% буфера Brilliant Stain Buffer Plus (BD Biosciences). PBMC инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 минут, затем дважды промывали буфером FACS. Затем PBMC инкубировали в растворе CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) при 4°C в темноте в течение 30 минут, затем дважды промывали буфером Perm/Wash, а затем окрашивали коктейлем внутриклеточных антител, включая антитела к человеческим IFNγ-BV650, IL2-BV605 (BioLegend), IgG-BV421, TNFα-BUV395, CD69-BV750, CD71-BUV563, CD25-BV737 (BD Biosciences) Ki67-APC eF780 (ThermoFisher Scientific) в Perm/Wash. PBMC инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 минут, дважды промывали в буфере Perm/Wash, один раз в буфере FACS, затем повторно суспендировали в 200 мкл буфера FACS для регистрации на специальном спектральном анализаторе с четырьмя источниками лазерного излучения Cytek Aurora с использованием SpectroFlo v2.2 (Cytek biosciences).

Компенсацию одного флуорохрома рассчитывали на гранулах (BD Biosciences, Miltenyi) или человеческих PBMC. Анализ данных выполняли на FlowJo (v10.6.2) с помощью стратегии иерархического гейтирования (фигура S6) и Prism 8 (GraphPad). Пептид-специфические ответы рассчитывали путем вычитания нестимулированных контролей из образцов, стимулированных пептидом.

MSD – профилирование цитокинов Th1/Th2

Ответы цитокинов Th1/Th2 измеряли в надосадочных жидкостях тканевых культур от стимуляции PBMC синтетическими пептидами, покрывающими шиповидный белок.

Ресуспендировали 5 x 10^5 свежевыделенных PBMC в 250 мкл среды R10 в 96-луночных планшетах с U-образным дном и добавляли 1 мкг/мл антител к CD28 и CD49d человека. Пептиды, охватывающие субъединицы S1 и S2 шиповидного белка SARS-CoV-2 (таблица S1), добавляли в отдельные лунки в концентрации 2 мкг/мл. Каждый образец также включал нестимулированный (только среда) контроль. После 16-18-часовой инкубации при 37°C с 5% CO_2 клетки осаждали центрифугированием (1800 об./мин., 5 мин.) и собирали 200 мкл надосадочной жидкости. Надосадочные жидкости от стимуляций S1 и S2 объединяли и хранили при -80°C до востребования.

Цитокиновые ответы анализировали с использованием набора MSD (Meso Scale discovery) V-plex провоспалительных цитокинов (человека) Panel 1, валидированного MSD. Каждый планшет покрывали 9 различными захватывающими mAb к 9 различным цитокинам, расположенным в независимых пятнах на дне каждой лунки. Цитокины IFN-γ, IL1b, IL-2, IL4, IL8, IL10, IL-12p70, IL13 и TNFa были связаны с Т-клеточным ответом либо Th1, либо Th2 типа.

Надосадочные жидкости разбавляли 1:2 для нестимулированного образца и 1:10 для стимулированного S1/S2 образца с использованием разбавителя MSD 2. Набор содержал лиофилизированный калибратор с несколькими аналитами, который при восстановлении будет использовать стандартную кривую с использованием 4-кратного серийного разбавления для формирования с 8-точечной стандартной кривой, изложенной в двух экземплярах. Измерения цитокинов проводили в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты считывали на считывающем устройстве MSD в течение 15 минут после добавления буфера для считывания.

Данные анализировали с использованием программного обеспечения MSD discovery workbench 4.0. Образцы повторяли, если какой-либо образец повторялся с коэффициентом вариации (CV), составляющим более чем 20%. Повторы считывали со стандартной кривой, умножали на коэффициент разбавления и концентрацию представляли в виде среднего значения повторов в пг/мл. Концентрацию нестимулированного образца вычитали из концентрации стимулированного (фоновое вычитание). Отрицательные значения вычитания фона были заменены нулями. Произвольное значение 0,0001 добавляли к фоновым вычитаниям по всем образцам, чтобы избежать наличия нулевых значений, полученных из образцов, значения которых слишком низкие, чтобы их можно было считывать со стандартной кривой.

Стандартизированный ELISA для изотипов и подклассов

Антигенспецифический общий IgG выявляли с использованием внутреннего непрямого ELISA с использованием тримерного шиповидного белка SARS-CoV-2, как описано ранее.

Стандартизированный ELISA использовался для количественной оценки ответов циркулирующих IgG1, IgG3, IgA и IgM, специфических к шиповидному отростку SARS-CoV-2. Планшеты Nunc MaxiSorp™ ELISA (ThermoFisher Scientific) покрывали в течение ночи (≥ 16 часов) при 4□C с помощью 50 мкл на лунку 5 мкг/мл SARS-CoV-2 – полноразмерного тримерного шиповидного белка (FL-S) (The Jenner Institute, University of Oxford), разбавленного в PBS. Конструкция на основе растворимого белка FL-S SARS-CoV-2 (GenBank MN908947 Wuhan-Hu-1), кодирующая остатки 1-1213 с двумя наборами мутаций, которые стабилизировали белок в конформации до слияния (удаление сайта расщепления фурином и введение двух остатков пролина; K983P, V984P) экспрессировалась так, как описано [62]. Эндогенный вирусный сигнальный пептид сохранялся на N-конце (остатки 1-14), C-концевой домен T4-домена сборки, включенный для содействия ассоциации мономеров в тримеры, чтобы отразить естественный трансмембранный вирусный белок, и C-концевая метка His6, включенная для аффинной очистки на основе никеля. FL-S временно экспрессировался в Expi293™ (Thermo Fisher Scientific) и белок очищали из надосадочных жидкостей культур с помощью аффинности иммобилизованного металла с последующей гель-фильтрацией в забуференном Tris физиологическом растворе (TBS) с pH 7,4.

Планшеты промывали 3x с помощью PBS/Tween (0,05%) (PBS/T) и высушивали. Планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью 100 мкл на лунку казеина Blocker™ в PBS (ThermoFisher Scientific) при 20□C. Тестовые образцы разбавляли в блокирующем буфере (минимальное разбавление 1:50) и добавляли в планшет по 50 мкл на лунку в трех повторностях. Для каждого тестируемого изотипа или подкласса иммуноглобулина соответствующую эталонную сыворотку крови (полученную из пула донорской сыворотки крови с высоким титром) разбавляли в блокирующем буфере серией 2-кратных разбавлений с получением стандартной 10-точечной кривой. Были сделаны 3 независимых разбавления эталонной сыворотки крови (с коэффициентом разбавления, соответствующим 4$^{-ой}$ точке на стандартной кривой) для использования в качестве внутренних контролей. Стандартную кривую и внутренние контроли добавляли в планшет при 50 мкл на лунку в двух повторностях. Планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37□C со скоростью 300 об./мин. при встряхивании, затем промывали 3x с помощью PBS/T и высушивали. Вторичное антитело разбавляли в блокирующем буфере и добавляли по 50 мклна лунку. Используемое вторичное антитело зависело от выявляемого

подкласса или изотипа иммуноглобулина. Это были антитело мыши к человеческому IgG1 Hinge-AP, антитело мыши к человеческому IgG3 Hinge-AP, антитело козы к человеческому IgA-AP и антитело козы к человеческому IgM-AP (Southern Biotech). Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37□C со скоростью 300 об./мин. при встряхивании. Планшеты промывали 3x с помощью PBS/T и высушивали. Добавляли по 100 мкл на лунку субстрата щелочной фосфатазы PNPP (ThermoFisher Scientific) и планшеты инкубировали в течение 1-4 часов при 37□C при встряхивании со скоростью 300 об./мин. Оптическую плотность при 405 нм (OD_{405}) измеряли с использованием считывающего устройства для определения абсорбции ELx808 (BioTek) до тех пор, пока внутренний контроль не достигал OD_{405}, равной 1. Обратную величину разбавления внутреннего контроля, дающую OD_{405}, равную 1, использовали для определения значения стандарта в единице ELISA (EU). Программное обеспечение Gen5 ELISA v3.04 (BioTek) использовали для преобразования OD_{405} тестовых образцов в EU путем интерполяции из линейного диапазона стандартной кривой, соответствующей 4-параметрической логистической модели. Любым образцам с OD_{405} ниже линейного диапазона стандартной кривой при тестируемом минимальном разбавлении присваивали минимальное EU в соответствии с нижним пределом количественного определения анализа.

Изотип и подкласс OD в ELISA

Антигенспецифические ответы IgG2, IgG4 и IgE были выявлены в отсутствие антигенспецифического контроля сыворотки крови. Планшеты Nunc MaxiSorp™ ELISA (ThermoFisher Scientific) покрывали 50 мклна лунку 5 мкг/мл тримерного шиповидного белка SARS-CoV-2 (Институт Дженнера, Оксфордский университет). Планшеты также покрывали определенной концентрацией контроля в виде коммерческого человеческого иммуноглобулина: рекомбинантного человеческого IgG2-лямбда, рекомбинантного человеческого IgG4-лямбда и рекомбинантного человеческого IgE-лямбда (Bio-Rad Laboratories Ltd). Планшеты оставляли на ночь (≥ 16 часов) при 4□C. Планшеты промывали 3x с помощью PBS/Tween (0,05%) (PBS/T) и высушивали. Планшеты блокировали в течение 1 часа 100 мкл на лунку казеина Blocker™ в PBS (ThermoFisher Scientific) при 20□C. Тестовые образцы и 5 отрицательных контрольных образцов до пандемии разбавляли 1:50 в блокирующем буфере и добавляли по 50 мклв лунки, покрытые антигеном, в двух повторностях. Добавляли по 50 мклблокирующего буфера в лунки, покрытые иммуноглобулином, и в пустые лунки. Планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37□C со скоростью 300 об./мин. при встряхивании, затем промывали 3x с помощью PBS/T и высушивали. Вторичное антитело разбавляли в блокирующем

буфере и добавляли по 50 мклна лунку. Используемое вторичное антитело зависело от выявляемого подкласса или изотипа иммуноглобулина: антитела мыши к IgG2 Fd-AP человека, антитела мыши к IgG4 Fc-AP человека и антитела мыши к IgE Fc-AP человека (Southern Biotech). Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37□C со скоростью 300 об./мин. при встряхивании. Планшеты промывали 3x с помощью PBS/T и высушивали. Добавляли по 100 мкл на лунку субстрата щелочной фосфатазы PNPP (ThermoFisher Scientific) и планшеты инкубировали в течение 1-4 часов при 37□C при встряхивании со скоростью 300 об./мин. Оптическую плотность при 405 нм (OD_{405}) измеряли с использованием считывающего устройства для определения абсорбции ELx808 (BioTek) до тех пор, пока контрольный иммуноглобулин не достигал конкретной OD_{405}. Отрицательные пороговые значения рассчитывались по формуле среднее значение + 7,858*SD считываний OD_{405} образцов сыворотки крови отрицательного контроля до пандемии, где 7,858 является множителем SD с уровнем достоверности 99,9% для n=5 контролей.

ELISA для определения авидности

Авидность всех антител, специфических к IgG шиповидного отростка SARS-CoV-2, в донорской сыворотке крови оценивали с помощью ELISA с замещением тиоцианата натрия (NaSCN). Планшеты Nunc MaxiSorp™ ELISA (ThermoFisher Scientific) покрывали в течение ночи (≥ 16 часов) при 4□C с помощью 50 мкл на лунку 2 мкг/мл SARS-CoV-2 – тримерного шиповидного белка (The Jenner Institute, University of Oxford) разбавленного в PBS. Планшеты промывали 3x с помощью PBS/Tween (0,05%) (PBS/T) и высушивали. Планшеты блокировали в течение 1 часа с помощью 100 мкл на лунку казеина Blocker™ в PBS (ThermoFisher Scientific) при 20□C. Тестовые образцы и пул сыворотки крови положительного контроля авторы настоящего изобретения разбавляли в блокирующем буфере с нормализацией их до OD_{405}, равной 1, и 50 мкл на лунку добавляли в двух повторностях в каждый ряд планшета (кроме последнего ряда, где добавляли только блокирующий буфер). Планшеты инкубировали в течение 2 часов при 20□C, затем промывали 3x с помощью PBS/T и высушивали. Увеличивающиеся концентрации NaSCN (Sigma-Aldrich), разбавленного в PBS, добавляли по 50 мкл на лунку в каждый ряд вниз по планшету (1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M), за исключением первого и последнего ряда, где добавляли только PBS. Планшеты инкубировали в течение 15 минут при 20□C, затем промывали 6x с помощью PBS/T и высушивали. Антитело к IgG человека (специфическое к γ-цепи) – антитело к щелочной фосфатазе, полученное из козы (Sigma-Aldrich), разбавляли 1:1000 в блокирующем буфере и добавляли в планшет по 50 мклна лунку.

Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 20□C, затем промывали 3x с помощью PBS/T и высушивали. Добавляли по 100 мкл на лунку субстрата щелочной фосфатазы PNPP (ThermoFisher Scientific) и планшеты инкубировали при 20□C. Оптическую плотность при 405 нм (OD_{405}) измеряли с использованием считывающего устройства для определения абсорбции ELx808 (BioTek)до тех пор, пока необработанные лунки с образцами не достигали OD_{405}, равной 1 (0,8-2,0). Программное обеспечение Gen5 ELISA v3.09 (BioTek) использовали для построения графика зависимости OD_{405} тестового образца от концентрации NaSCN, и к данным подгоняли сплайн-функцию с коэффициентом сглаживания 0,001. Для каждого образца концентрация NaSCN, необходимая для снижения OD_{405} до 50% от концентрации без NaSCN (IC_{50}), интерполировалась из этой функции и сообщалась как мера авидности.

Анализы ELISpot IFNγ ex vivo

Анализы ELISpot проводили на свежевыделенных PBMC до и через 14 дней после вакцинации с помощью ChadOx1 nCoV19. Анализы проводили с использованием планшетов Multiscreen IP ELISpot (Millipore), которые покрывали в течение ночи при 4□C□ 10 мкг/мл покрывающего антитела к IFNγ человека (клон 1-D1K, Mabtech) в карбонатном буфере перед 3-кратной промывкой с помощью PBS и блокированием средой R10 в течение 2-8 часов. Добавляли по 2,5 x 10^5 PBMC в каждую лунку планшета вместе с 13 пулами пептидов, покрывающих шиповидный белок SARS-CoV-2, и N-концевую лидерную последовательность тканевого активатора плазминогена в конечной концентрации 10 мкг/мл (таблица S1). Каждый анализ проводили в трех повторностях и инкубировали в течение 16-18 часов при 37°C с 5% CO_2.

Затем планшеты проявляли путем 6-кратной промывки с помощью PBS/T с последующим добавлением в каждую лунку по 1 мкг/мл детекторного антитела к IFNγ (7-B6-1-биотин). После 2-4-часовой инкубации планшеты снова промывали и добавляли 1:1000 SA-ALP в течение 1-2 часов. После заключительной стадии промывки планшеты проявляли с использованием хромогенного субстрата BCIP NBT-plus (Moss Inc.).

Планшеты ELISpot подсчитывали с использованием автоматического счетчика AID ELISpot (AID Diagnostika GmbH, алгоритм C) с одинаковыми настройками для всех планшетов и подсчет пятен корректировали только для удаления артефактов. Ответы усредняли по тройным лункам и вычитали средний ответ нестимулированных (отрицательный контроль) лунок. Результаты выражали в виде пятнообразующих клеток (SFC)/10^6 PBMC. Ответы на пептид считались положительными, если ответы за вычетом фона составляли > 40 SFU/10^6 PBMC. Если ответы были > 80 SFC/10^6 PBMC в

отрицательном контроле (PBMC без антигена) или < 800 SFC/10^6 PBMC в лунках положительного контроля (объединенные стафилококковые энтеротоксины B при 0,02 мкг/мл и фитогемагглютинин-L при 10 мкг/мл), то результаты исключали из дальнейшего анализа.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов

Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) проводили на свежевыделенных PBMC, стимулированных объединенными пептидами S1 и S2. Ресуспендировали 3 x 10^6 PBMC в полипропиленовых пробирках FACS объемом 5 мл до объема 1 мл в среде R10 с добавлением 1 мкг/мл антител к CD28 и CD49d человека и 1 мкл CD107a PE-Cy5 (eBioscience). Пулы пептидов S1 и S2 (таблица S1) добавляли в концентрации 2 мкг/мл. Каждый образец также включал положительный контроль (стафилококковый энтеротоксин B в концентрации 1 мкг/мл, Sigma Aldrich) и нестимулированный (только среда) контроль. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO_2 в течение 16-20 часов с добавлением брефельдина A (3 мкг/мл) и монензина (2 мМ) (eBioscience) через 2 часа.

В конце инкубации клетки промывали буфером FACS (PBS, содержащим 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,01% NaN_3), и переносили в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном для окрашивания. Сначала добавляли коктейль для окрашивания поверхности, содержащий 2,5 мкл красителя Aqua Live/Dead (ThermoFisher Scientific) в разбавлении 1:40 и 1 мкл BV711 CCR7 (Biolegend) в 46,5 мкл буфера FACS. Клетки инкубировали в темноте в течение 20 минут и промывали буфером FACS. В каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) и оставляли для инкубации еще на 20 минут. Затем клетки промывали буфером Perm/Wash перед внутриклеточным окрашиванием цитокинов. Коктейль ICS содержал 0,025 мкл CD45RA BV605, 0,025 мкл TNFα PE-Cy7, 0,1 мкл IFNγ FITC, 0,025 мкл CD14 e450, 0,025 мкл CD19 e450, 0,5 мкл CD3 AF700, 1 мкл IL-2 BV650, 1,25 мкл IL-5 PE, 2,5 мкл IL-13 APC, 3,5 мкл CD4 PerCP Cy5.5 и 5 мкл CD8 APC-eF780 до общего объема 50 мкл, разбавленных в буфере FACS. Образцы окрашивали в темноте в течение 30 минут. Клетки дважды промывали буфером perm/wash и дважды буфером FACS перед ресуспендированием в 100 мкл 1% параформальдегида.

Компенсационные контроли получали свежими для каждой партии с использованием OneComp eBeads (eBioscience). Клетки хранили на льду и перед сбором процеживали через фильтр 35 мкм. Клетки получали на проточном цитометре BD LSRFortessa с 5 источниками лазерного излучения (BD Biosciences) и данные анализировали в FlowJo v10.7. Для анализа образцов применяли стратегию иерархического гейтирования (фигура

S7). Процесс контроля качества применяли для удаления образцов с менее чем 100000 явлений в живом $CD3^+$ гейте, образцы с < 1% цитокинового ответа на SEB ($CD4^+$ и $CD8^+$ IFNγ, $CD8^+$ TNFα). Использовали нижний предел выявления и в анализ включали только образцы с ответом ELISPOT выше чем 200 SFC/10^6 PBMC).

Статистический анализ

Все статистические тесты, а также все графические представления данных выполняли в GraphPad Prism 8 (за исключением диаграммы рассеяния матрицы корреляции, которая была создана в SPSS Statistics 25). Для проверки нормальности данных рассчитывали критерий Дагостино-Пирсона. Описательное сравнение уровней изотипа/подкласса иммуноглобулина, используемых медиан с межквартильными диапазонами (IQR); изменение кратности авидности IgG по среднему значению и стандартному отклонению (SD). Непарные выборки сравнивали с использованием двустороннего U-критерия Манна-Уитни или непарного t-критерия в зависимости от распределения данных. Корреляции анализировали с помощью рангового критерия Спирмена.

Пример 19. Экспрессия шиповидного гликопротеина SARS-CoV-2, подобного естественному, с помощью ChAdOx1 nCoV-19

Клетки HeLa S3 инфицировали ChAdOx1 nCoV-19 и инкубировали либо с рекомбинантным ACE2, либо с антителом к ChAdOx1 nCoV-19 (полученным от вакцинированных мышей), сравнивали с неинфицированным контролем и анализировали с помощью проточной цитометрии. С использованием проточной цитометрии наблюдали, что ChAdOx1 nCoV-19 продуцирует ассоциированный с мембраной S-гликопротеин SARS-CoV-2 в естественных конформациях, способный связывать рецептор хозяина ACE2.

Томограммы показали, что поверхность клеток плотно покрыта выступающими уплотнениями, соответствующими размеру и форме конформации S-белка SARS-CoV-2 до слияния (фиг. 45A и 45B). Эти плотности отсутствовали в контрольных неинфицированных клетках. Низкотемпературное иммуномечение с использованием сыворотки крови мышей, вакцинированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19, подтверждает наличие большого количества S-белка на поверхности клеток. Авторы настоящего изобретения выполнили усреднение субтомограммы 3274 шиповидных отростков с поверхностей клеток с помощью emClarity. Карта усредненной плотности имела разрешение 9,6 Å (при пороге отсечения 0,143 FSC), четко разрешая общую структуру шиповидного отростка, которая очень хорошо перекрывается с атомными моделями шиповидного отростка до слияния в литературе (фиг. 45C и 45D). Усреднение

субтомограмм в сочетании с цитометрическим анализом и низкотемпературным иммуномечением однозначно подтверждает, что большинство шиповидных белков на поверхности представлено в состоянии до слияния.

Во всем белке наблюдались высокие уровни занятости гликаном. Это особенно важно, поскольку известно, что гликаны экранируют более иммуногенные белковые эпитопы, поэтому вектор по настоящему изобретению не содержит эпитопов, которые не присутствуют во время естественной инфекции, что могло бы отвлечь иммунную систему от доступных нейтрализующих эпитопов.

С использованием низкотемпературной EM-структуры тримерного S-белка SARS-CoV-2, авторы настоящего изобретения нанесли на карту статус гликозилирования белка S1/S2 (фиг. 46C). Наблюдалась смесь олигоманнозных/гибридных и комплексных участков с гликановыми участками, такими как N234, которые, как известно, оказывают стабилизирующие эффекты в отношении RBD, сохраняя преимущественно олигоманнозное состояние, о котором сообщалось как в рекомбинантных белках, так и в вирусах. Точно так же было определено, что гликан в положении N165, который также стабилизировал "верхнюю" конформацию RBD, относится к сложному типу в S-белке, возникающем в результате инфицирования клеток ChAdOx1 nCoV19. Поскольку гликаны являются чувствительными репортерами локальной белковой архитектуры, то обнадеживает тот факт, что такие гликаны, о которых известно, что они играют структурные роли, сохраняют свое состояние процессинга, что предусматривает дополнительные доказательства естественной структуры белка до слияния.

Краткое описание примера 19: традиционно многие вакцины-кандидаты включают стабилизирующие мутации в S-белке, так что белок сохраняет конформацию до слияния и предотвращает отделение S1. Напротив, вирусный вектор по настоящему изобретению не содержит стабилизирующие мутации в белке S.

Данный пример подтверждает структуру, гликозилирование и антигенность белка S, экспрессируемого из вирусного вектора ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222. Авторы настоящего изобретения демонстрируют естественный посттрансляционный процессинг и сборку и выявляют экспрессию S-белков на поверхности клеток, принимающих тримерную конформацию до слияния, что особенно выгодно, поскольку большинство нейтрализующих антител нацелены на эпитопы, представленные на шиповидном отростке до слияния. Авторы настоящего изобретения демонстрируют естественную мимикрию функциональности связывания S-белка SARS-CoV-2 с рецептором, структуру до слияния и процессинг модификаций гликанов. Неожиданным преимуществом является то, что эти

важные естественные свойства экспрессированного S-белка достигаются без использования стабилизирующих мутаций.

Пример 20. Субъекты в возрасте

Авторы изобретения продемонстрировали, что однократная доза ChAdOx1 nCoV-19 вызывала B- и T-клеточный ответ у 3-месячных взрослых мышей с образованием плазматических клеток, зародышевых центров и фолликулярных T-хелперных клеток, способствующих выработке антител к шиповидному отростку. Развитие гуморального иммунитета дополнялось образованием полифункциональных специфических к вакцине клеток Th1 и $CD8^+$ T-клеток. У 22-месячных мышей однократная доза ChAdOx1 nCoV-19 индуцировала образование клеток Th1, реакционноспособных в отношении вакцины $CD8^+$ T-клеток, ответ зародышевого центра и специфических к вакцине антител. Однако клеточный и гуморальный ответы был снижены по величине у 22-месячных мышей по сравнению с 3-месячными взрослыми мышами, при этом продуцируемые изотипы и подклассы антител имели аналогичный профиль. Введение второй дозы усиливало ответ клеток зародышевого центра и титр антител у мышей в возрасте, а также повышало количество $CD8^+$ T-клеток, вырабатывающих гранзим B. В совокупности это указывало на то, что иммуногенность ChAdOx1 nCoV-19 могла повышаться у пожилых индивидуумов за счет использования стратегии вакцинации с примированием/бустингом.

Внутримышечная иммунизация приводила к дренированию антигена в aLN и селезенке, что приводило в результате к активации антигенпрезентирующих клеток в обоих компартментах при иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 у мышей, продемонстрированной путем изучения конфокальных изображений иммунофлуоресценции экспрессии DAPI и локализации FluoSpheres™ (505/515) в aLN и селезенке мышей, иммунизированных с помощью желто-зеленых флуоресцентных FluoSpheres™ или PBS через 24 ч. после внутримышечной иммунизации.

ChAdOx1 nCoV-19 индуцировал ответ плазматических клеток и B-клеток зародышевого центра, как показано с помощью анализов tSNE/FlowSOM $CD19^+$ B-клеток трехмесячных (3 мес.) мышей через семь дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS.

ChAdOx1 nCoV-19 индуцировал ответ CD4 клеток с преобладанием Th1, как показано с помощью анализов tSNE/FlowSOM $CD4^+$ T-клеток трехмесячных (3 мес.) мышей через семь дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS.

ChAdOx1 nCoV-19 индуцировал ответ CD8 Т-клеток, как показано с помощью анализов tSNE/FlowSOM $CD8^+$ Т-клеток трехмесячных (3 мес.) мышей через семь дней после иммунизации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 или PBS.

Стратегия примирования/бустинга корректировала примирование CD8 Т-клеток с нарушенной регуляцией у мышей в возрасте

Для оценки $CD8^+$ Т-клеточного ответа на иммунизацию с помощью ChAdOx1 nCoV-19 в контексте старения, авторы изобретения иммунизировали 3-месячных и 22-месячных мышей и подсчитали типы $CD8^+$ Т-клеток, измененные вакцинацией (на фиг. 4) через девять дней после иммунизации (**фиг. 47a**). В дренирующем aLN $CD8^+$ Т-клетки мышей в возрасте экспрессировали маркеры активации и пролиферации в ответ на ChAdOx1 nCoV-19. Однако количество клеток $CXCR3^+$ или Т-эффекторных клеток памяти не увеличивалось у мышей в возрасте по сравнению с количеством в группе, вакцинированной PBS, как это наблюдалось у молодых мышей (**фиг. 47b-d**). В этот ранний момент времени число Т-клеток центральной памяти не изменялось ни у молодых мышей, ни у мышей в возрасте после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 (**фиг. 47e**). В селезенке у мышей в возрасте после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 наблюдалось меньше $Ki67^+$ $CD8^+$ Т-клеток по сравнению с более молодыми взрослыми мышами (**фиг. 47f**). Образование антигенспецифических $CD8^+$ Т-клеток оценивали путем повторного стимулирования спленоцитов пулами пептидов шиповидных белков SARS-CoV-2. Мыши в возрасте имели резкий дефект в $CD8^+$ Т-клетках, вырабатывающих гранзим B, однако выработка IFNγ и TNFα не была существенно нарушена по сравнению с более молодыми мышами (**фиг. 47g**). Выработка IL-2 была низкой как у взрослых мышей, так и у мышей в возрасте в данный момент времени (**фиг. 47g**). Несмотря на тенденцию к снижению выработки цитокинов $CD8^+$ Т-клетками у мышей в возрасте доля полифункциональных $CD8^+$ Т-клеток у мышей в возрасте существенно не уменьшалась после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 (**фиг. 47h**). Это демонстрирует, что однократная доза ChAdOx1 nCoV-19 индуцировала измененный $CD8^+$ Т-клеточный ответ у мышей в возрасте, характеризующийся неспособностью образовывать эффекторные клетки, вырабатывающие гранзим B.

Чтобы определить, могла ли вторая доза улучшить этот ответ, авторы изобретения вводили бустерную дозу ChAdOx1 nCoV-19 через один месяц после примирующей иммунизации (**фиг. 47i**). Через девять дней после бустинга увеличение количества $Ki67^+$ CD4 Т-клеток не наблюдалось в дренирующем aLN (**фиг. 47j**), возможно из-за того, что кинетика вторичного ответа изменялась быстрее, чем у первичного. Значительное

увеличение количества CXCR3$^+$ CD8$^+$ Т-клеток и эффекторных клеток памяти наблюдалось у мышей в возрасте после бустинга, без изменения доли центральных клеток памяти в любой из возрастных групп (**фиг. 47k-m**). Оценка антигенспецифических спленоцитов показала, что стимулирующая доза ChAdOx1 nCoV-19 восстанавливала выработку гранзима B, вырабатывающегося CD8$^+$ Т-клетками, у мышей в возрасте (**фиг. 47n**). Выработка IFNγ и полифункциональность цитокинов были аналогичны таковым после примирующей иммунизации (**фиг. 47 o, p**). Это продемонстрировало то, что ChAdOx1 nCoV-19 является иммуногенным у мышей в возрасте, а бустерная доза может исправлять возрастной дефект образования B-продуцирующегося гранзима, CXCR3$^+$ и TEM CD8$^+$ Т-клеток.

Примирование/бустинг усиливает ответ CD4$^+$ Т-клеток на ChAdOx1 nCoV-19 у мышей в возрасте

Через девять дней после примирующей иммунизации мышей в возрасте (**фиг. 48 a**) увеличение количества Ki67$^+$CD4$^+$ Т-клеток и CXCR3-экспрессирующих Th1-клеток наблюдали в дренирующем лимфатическом узле мышей, иммунизированных с помощью ChAdOx1 nCoV-19 (**фиг. 48 b, c**). Это сопровождалось увеличением количества Th1-подобных Treg как у взрослых мышей, так и у мышей в возрасте **(фиг. 48 d**). Повышенная частота этих типов клеток также наблюдалась в селезенке в ответ на иммунизацию с помощью ChAdOx1 nCoV-19 как у взрослых мышей, так и у мышей возрасте (**фиг. 48 e-g**). Примечательно, что по этим измерениям ответ мышей в возрасте сравним с ответом у молодых взрослых. Антигенспецифический ответ CD4$^+$ Т-клеток оценивали путем повторного стимулирования спленоцитов пулами пептидов шиповидных белков SARS-CoV-2. Как и у молодых мышей в ответе мышей в возрасте на ChAdOx1 nCoV-19 доминировал Th1, однако у мышей в возрасте через девять дней после однократной иммунизации было меньше клеток, вырабатывающих цитокины (**фиг 48 h, i**).

Бустерная доза ChAdOx1 nCoV-19, введенная через месяц после примирования (**фиг. 48 j**), стимулировала экспрессию Ki67 и образование CXCR3$^+$CD44$^+$ Th1-клеток, но не CXCR3$^+$ Th1-подобных Treg-клеток в дренирующем лимфатическом узле у мышей в возрасте (**фиг. 48 k-m**). В селезенке бустерная доза не усиливала Ki67$^+$ CD4$^+$ Т-клетки или образование обычных или регуляторных CXCR3$^+$ Т-клеток у взрослых мышей или мышей в возрасте (**фиг. 48 n-p**). В отличие от ответа на примирующую иммунизацию число клеток, вырабатывающих антигенспецифические цитокины, было сопоставимо у взрослых мышей и мышей в возрасте после бустерной иммунизации (**фиг. 48 q, r**). В совокупности это указывало на то, что ответ CD4$^+$ Т-клеток на иммунизацию с помощью ChAdOx1

nCoV-19 в значительной степени сохранялся у мышей в возрасте с небольшим недостатком выработки антигенспецифических цитокинов, который мог быть усилен бустерной иммунизацией.

Мыши в возрасте характеризовались нарушенным ответом клеток зародышевого центра после примирующей иммунизации

Считается, что большинство вакцин, имеющихся в настоящее время в клинической практике, обеспечивают защиту, вызывая гуморальный иммунитет, поэтому важно количественно оценить ответ В-клеток на вакцинацию с помощью ChAdOx1 nCoV-19 в контексте старения. Ранняя выработка антител после вакцинации возникает из-за клеток, секретирующих антитела, образующихся в результате ответа экстрафолликулярных плазматических клеток, который является быстрым, но обычно недолговечным. Сравнимый ранний ответ плазматических клеток выявляли в аВН молодых взрослых мышей и мышей в возрасте после иммунизации (**фиг. 49 a, b**), хотя наблюдалось увеличение доли непереключаемых классов IgM^+ плазматических клеток у мышей в возрасте (**фиг. 49 c**). Ответ интактных плазматических клеток сочетался с увеличением количества сывороточных антител через девять дней после иммунизации, которые имели лишь немного более низкий титр у мышей в возрасте и сходное распределение подклассов IgG с более молодыми животными, опять таки ответ с преобладанием Th1 (**фиг. 49 d-f**).

Долгоживущие клетки, секретирующие антитела, обычно возникают в результате ответа клеток зародышевого центра. Процентное значение, но не общее число В-клеток зародышевого центра было снижено у мышей в возрасте по сравнению с более молодыми взрослыми мышами после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19 (**фиг. 49 g, h**). Подобно ответу плазматических клеток, у мышей в возрасте было больше непереключаемых IgM^+ В-клеток зародышевого центра (**фиг. 49 i**). Увеличение количества фолликулярных Т-хелперных клеток, но не фолликулярных регуляторных Т-клеток, сопровождало ответ клеток зародышевого центра лимфатических узлов у взрослых мышей и мышей в возрасте (**фиг. 49 j, k**). В селезенке зародышевые центры легко визуализировались под микроскопом у взрослых мышей через девять дней после вакцинации с помощью ChAdOx1 nCoV-19, но заметно отсутствовали у мышей в возрасте (**фиг. 49 l**). Количественная оценка зародышевых центров в селезенке с помощью проточной цитометрии подтвердила нарушение образования зародышевых центров у мышей в возрасте (**фиг. 49 n, o**). Это сопровождалось меньшим количеством пролиферирующих В-клеток, не принадлежащих к зародышевому центру, и фолликулярных Т-хелперных клеток у мышей в возрасте (**фиг. 49 p, q**). Как и в

дренирующем лимфатическом узле, селезеночные фолликулярные регуляторные Т-клетки не индуцировались вакцинацией с помощью ChAdOx1 nCoV-19 в данный момент времени (**фиг. 49 r**). Влияние нарушения ответа клеток зародышевого центра на специфические к вакцине антитела наблюдалось через 28 дней после иммунизации, при этом у мышей в возрасте были более низкие титры антител IgM и IgG к шиповидному отростку (**фиг. 49 s, t**), однако аналогичный профиль подклассов IgG (**фиг. 49 u**). В совокупности эти данные указывают на то, что хотя однократная доза ChAdOx1 nCoV-19 могла индуцировать сопоставимые ответы экстрафолликулярных плазматических клеток у молодых мышей и мышей в возрасте, ответ клеток зародышевого центра ухудшался с возрастом.

Вторая доза ChAdOx1 nCoV-19 повышала гуморальный иммунитет у мышей в возрасте

Чтобы проверить, могла ли стратегия примирования/бустинга усиливать ответ В-клеток у мышей в возрасте, применяли подход с примированием/бустингом (**фиг. 50a**). Через девять дней после бустинга в дренирующих лимфатических узлах мышей в возрасте были $Ki67^+$ энтеральные В-клетки, не принадлежащие к зародышевому центру, плазматические клетки и В-клетки зародышевого центра (**фиг. 50b-h**). Примечательно, что величина ответа клеток зародышевого центра была выше у мышей в возрасте, чем у более молодых взрослых мышей после бустинга (**фиг. 50f-h**), и это было ассоциировано с увеличением количества фолликулярных Т-хелперных и фолликулярных регуляторных Т-клеток (**фиг. 50 i, j**). Ответ клеток зародышевого центра не наблюдался в селезенке ни взрослых, ни мышей в возрасте через девять дней после бустерной иммунизации (**фиг. 50 k**). Это демонстрировало то, что вторая доза ChAdOx1 nCoV-19 могла усиливать В-клеточный ответ у мышей в возрасте. Это улучшение В-клеточного ответа соответствовало увеличению количества антител IgG к шиповидному отростку, но не IgM, у каждой мыши в возрасте, которой проводили бустерную иммунизацию, без сдвига изотипов IgG. Соотношение IgG_2 после бустинга IgG_1 составляло 2:1 как у молодых взрослых, так и у мышей в возрасте (**фиг. 50 l-o**). Функциональный эффект гуморального иммунитета после примирующей и бустерной иммунизаций измеряли с помощью анализа микронейтрализации псевдотипированного вируса SARS-CoV-2. Через девять дней после примирующей иммунизации уровни нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у мышей в возрасте были ниже, чем у взрослых мышей (**фиг 50 p**). Через девять дней после бустинга нейтрализующие антитела были выявляемыми у всех мышей в возрасте, и их количество было увеличено в восемь раз после примирования по сравнению с количеством, выявленным ранее, хотя титр был значительно ниже, чем у более молодых взрослых

мышей (**фиг 50 q**). Это демонстрирует, что стимулирующая доза ChAdOx1 nCoV-19 может улучшать индуцированный вакциной гуморальный иммунитет у мышей старшего возраста.

Содержание и разведение мышей

Мышей C57BL/6Babr разводили, состаривали и содержали в Отделении биологического обеспечения Института Бэбрахама (BSU). Первичные патогены или дополнительные средства, перечисленные в рекомендациях FELASA[62], не были выявлены во время осуществления контроля состояния здоровья в помещениях для содержания животных. Температура окружающей среды составляла ~19-21°C, относительная влажность 52%. Освещение обеспечивалось при цикле 12 ч. свет: 12 ч. темнота, включая 15 мин. периоды "рассвета" и "сумерек" с приглушенным освещением. После отнятия мышей переводили в индивидуально вентилируемые клетки по 1-5 мышей на клетку. Мышей кормили рационом CRM (P) VP (Special Diet Services) ad libitum и они получали семена (например, подсолнуха, проса) во время очистки клеток как часть обогащения их окружающей среды. Все эксперименты на мышах были одобрены Органом по защите животных и этике Института Бэбрахама. Условия содержания животных и эксперименты соответствовали действующему законодательству Европейского Союза и министерства внутренних дел Соединенного Королевства, а также местным стандартам (PPL: P4D4AF812). На момент начала экспериментов молодым мышам было 10-12 недель, а мышам в возрасте — 93-96 недель. Мышей с опухолями, которые могли встречаться у мышей в возрасте, исключали из анализа.

Иммунизация и сбор образцов тканей

Мышей иммунизировали в правую четырехглавую мышцу бедра по 50 мкл либо 6 x 10^9 вирионов ChAdOx1 nCoV-19 в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) только PBS, либо 0,02 мкм желто-зеленых флуоресцентных карбоксилат-модифицированных микросфер (Invitrogen № F8787) в забуференном фосфатом физиологическом растворе. В указанные моменты времени после вакцинации брали для анализа кровь, правый аортальный лимфатический узел, селезенку и правую четырехглавую мышцу бедра.

Ферментный иммуносорбентный анализ

Для выявления в сыворотке крови антител, специфических к белку FL-S SARS-CoV-2, выполняли стандартизированный ELISA. Планшеты MaxiSorp (Nunc) покрывали с помощью 100 или 250 нг/лунка белка FL-S в течение ночи при 4°C для выявления IgG или IgM и IgA соответственно перед промыванием в PBS/Tween (0,05% об./об.) и

блокированием с помощью блокирующего казеина в PBS (Thermo Fisher Scientific) в течение 1 ч. при комнатной температуре (к. т.). Стандартную положительную сыворотку крови (пул мышиной сыворотки крови с высоким конечным титром против белка FL-S), отдельные образцы мышиной сыворотки крови, отрицательный и внутренний контроль (разбавленный казеином) инкубировали в течение 2 ч. при к. т. для выявления специфического IgG или в течение 1 ч. при 37°C для выявления специфических IgM или IgA. После промывания связанные антитела выявляли добавлением AP-конъюгированного антитела козы к IgG мыши (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч. при к. т. или добавлением AP-конъюгированного антитела козы к IgM или IgA мыши (Abcam и Sigma-Aldrich соответственно) и добавлением субстрата pNPP (Sigma-Aldrich). Произвольное число единиц ELISA относили к эталонному пулу, и значения OD каждого разбавления аппроксимировали к 4-параметрической логистической кривой с использованием программного обеспечения SOFTmax PRO. Единицы ELISA рассчитывали для каждого образца с использованием значений OD образца и параметров стандартной кривой.

ELISA подкласса IgG выполняли в соответствии с протоколом, описанным для выявления специфических IgM или IgA в сыворотке крови. Кроме того, все образцы сыворотки крови разбавляли до 1 единицы ELISA общего IgG, а затем выявляли с помощью вторичных антител, специфичных к подклассу IgG мыши (Southern Biotech или Abcam). Результаты ELISA подкласса IgG представлены с использованием значений OD вместо единиц ELISA, используемых для ELISA общего IgG.

Тест микронейтрализации с использованием псевдотипов на основе лентивирусов, несущих шиповидный отросток SARS-CoV-2

Псевдотипированные вирусы SARS-CoV-2 на основе лентивирусов были созданы в клетках HEK293T, инкубированных при 37°C, 5% CO_2, как описано ранее (Graham, S.P. *et al.* Evaluation of the immunogenicity of prime-boost vaccination with the replication-deficient viral vectored COVID-19 vaccine candidate ChAdOx1 nCoV-19. *npj Vaccines* **5** (2020)). Вкратце, клетки высевали с плотностью 7,5 x 10^5 в 6-луночные чашки перед трансфекцией плазмидами следующим образом: 500 нг шиповидного отростка SARS-CoV-2, 600 нг p8.91 (кодирующего gag-pol ВИЧ-1), 600 нг CSFLW (каркас лентивируса, экспрессирующего репортерный ген люциферазы светлячка) в Opti-MEM (Gibco) вместе с 10 мкл PEI (1 мкг/мл) реагента для трансфекции. Также был установлен контроль "без гликопротеина" с использованием вектора pcDNA3.1 вместо плазмиды, экспрессирующей SARS-CoV-2 S. На следующий день смесь для трансфекции заменяли 3 мл DMEM с 10% FBS (DMEM-10%) и инкубировали в течение 48 и 72 часов, после чего супернатанты,

содержащие псевдотипированный SARS-CoV-2 (pps SARS-CoV-2), собирали, объединяли и центрифугировали при 1300 x *g* в течение 10 минут при 4°C для удаления клеточного дебриса. Клетки-мишени HEK293T, предварительно трансфицированные 500 нг человеческой экспрессионной плазмиды ACE2 (Addgene, Кембридж, Массачусетс, США), высевали при плотности 2 x 10^4 в 100 мкл DMEM-10% в белый плоскодонный 96-луночный планшет за день до сбора SARS-CoV-2 pps. На следующий день pps SARS-CoV-2 титровали 10-кратно в клетках-мишенях, а остаток хранили при -80°C. Для тестов микронейтрализации сыворотку крови мышей разбавляли 1:20 в бессывороточной среде, 50 мкл добавляли в 96-луночный планшет в трех повторностях и титровали 2-кратно. Фиксированный оттитрованный объем pps SARS-CoV-2 добавляли в разбавлении, эквивалентном 10^5 единиц сигнальной люциферазы, в 50 мкл DMEM-10% и инкубировали с сывороткой крови в течение 1 часа при 37°C, 5% CO_2 (что давало конечное разбавление сыворотки крови 1:40). Затем добавляли клетки-мишени, экспрессирующие человеческий ACE2, с плотностью 2 *x* 10^4 в 100 мкл и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 72 часов. Затем активность люциферазы светлячка измеряли с помощью реагента люциферазы BrightGlo и системы выявления Glomax-Multi$^+$ (Promega, Саутгемптон, Великобритания). Титры нейтрализации псевдовируса выражали в виде обратной величины разбавления сыворотки крови, которое ингибировало экспрессию люциферазы на 50% (IC_{50}).

Статистические методики

Все эксперименты выполняли дважды или трижды по 3-8 мышей на группу. Сначала данные тестировали в отношении гауссова распределения с использованием теста Шапиро-Уилка. Затем данные, соответствующие нормальному распределению, анализировали либо с помощью t-критерия Стьюдента для сравнения двух наборов данных, либо с помощью одностороннего теста ANOVA для данных с несколькими группами. Если данные не следовали нормальному распределению, то для сравнения двух наборов данных использовался критерий Манна-Уитни, а для множественных сравнений – критерий Крускала-Уоллиса. Все показанные p-значения скорректированы для множественных сравнений, когда несколько тестов проводились на одних и тех же данных. Анализы выполняли в программном обеспечении Prism v8 (GraphPad).

Краткое описание примера 20: представленная в данном документе работа продемонстрировала, что одна доза вектора, такого как ChAdOx1 nCoV-19, являлась иммуногенной для мышей в возрасте, но этот ответ может быть значительно улучшен с помощью второй (бустерной) дозы. Учитывая, что вторая доза ChAdOx1 nCoV-19

являлась иммуногенной с ожидаемым профилем реактогенности для людей, это мола быть жизнеспособная стратегия для повышения иммуногенности и возможно эффективности у пожилых людей.

Пример 21. Эффект в отношении отделения вируса

Хорьки являются восприимчивыми к заражению SARS-CoV-2. После интраназального воздействия SARS-CoV-2 на хорьков животные заражаются и выделяют вирус, выявленный с помощью ПЦР в реальном времени в течение как минимум 9 дней. Модель на хорьках считается моделью инфекции для бессимптомных или легких инфекций у человека и эффективным способом определения эффективности вакцин-кандидатов путем оценки снижения отделения вируса после воздействия вируса. В данном исследовании, проведенном CSIRO, оценивалась эффективность вирусного вектора по настоящему изобретению (ChAdOx1 nCoV-19) против SARS-CoV-2 в модели заражения у хорьков. Композицию на основе ChAdOx1 nCoV-19 оценивали двумя различными путями введения (интраназальным и внутримышечным) с хорьками, получавшими либо одну, либо две дозы композиции. Количество дозы составляло дозу из 2,5 x 10^{10} вирусных частиц на хорька в 100 мкл PBS.

Тестовая система

Использовались беспородные хорьки, предварительно вакцинированные против вируса чумы плотоядных (собачья вакцина Protech C3; 2 дозы), поскольку они восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2. В качестве контрольного инокулята в данном исследовании использовали SARS-CoV-2 – BetaCoV/Australia/VIC01/2020; № партии 2002-03-1628. Выращивание и определение характеристик этого инокулята для контрольного заражения выполнялись CSIRO.

План исследования

Это было рандомизированное плацебо-контролируемое исследование, в котором оценивали вакцину ChAdOx1 nCoV-19 по сравнению с контролем (PBS, плацебо). Вакцину оценивали двумя различными путями введения: интраназальным (IN) и внутримышечным (IM). Исследование проводили согласно блочному проекту с двумя когортами по 20 животных (всего 40 животных, 20 самцов и 20 самок). Схема дозирования указана в таблице ниже.

Исследуемая когорта	**Исследуемая группа**	**Число хорьков (пол**	**Исследуемые объекты**	**День 0**	**День 28**	**Заражение вирусом[1]**	**Окончание исследования[2]**
1	1	8 (4M и 4F)	IM введение вакцины ChAdOx1 nCoV-19	Да	Нет	День 28 SARS-CoV-2 3 x 10^4 TCID50 в 0,5 мл Объем	День 42
	2	8 (4M и 4F)	IN введение вакцины ChAdOx1 nCoV-19	Да	Нет		
	4	4 (2M и 2F)	Эталонный объект 1,0 мл PBS	Да	Нет		
2	5	8 (4M и 4F)	IM введение вакцины ChAdOx1 nCoV-19	Да	Да	День 56 SARS-CoV-2 3 x 10^4 TCID50 в 0,5 мл Объем	День 70
	6	8 (4M и 4F)	IN введение вакцины ChAdOx1 nCoV-19	Да	Да		
	8	4 (2M и 2F)	Эталонный объект 1,0 мл PBS	Да	Да		

Примечания.

[1] Целевая доза заражения на основе охарактеризованного титра исходного раствора для заражения вирусом

[2] Окончание исследования — через 14 дней после заражения.

При заражении (группа 1 — день 28; группа 2 — день 56) всем хорькам интраназально вводили целевую дозу 3 x 10^4, 50% инфекционной дозы тканевой культуры (TCID50) SARS-CoV-2.

После контрольного заражения хорьков наблюдали в отношении появления и прогрессирования заболевания, при этом у всех хорьков собирали образцы в когорте 1 в дни 31, 33, 35, 37 и 39 и в когорте 2 в дни 59, 61, 63, 65 и 67.

В день 42 (когорта 1) или на день 70 (когорта 2) у хорьков собирали образцы крови и выделения, а затем между днями 43-45 (когорта 1) или днями 71-73 (когорта 2) хорьков гуманно умерщвляли и брали ряд образцов для анализа, собранных при вскрытии.

Определение нагрузки вирусной РНК в образцах

Нагрузку вирусной РНК определяли для всех образцов тканей, образцов назальных мазков и смывов после выделения РНК и анализа с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR) с тестированием на выявление РНК SARS-CoV-2, выполненным в дублирующих реакциях. Последовательности праймеров и зондов для анализа qRT-PCR на коронавирус приведены в таблице ниже.

Название праймера/зонда	**Последовательность**
Прямой CoV E (SEQ ID NO:	5'- AGTACGAACTTATGTACTCATTCGTT -3'
Обратн. CoV E (SEQ ID NO:	5'- ATATTGCAGCAGTACGCACACA -3'
Зонд CoV (SEQ ID NO: 24)	5'- 6FAM ACA CTA GCC ATC CTT CG MGBNFQ -

Числа копий для отдельных образцов рассчитывали с использованием пороговых значений циклов (CT) в виде копий гена E SARS-CoV-2 на мл или на г с помощью уравнения, полученного из данных стандартной кривой с использованием стандарта синтетической ДНК известной концентрации числа копий.

Определение инфекционной вирусной нагрузки в образцах

Протестированные образцы, давшие положительный результат в qRT-PCR со значением CT менее чем 35, дополнительно анализировали с помощью TCID50.

Тестирование с помощью qRT-PCR образцов назальных мазков и смывов

Все образцы назальных смывов и мазков, собранные во время сбора образцов перед заражением (день 24 – когорта 1; день 52 –

когорта 2) имели невыявляемые уровни РНК CoV E, как было протестировано с помощью qRT-PCR (QA/23-2-43). Числа копий РНК

(Log10 копий CoV E/мл) для каждого образца, собранного после заражения, показаны на фигуре 8 фигуре 11 для

дней 3, 5, 7, 9 после заражения (дни 31, 33, 35 и 37 – когорта 1; дни 59, 62, 63 и 65 – когорта 2).

В дни 11 или 14 ни у одного хорька не было выявлено выделение вируса (дни 39 и 42 – когорта 1; дни 67 и 70 – когорта 2).

Статистический анализ проводили для каждой из групп исследования по сравнению с объединенными в пул контролями (группы исследования 4 и 8). Значения P для непарных t-критериев перечислены в таблице ниже: статистическая значимость вирусной РНК в группах исследования по сравнению с объединенными контрольными группами.

Назальный смыв				
День после заражения	Группа исследования			
	Группа 1 – IM только	Группа 5 – IM примирование и	Группа 2 – IN только	Группа 6 – IN примирование и
День 3	0,5368	0,2898	0,3165	**0,0292**
День 5	0,1034	**0,0247**	0,3199	**0,0036**
День 7	**0,0282**	**0,0156**	**0,0149**	**0,0097**
День 9	0,1379	0,1676	0,1379	0,1379
Мазок со слизистой оболочки полости рта				
День после заражения	Группа исследования			
	Группа 1 – IM только	Группа 5 – IM примирование и	Группа 2 – IN только	Группа 6 – IN примирование и
День 3	**0,0275**	0,1072	**0,0438**	**0,0116**
День 5	**0,0189**	**0,0118**	0,2230	**0,0071**
День 7	0,2643	0,2997	0,2643	0,2643
День 9	0,2643	0,2997	0,2643	0,2643
Примечания. Значения p, выделенные жирным шрифтом, представляют собой статистическую значимость в непарном t-критерии ($p < 0,05$).				

На фигуре 51 показаны столбчатые диаграммы вирусной нагрузки в жидкостях назального смыва, а также ректальных и оральных мазках, измеренной с помощью количественной RT-PCR в день 3 после заражения (день 31 исследования — когорта 1 или 59 — когорта 2).

На фигуре 52 показаны столбчатые диаграммы вирусной нагрузки в жидкостях назального смыва, а также ректальных и оральных мазках, измеренной с помощью количественной RT-PCR в день 5 после заражения (день 33 исследования — когорта 1 или 61 — когорта 2).

На фигуре 53 показаны столбчатые диаграммы вирусной нагрузки в жидкостях назального смыва, а также ректальных и оральных мазках, измеренной с помощью количественной RT-PCR в день 7 после заражения (день 35 исследования — когорта 1 или 63 — когорта 2).

На фигуре 54 показаны столбчатые диаграммы вирусной нагрузки в жидкостях назального смыва, а также ректальных и оральных мазках, измеренной с помощью количественной RT-PCR в день 9 после заражения (день 37 исследования — когорта 1 или 65 — когорта 2).

Примечания к фигурам 51-54. РНК извлекали из образцов, проанализированных в двух экземплярах с использованием анализа qRT-PCR, выявляющего РНК CoV E. Черные точки представляют средний титр повторных реакций для отдельных хорьков, столбцы – средние титры для каждой группы, столбцы ошибок – стандартную ошибку среднего, а пунктирные линии – предел выявления анализа. Там, где вирусная РНК не была выявлена с помощью qRT-PCR, точка данных нанесена на график при 3,9.

Краткое описание примера 21. Данный пример демонстрирует снижение среднего выделения вируса, выявленное с помощью qRT-PCR из образцов назального смыва, орального мазка и ректального мазка во всех исследуемых группах хорьков, которым вводили композицию по настоящему изобретению (вакцину), по сравнению с контролем в оцениваемые моменты времени после заражения. Это снижение было статистически значимым в титрах назальных смывов и мазков в различные моменты времени. Схема с примированием/бустингом позволила добиться лучших случаев снижения выделения по сравнению с однократным введением.

Пример 22. Безопасность и эффективность вакцины ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) против SARS-CoV-2

Способы. Авторы изобретения описывают испытания эффективности ChAdOx1 nCoV-19 фазы III в Великобритании и Бразилии, а также клинические испытания фазы I/II в Великобритании и Южной Африке, которые включали когорту эффективности. Все исследования вносили свой вклад в объединенный анализ безопасности. Когорты эффективности фазы III в Великобритании и Бразилии вносят свой вклад в оценки эффективности. В когортах эффективности участников старше 18 лет рандомизировали

1:1 для получения двух доз ChAdOx1 nCoV-19 или контроля/плацебо (менингококковой конъюгированной вакцины MenACWY в Великобритании; физиологического раствора в Южной Африке и в Бразилии, MenACWY для первой дозы и физиологический раствор для второй). Участники группы ChAdOx1 nCoV-19 получали дозы, содержащие ~5 x 10^{10} вирусных частиц (стандартная доза: SD), за исключением подгруппы, получавшей половинную дозу в качестве первой дозы в Великобритании (низкая доза: LD). Первичной конечной точкой является симптоматическое заболевание COVID-19, определяемое как положительный результат теста на амплификацию нуклеиновых кислот (NAAT) посредством мазка с по меньшей мере одним из следующих симптомов: лихорадка ≥ 37,8°C; кашель; одышка; аносмия или агевзия. Каждый положительный случай NAAT оценивался слепым независимым Комитетом по оценке конечных точек, который также классифицировал тяжесть каждого случая в соответствии со шкалой клинического прогрессирования ВОЗ. В первичный анализ были включены только участники, которые были сероотрицательными на исходном уровне и имели симптоматическое NAAT-положительное заболевание COVID-19 > 14 дней после второй дозы вакцины. Вторичный анализ включал случаи, произошедшие позднее чем через 21 день после введения первой стандартной дозы вакцины у тех, кто получал одну или две стандартные дозы. Для измерения эффективности против бессимптомного заболевания бессимптомные случаи выявляли с помощью рутинного еженедельного взятия мазков в Великобритании.

Эффективность вакцины рассчитывали как 1 – относительный риск, полученный с помощью устойчивой регрессионной модели Пуассона с поправкой на возраст при рандомизации. Для промежуточного анализа использовали альфа, составляющее 4,16%.

Данные о серьезных нежелательных явлениях собирались на протяжении всего периода исследования.

Исследования продолжаются и зарегистрированы в ISRCTN89951424 и ClinicalTrials.gov, NCT04324606, NCT04400838, NCT04444674.

Результаты: с момента начала испытаний фазы I в Великобритании 23-го апреля 2020 г. в клинических испытаниях ChAdOx1 nCoV-19 в трех странах принимали участие 24103 участника, 11829 в Великобритании, 2096 в Южной Африке и 10178 в Бразилии. Из них 11636 подходили для включения в первичный анализ эффективности > 14 дней после введения второй дозы вакцины (7548 в Великобритании, 4088 в Бразилии). В группе, вакцинированной с помощью ChAdOx1 nCoV-19, было 30 случаев с симптомами COVID-19 и 101 случай в контрольной группе. Эффективность вакцины через более чем 14 дней после введения второй дозы составила 70,4% (95,8% CI 54,8%, 80,6%). Эффективность

вакцины для получавших LD/SD составила 90,0% (95% CI 67,4%, 97,0%) по сравнению с 60,3% (28,0%, 78,2%) у получавших SD/SD.

Через 21 день после первой дозы было 10 случаев госпитализации по поводу COVID-19, два из которых были классифицированы как тяжелые. Все 10 были в контрольной группе исследования. Эффективность вакцины для этих конечных точек не рассчитывалась из-за небольших чисел. В контрольной группе исследования был один летальный исход из-за COVID-19.

Эффективности против бессимптомного заболевания в Великобритании составила 27,3% (95% CI -17%, 55%) для когорты первичного анализа и 58,9% (95% CI 1,0%, 82,9%) среди получавших LD/SD и 3,8% (-72,4%, 46,3%) у тех, кто получал SD/SD.

В когорте безопасности, включавшей 73480 человеко-месяцев последующего наблюдения, было зарегистрировано 144 серьезных нежелательных явления (SAE), которые не считались связанными с каким-либо из исследуемых воздействий. Одно SAE был оценено как возможно связанное с вакциной в группе вакцины ChAdOx1 nCoV-19 и одно в контрольной группе. Также сообщалось о случае тяжелой лихорадки, связанной с вакциной.

Интерпретация: ChAdOx1 nCoV-19 имела приемлемый профиль безопасности и была эффективна против симптоматического заболевания COVID-19 в данном промежуточном анализе продолжающегося клинического испытания.

Подробности

После начала клинического испытания фазы I в Великобритании (COV001) 23 апреля 2020 г. были начаты еще три рандомизированных контролируемых испытания вакцины-кандидата в Великобритании (COV002), Бразилии (COV003) и Южной Африке (COV005). Исследование фазы I (COV001) включало когорту эффективности, а исследования фазы II и III (COV002, COV003 и COV005) расширяли включение в исследование участников с более высокой вероятностью заражения вирусом, таких как медицинские работники. Критерии исключения были снижены для фазы III, и также были включены пожилые люди с рядом сопутствующих заболеваний. Все исследования в основном завершили включение в исследование соответствующих групп эффективности и находятся в стадии последующего наблюдения, за исключением небольшого числа добровольцев, все еще набираемых в ВИЧ-позитивную когорту в Великобритании и пожилых людей в Бразилии. В данном документе авторы изобретения представляют комбинированный промежуточный анализ эффективности вакцин против симптоматической инфекции

COVID-19 из этих четырех рандомизированных контролируемых испытаний ChAdOx1 nCoV-19.

Способы

Безопасность и эффективность вакцины ChAdOx1 nCoV-19 оценивали с помощью глобального объединенного анализа, который включает данные из четырех текущих клинических исследований вакцины фазы I, II и III. Объединенный анализ данных из этих исследований предусматривает большую точность результатов как эффективности, так и безопасности, чем это могло быть достигнуто в отдельных исследованиях, и предусматривает более широкое понимание использования вакцины в различных популяциях. План статистического анализа для глобального объединенного анализа этих исследований был разработан до фиксации данных и анализа.

COV001 (Великобритания)

В этом продолжающемся крупном клиническом испытании фазы I/II в 5 исследовательских центрах Великобритании авторы изобретения включали 1077 здоровых добровольцев в возрасте 18-55 лет, как описано выше. Вкратце, здоровых взрослых участников включали в исследование после скрининга, чтобы исключить тех, у кого ранее существовали проблемы со здоровьем. Участников групп эффективности рандомизировали 1:1 для получения 2 доз ChAdOx1 nCoV-19 в дозе 5 x 10^{10} вирусных частиц (в. ч.) или MenACWY в качестве контроля. Первоначально это исследование было запланировано как исследование с однократной дозой, однако протокол был модифицирован на схему с 2 дозами для когорт эффективности в результате сильных стимулирующих ответов, определенных при оценке когорт ранней иммуногенности.

COV002 (Великобритания)

В этом продолжающемся одиночном слепом исследовании фазы II/III в Великобритании принимали участие 19 исследовательских центров в Англии, Уэльсе и Шотландии, в частности те, кто работает в профессиях с высокой вероятностью заражения SARS-CoV-2, таких как помещения для здравоохранения и социальной помощи. Участников включали в исследование в когорты эффективности (группы 4, 6, 9, 10) в трех возрастных группах: 18-55 лет, 56-69 лет и 70 лет и старше, без верхнего возрастного предела. Авторы изобретения включали индивидуумов со стабильными ранее существовавшими заболеваниями и стремились включать в исследование примерно 20% участников в две старшие возрастные группы. Участники, включенные в исследование в подгруппы иммуногенности, были описаны выше и/или данные о них были опубликованы ранее, и они дополнительно не включены в данный пример. В испытание в

Великобритании были включены два уровня доз: в группе LD/SD участники получали половинную дозу вакцины (~2,5 x 10^{10} в. ч.) в качестве первой дозы (LD) и подвергались бустингу с помощью стандартной дозы (SD); последующие когорты вакцинировали двумя стандартными дозами вакцин (SD/SD). Первоначальный выбор дозы был основан на том же спектрофотометрическом измерении, которое использовалось в исследовании фазы I (COV001), однако в результате различий в процессе изготовления впоследствии была продемонстрирована недооценка дозы, что приводило в результате к половинной дозе (LD), и при этом дозу корректировали с использованием qPCR в отношении SD, в результате чего были включены в исследование 2 группы вакцин с различными схемами дозирования. Подробные сведения доступны в протоколе.

COV003 (Бразилия)

В этом продолжающемся одиночном слепом исследовании фазы III в Бразилии основной набор добровольцев был направлен на лиц с высоким риском заражения вирусом, включая медицинских работников в 6 учреждениях по всей Бразилии. В это испытание были включены индивидуумы со стабильными ранее существовавшими заболеваниями. Всем участникам было предложено две дозы вакцины в дозе ~5 x 10^{10} в. ч., вводимых с интервалом 4 недели. Участников набирали во всех возрастных группах старше 18 лет, с примерно 20% старше 55 лет. Подробные сведения доступны в протоколе исследования.

COV005 (Южная Африка)

Это продолжающееся в Южной Африке исследование представляло собой двойное слепое исследование фазы I/II с участием здоровых взрослых людей в возрасте 18-65 лет, живущих без ВИЧ. Также в исследование была включена дополнительная когорта иммуногенности для людей, живущих с ВИЧ, но она не включена в данный отчет. Всем участникам было предложено две дозы вакцины в дозе 5 x 10^{10} в. ч. с интервалом 4 недели (медиана и диапазон). Небольшая подгруппа из 44 участников получала низкую дозу вакцины. Подробные сведения доступны в протоколе исследования.

Рандомизация

В когортах эффективности для всех исследований участников рандомизировали 1:1 для получения ChAdOx1 nCoV-19 или контрольного продукта. Списки рандомизации получали с помощью статистика исследования и загружали на безопасную веб-платформу, используемую для исследования eCRF (REDCap 9.5.22 - © 2020, Университет Вандербильта) для COV001, COV002 и COV003. В Южной Африке список рандомизации велся фармацевтом, проводившим открытое исследование, который готовил вакцины для

введения. Шприцы с вакцинами покрывали непрозрачным материалом, чтобы предотвратить раскрытие сведений для участников исследования.

Введенные вакцины

Вакцина ChAdOx1 nCoV-19 представляет собой вектор на основе аденовируса обезьян с недостаточной репликацией, экспрессирующий полноразмерный шиповидный (S) белок SARS-CoV-2. В COV002 менингококковая конъюгированная вакцина групп A, C, W и Y (MenACWY) была выбрана в качестве вакцины для контрольной группы, чтобы свести к минимуму вероятность случайного раскрытия сведений для участников из-за местных или системных реакций на вакцину. В COV003 использовали MenACWY в качестве контроля для первой дозы и физиологический раствор для второй дозы. В COV005 участникам, рандомизированным в контрольную группу, вводили физиологический раствор.

COV001, COV002 и COV003 изначально были разработаны для оценки однократной дозы ChAdOx1 nCoV-19 по сравнению с контролем. Однако после обзора данных об ответе антител в исследовании фазы 1/2 (COV001) и в когорте иммуногенности у пожилых людей в фазе II, которые показали увеличение общих и нейтрализующих титров антител после бустерной дозы, бустерная доза была включена во все испытания.

Установление конечных точек

Симптоматическое заболевание COVID-19

Участников просили связаться с исследовательским центром, если у них возникнут определенные симптомы, связанные с COVID-19, и они получали регулярные напоминания об этом. У тех, кто соответствовал симптоматическим критериям, выполняли клиническую оценку, брали мазок на NAAT и брали образцы крови для оценки безопасности и иммуногенности. В Великобритании и Бразилии список симптомов, необходимых для взятия мазка, включал любой из следующих: лихорадка $\geq 37{,}8^{o}C$; кашель; одышка; аносмия или агевзия. В Южной Африке список квалификационных симптомов для взятия мазка был шире и включал миалгию, зябкость, боль в горле, головную боль, заложенность носа, диарею, насморк, утомляемость, тошноту, рвоту и потерю аппетита.

Во всех исследованиях, если участники проходили тестирование вне испытания, либо на своем рабочем месте, если это был медицинский работник, либо частными поставщиками, эти результаты регистрировались и оценивались независимым комитетом по оценке конечных точек. Регистрировали источник каждого мазка, а также сведения о наборе для тестирования, если он был доступен.

Бессимптомная инфекция COVID-19

Участников в COV002 в Великобритании просили еженедельно самостоятельно брать мазок из носа/горла для тестирования NAAT через 1 неделю после первой вакцинации с использованием наборов, предоставленных Министерством здравоохранения и социального обеспечения (DHSC). Участники брали мазки у себя дома и отправляли в специальные тестирующие лаборатории DHSC для обработки. Участники непосредственно информировали о своих результатах текстовым сообщением или по электронной почте из Национальной службы здравоохранения (NHS). Результаты мазков от английских и валлийских участников ежедневно предоставлялись статистику испытаний NHS и сопоставлялись с отдельными индивидуумами на основе личных идентификационных данных (имя, дата рождения, номер NHS, почтовый индекс). Результаты мазков от шотландских участников NHS были недоступны для исследовательской группы на момент окончания сбора данных для этого анализа. Любые результаты мазков, которые нельзя было сопоставить с участником исследования с использованием по меньшей мере двух показателей личных данных, не добавлялись в исследовательскую базу данных.

Проверка конечных точек

Все случаи рассматривались двумя членами слепой независимой группы клинического обзора, которые оценивали клинические данные, включая историю болезни, симптомы, нежелательные явления и результаты мазков, и присваивали оценки тяжести в соответствии со шкалой клинического прогрессирования Всемирной организации здравоохранения (Marshall JC, Murthy S, Diaz J, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet Infectious Diseases* 2020).

Включение в анализ

Участники всех исследований включены в таблицы безопасности. При этом каждое исследование должно было соответствовать заранее установленным критериям наличия по меньшей мере 5 случаев, подходящих для включения в первичный исход, прежде чем исследование включалось в анализы эффективности. Ни COV001, ни COV005 не соответствовали этим критериям и поэтому не включались в оценку эффективности для этого промежуточного анализа.

Статистические способы

План оценки эффективности и безопасности вакцины ChAdOx1 nCoV-19 был основан на глобальном анализе с использованием всех доступных данных из четырех исследований с анализом, объединенным в пул во всех исследованиях. Глобальный план статистического анализа для объединения в пул данных исследований был разработан

после обширных рекомендаций от регулирующих органов, чтобы предварительно определить анализы, которые способствовали бы оценке эффективности, и он был утвержден до проведения любого анализа данных.

Эффективность вакцины рассчитывали как 1 — скорректированный относительный риск (ChAdOx1 nCoV-19 по сравнению с контрольными группами), рассчитанный с использованием регрессионной модели Пуассона с сильной дисперсией (Zou G. A modified poisson regression approach to prospective studies with binary data. *American journal of epidemiology* 2004; **159**(7): 702-6). Модель содержала условия для исследования, экспериментальную группу и возрастную группу при рандомизации. Сокращенная модель, которая не содержала срока для возраста, использовалась для моделей, затронутых проблемами конвергенции из-за небольшого количества случаев в старших возрастных группах. Логарифм периода риска для первичной конечной точки для объединенного в пул анализа использовался в качестве переменной смещения в модели для корректировки в отношении добровольцев, характеризующихся разными моментами времени последующего наблюдения, в течение которых происходили явления.

План глобального объединенного анализа допускал один промежуточный и окончательный анализ эффективности с корректировкой альфа-фактора между ними с использованием гибкой затратной гамма-альфа-функции, при этом значимость объявлялась, если нижняя граница доверительного интервала 1-α% составляла более чем 20%. Доказательство эффективности на момент проведения промежуточного анализа не считалось основанием для прекращения испытаний, и во всех испытаниях продолжали накапливаться дополнительные данные, которые будут включены в будущие анализы.

Планировалось, что первый промежуточный анализ будет инициирован, когда по меньшей мере 53 случая у участников, получавших две стандартные дозы вакцины (SD/SD), будут соответствовать определению первичного исхода через более чем 14 дней после второй дозы. Этот анализ предусматривает мощность 77% для порога 20%, чтобы предположить, что истинная эффективность вакцины составляла 70%. Из-за быстрого роста заболеваемости COVID-19 в Великобритании в октябре в сочетании с задержкой доставки исходных образцов для оценки антител к SARS-CoV-2 на момент вакцинации анализ в 53 случаях был недоступен. К моменту блокировки данных для этого промежуточного анализа 98 случаев были доступны для включения в когорты SD/SD, и на основе этих чисел уровень альфа, рассчитанный с использованием затратной гамма-альфа-функции для этого анализа, составляет 4,16%.

Участников исключали из первичного анализа эффективности, если они были сероположительными на исходном уровне или результат на исходном уровне отсутствовал. Образцы сыворотки крови измеряли на исходном уровне в валидированном серологическом анализе с использованием нуклеокапсидного антигена SARS-COV-2 и обрабатывали в Центральной лаборатории PPD (Завентум, Бельгия и Хайленд-Хайтс, Кентукки, США). Серологический тест на антитела к SARS-CoV-2 Roche Elecsys представляет собой метод, основанный на электролюминесцентном иммуноанализе, который позволяет качественно выявлять IgG, реагирующий на нуклеопротеин SARS-CoV-2, в образцах сыворотки крови человека. Другие исключения включали пациентов с NAAT-положительными мазками до 15 дней после второй вакцинации или тех, кто прекращал участие в исследовании до достижения первичной конечной точки эффективности, а время их последующего наблюдения составляло менее чем 15 дней после второй вакцинации.

Анализ эффективности после первой вакцины SD выполняли в качестве вторичного анализа. Индивидуумов исключали, если у них был NAAT-положительный мазок до 22 дней после первой дозы, введенной как SD, или если первая доза была LD.

Участников анализировали в соответствии с вакцинами, которые они получали, с анализом чувствительности, проведенным как для назначенного лечения.

Анализ данных проводили с использованием R версии 3.6.1 или более поздней версии. Устойчивые модели Пуассона подбирались с использованием функции "*proc genmod*" в SAS версии 9.4. Уровень альфа для анализа рассчитывали с использованием функции "*gsDesign*" в R.

Результаты

Было набрано и вакцинировано 24103 участника (1077 из Великобритании (COV001), 10752 из Великобритании (COV002), 10178 из Бразилии (COV003) и 2096 из Южной Африки (COV005)). В общей сложности 11636 участников COV002 и COV003 соответствовали критериям включения для первичного анализа, 5807 получали 2 дозы ChAdOx1-nCoV-19 и 5829 получали две дозы контрольного продукта.

Из участников COV002 и COV003, включенных в первичный анализ большинство были в возрасте 18-55 лет (Великобритания 6542, 87%; Бразилия 3676, 90%). Лица в возрасте 56 лет и старше были набраны позже и составляли 12% от общей когорты (Великобритания: 1006, 13%, Бразилия: 412, 10%). Женщинами являлись 7045 (61%) участников. Большинство участников в Великобритании были белокожими 6902 (91%). В Бразилии 2723 (67%) участников были белокожими.

Время введения примирующей и бустерной вакцин варьировалось в разных исследованиях, в основном из-за задержек в изготовлении и отгрузке. Большинство из 1459/2741 (53%) участников COV002 в группе LD/SD получали вторую дозу через по меньшей мере 12 недель после первой (медиана 84 дня, IQR 77, 91 день), очень немногие 22/2741 (0,8%) получали вторую дозу через 8 недель или меньше. Средняя разница во времени для группы SD/SD в COV002 составляла 69 дней (IQR 50, 86 дней). И наоборот, большинство из 2493/4088 (61%) участников COV003 в группе SD/SD получали вторую дозу в течение 6 недель после первой (медиана 36 дней, IQR, 32, 58 дней). (Таблица ниже).

Таблица. Введение вакцины тем, кто был включен в первичный анализ. (Популяция эффективности LDSD, SDSD, как определено в плане статистического анализа.)

	COV002 (Великобритания)		**COV003 (Бразилия)**	
Исследование	**ChAdOx1 nCOV-19 N (%)**	**MenACWY N (%)**	**ChAdOx1 nCOV-19 N (%)**	**MenACWY N (%)**
Время между первой и второй дозами LD/SD				
< 6 недель	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
6-8 недель	10 (0,7%)	12 (0,9%)		
9-11 недель	624 (45,6%)	636 (46,3%)		
≥ 12 недель	733 (53,6%)	726 (52,8%)		
Время между первой и второй дозами SD/SD				
< 6 недель	453 (19,1%)	454 (18,7%)	1249 (60,5%)	1244 (61,4%)
6-8 недель	517 (21,8%)	464 (19,1%)	430 (20,8%)	431 (21,3%)
9-11 недель	595 (25,0%)	665 (27,4%)	285 (13,8%)	275 (13,6%)
≥ 12 недель	812 (34,2%)	847 (34,9%)	99 (4,8%)	75 (3,7%)

Небольшая часть участников была сероположительной на исходном уровне (Великобритания: 144, 1,3%, Бразилия, 235, 2,3%). У трех участников, сероположительных на исходном уровне, были последующие NAAT-положительные мазки. У одного участника была бессимптомная инфекция через 3 недели после первой

дозы ChAdOx1 nCoV-19. У двух других участников контрольной группы имелись симптомы инфекции через 8 и 21 неделю после взятия образца на исходном уровне.

Был зарегистрирован 131 случай симптоматического COVID-19 у реципиентов LD/SD или SD/SD, которые подходили для включения в первичный анализ через более чем 14 дней после введения второй дозы вакцины. Было 30/5807 (0,5%) случаев в группе вакцины и 101/5829 (1,7%) случаев в контрольной группе, в результате чего эффективность вакцины составляла 70,4% (95,8% CI 54,8%, 80,6%) (таблица 3). У тех, кто получал вакцины SD/SD, было 27/4440 (0,6%) случаев в группе вакцины и 71/4455 (1,6%) случаев в контрольной группе, в результате чего эффективность составляла 62,1% (95% CI 41,0%, 75,7%). У тех, кто получал низкую дозу в качестве первой дозы вакцины, было 3/1367 (0,2%) случаев в группе вакцины и 30/1374 (2,2%) случаев в контрольной группе с эффективностью вакцины 90,0% (95% CI 67,4%, 97,0%) (таблица ниже).

Таблица. Эффективность против SARS-CoV-2 через более чем 14 дней после введения второй дозы вакцины ChAdOx1 nCoV-19 у сероотрицательных участников*

Первичный симптоматический COVID-19†	**Общее число случаев**	**ChAdOx1 nCoV-19 n/N (%)**	**Контроль n/N (%)**	**VE (CI)** 95%, если не указано иное ‡
COV002 (Великобритания)	86	18/3744 (0,5%)	68/3804 (1,8%)	73,5% (55,5%, 84,2%)
Реципиенты LD/SD	33	3/1367 (0,2%)	30/1374 (2,2%)	90,0% (67,4%, 97,0%)£
Реципиенты SD/SD	53	15/2377 (0,6%)	38/2430 (1,6%)	60,3% (28,0%, 78,2%)
COV003 (Бразилия)	45	12/2063 (0,6%)	33/2025 (1,6%)	64,2% (30,7%, 81,5%)£
Все реципиенты SD/SD	**98**	**27/4440 (0,6%)**	**71/4455 (1,6%)**	**62,1% (41,0%, 75,7%)**
Все реципиенты LD/SD и SD/SD‡	**131**	**30/5807 (0,5%)**	**101/5829 (1,7%)**	**70,4% (54,8%, 80,6%)**
Другое симптоматическое заболевание COVID-19	18	7/5807 (0,1%)	11/5829 (0,2%)	36,4% (-63,8%, 75,3%)£

Любое симптоматическое заболевание COVID-19	149	37/5807 (0,6%)	112/5829 (1,9%)	67,1% (52,3%, 77,3%)
Бессимптомное или симптомы неизвестны (COV002)	69	29/3288 (0,88%)	40/3350 (1,19%)	27,3% (-17,2%, 54,9%)
Реципиенты LD/SD	24	7/1120 (0,62%)	17/1127 (1,5%)	58,9% (1,0%, 82,9%)£
Реципиенты SD/SD	45	22//2168 (1,0%)	23/2223 (1,0%)	3,8% (-72,4%, 46,3%)
Любой NAAT+	221	68/5807 (1,2%)	153/5829 (2,6%)	55,7% (41,1%, 66,7%)

† Мазок NAAT+ плюс по меньшей мере один из следующих факторов: кашель, одышка, лихорадка > 37,8°C, аносмия, агевзия; LD/SD: начальная низкая доза, стандартная бустерная доза, SD/SD: получены две стандартные дозы вакцины; VE: эффективность вакцины, рассчитанная по устойчивой модели Пуассона. NAAT: тест амплификации нуклеиновых кислот. *Популяция эффективности LDSD, SDSD, как определено в плане статистического анализа. ♯ 95,8% CI, используемый для первичного анализа. £ VE (CI) рассчитывали на основе упрощенной устойчивой модели Пуассона, которая не была скорректирована с учетом возраста.

В Англии и Уэльсе 129529 еженедельных самостоятельных мазков были обработаны DHSC, 126324 из которых можно было сопоставить с участниками исследования. Было получено 435 положительных мазков, 354 из которых можно было сопоставить. Симптомы у этих участников обычно не оценивались, так как мазки брали дома и отправляли на тестирование по почте. Бессимптомные инфекции или инфекции с незарегистрированными симптомами были выявлены у 69 участников. Эффективность вакцины у 24 реципиентов LD/SD составляла 58,9% (95% CI 1,0%, 82,9%), а у 45 участников, получавших вакцину SD/SD, эффективность составляла 3,8% (95% CI -72,4%, 46,3%) (таблица выше).

Проводили вторичный анализ случаев, произошедших через более чем 21 день после введения первой стандартной дозы у тех, кто получал только стандартные дозы. Было

включено 192 случая (51/6307 (0,8%) вакцины и 141/6297 (2,2%) контроля) с VE 64,1% (95% CI, 50,5%, 73,9%) (таблица ниже).

Таблица. Эффективность против SARS-CoV-2 в течение более 21 дня после введения одной или двух стандартных доз вакцины ChAdOx1 nCoV-19 у сероотрицательных участников*

	Общее число случаев	**ChAdOx1 nCoV-19 n/N (%)**	**Контроль n/N (%)**	**VE (95% CI)**
COV002 (Великобритания)	90	28/3060 (0,9%)	62/3064 (2,0%)	55,0% (29,7%, 71,1%)
COV003 (Бразилия)	102	23/3247 (0,7%)	79/3233 (2,4%)	71,2% (54,2%, 81,9%)
Первичный симптоматический COVID-19†	**192**	**51/6307 (0,8%)**	**141/6297 (2,2%)**	**64,1% (50,5%, 73,9%)**
Другое симптоматическое заболевание COVID-19	21	12/6307 (0,2%)	9/6297 (0,1%)	-32,8% (-214,8%, 44,0%)£
Любое симптоматическое заболевание COVID-19	213	63/6307 (1,0%)	150/6297 (2,4%)	58,3% (44,0%, 68,9%)
Бессимптомное или симптомы неизвестны (COV002)	71	34/2751 (1,2%)	37/2760 (1,3%)	7,8% (-46,7%, 42,1%)
Любой NAAT+	291	102/6307 (1,6%)	189/6297 (3,0%)	46,3% (31,8%, 57,8%)

† Мазок NAAT+ плюс по меньшей мере один из следующих факторов: кашель, одышка, лихорадка > 37,8°C, аносмия, агевзия; VE: эффективность вакцины, рассчитанная по устойчивой модели Пуассона. NAAT: тест амплификации нуклеиновых кислот. *Популяция эффективности 1 дозы SD, как определено в плане статистического анализа. SD: стандартная доза вакцины. £ VE (CI) рассчитывали на основе упрощенной устойчивой модели Пуассона (исключая категорию возрастной группы из-за невозможности сходимости полной модели). Участники с низкой дозой примирования исключались.

В течение периода времени более чем 21 день после первой дозы 10 участников были госпитализированы из-за COVID-19 (оценка клинического прогрессирования ВОЗ >= 4),

из которых 2 случая были оценены как тяжелые (оценка ВОЗ >= 6), включая один смертельный случай. Все 10 случаев были в контрольной группе (таблица ниже).

Таблица. Госпитализация и тяжелое заболевание

	ChAdOx1 nCOV-19	**Контроль**
Госпитализация (оценка клинического прогрессирования по шкале ВОЗ 4 или больше)		
<= 21 день после первой дозы	2*	6
> 21 день после первой дозы, <= 14 дней после второй дозы	0	5
> 14 дней после второй дозы	0	5
Тяжелая степень COVID-19 (оценка клинического прогрессирования по шкале ВОЗ 6 или больше)		
<= 21 день после первой дозы	0	0
> 21 день после первой дозы, <= 14 дней после второй дозы	0	1
> 14 дней после второй дозы	0	1

VE не рассчитывали из-за небольшого числа для анализа. Один случай тяжелого заболевания закончился летальным исходом. Оценки клинического прогрессирования ВОЗ были присвоены независимым слепым комитетом по экспертной оценке конечных точек. * один случай в день вакцинации и один случай через десять дней после вакцинации.

Пять случаев, включенных в первичный анализ, произошли у лиц старше 55 лет. Эффективность вакцины в более старших возрастных группах оценить было невозможно, однако ее можно определить после того, как будет выявлено больше случаев.

Авторы настоящего изобретения также ссылаются на фигуру 55, на которой показана кумулятивная заболеваемость по Каплану-Мейеру симптоматическим заболеванием NAAT+ COVID-19 после 1 или больше стандартных доз (слева) или после 2 доз (справа). Областью, заштрихованной серым цветом, показан период исключения после каждой дозы, когда случаи исключались из анализа. Пунктирными линиями показана доверительная область 95%.

Обсуждение примера 22

Ни в одном из предыдущих испытаний не сообщалось об эффективности вакцины против коронавируса на основе вирусного вектора, и поэтому авторы изобретения предоставили первое доказательство того, что индуцирование иммунных ответов против шиповидного белка с использованием вирусных векторов обеспечивает защиту против заболевания у людей.

У тех, кто получал две стандартные дозы, эффективность против первичного симптоматического COVID-19 была одинаковой в обоих популяциях Великобритании и Бразилии с эффективностью 60% и 64% соответственно. Эффективность 90%, наблюдаемая у тех, кто получал низкую дозу в качестве примирования в Великобритании, была на удивление высокой. Подобный контраст в эффективности между реципиентами LD/SD и SD/SD с бессимптомными инфекциями обеспечивает поддержку наблюдения. Использование низкой дозы для примирования может обеспечить значительно больше вакцины для распространения в период ограниченных поставок, и эти данные подразумевают, что такой подход не поставил бы защиту под угрозу. В то время как вакцина, которая могла бы предупредить заболевание COVID-19, представляла бы существенную пользу для общественного здравоохранения, предупреждение бессимптомной инфекции могло бы снизить передачу вируса и защитить тех, у кого есть сопутствующие заболевания, которые не отвечают на вакцинацию, тех, кто не может быть вакцинирован, и тех, кто не имеет доступа к вакцине, обеспечивая более обширную пользу. В данном документе авторы изобретения показывают, что эффективность против бессимптомной инфекции после ChAdOx1 nCoV-19 составляла 59% у тех, кто получал низкую примирующую дозу, и 4% у тех, кто получал две стандартные дозы.

Некоторые регулирующие органы считают, что нижняя граница доверительного интервала для эффективности должна быть выше 20%, другие органы более строги и предполагают, что для лицензирования необходима нижняя граница 30% (Центр по оценке и изучению биологических препаратов. Разработка и лицензирование вакцин для предупреждения COVID-19. 2020 (8 ноября 2020 г.)). В данном документе авторы настоящего изобретения представляют данные, которые превышают оба этих пороговых значения.

Пример 23. Воздействие AZD1222: защита после первой дозы вакцины и эффект интервала между дозами в отношении VE ≥ 15 дней после второй дозы

Воздействие AZD1222

12021 участник 4 исследований, включенный в заявку, получал по меньшей мере одну дозу AZD1222. Из этих участников 8266 (68,8%) получали 2 дозы AZD1222 (см. таблицу

ниже). В целом и в группе первичного анализа эффективности у примерно одной трети участников интервал между дозами составлял < 6 недель, 6-11 недель или ≥ 12 недель.

Параметр		**Любая доза для выборки для анализа безопасности**		**Сероотрицательные реципиенты SDSD + LDSD для выборки для анализа эффективности**	
		AZD1222 (N = 12021)	**Контроль (N = 11724)**	**AZD1222 (N = 5807)**	**Контроль (N = 5829)**
Уровень дозы [a], n(%)	LDSD	1516(12,6)	1472(12,6)	1367(23,5)	1374(23,6)
	LDLD	127(1,1)	69(0,6)	0	0
	SDSD	6568(54,6)	6472(55,2)	4440(76,5)	4455(76,4)
	SDLD	55(0,5)	36(0,3)	0	0
	LD	305(2,5)	281 (2,4)	0	0
	SD	3450(28,7)	3394(28,9)	0	0
	Общее количество	12021	11724	5807	5829
Интервал между введением доз, n(%)	< 6 недель	3412(41,3)	3234(40,2)	1702(29,3)	1698(29,1)
	6-8 недель	680(8,2)	604(7,5)	568(9,8)	527(9,0)
	9-11 недель	1558(18,8)	1550(19,3)	1444(24,9)	1488(25,5)
	≥ 12 недель	2616(31,6)	2661(33,1)	2093(36,0)	2116(36,3)
	Общее количество	8266	8049	5807	5829

[a] Уровень дозы в контрольной группе определяется по уровню дозы соответствующей группы вакцины.
Строка, соответствующая общему количеству, включает число участников, для которых имеются данные относительно соответствующей характеристики, и ее значения использовали в качестве знаменателя для расчета процентных значений для всех категорий.

Защита после первой дозы вакцины

Были проведены исследовательские анализы, чтобы выяснить, был ли защитный иммунитет вызван первой дозой и какова была продолжительность защиты. Последующее наблюдение началось через 22 дня после первой дозы и участников исключали из анализа в самый ранний момент времени, когда они получали вторую дозу, или через 12 недель после 1 дозы. Результаты (см. таблицу ниже) показали, что первая доза обеспечивала защитный иммунитет до меньшей мере 12 недель.

	Участники с явлениями				**VE**	**95% CI**
	AZD1222		**Контроль**			
	N	**n (%)**	**N**	**n (%)**	**(%)**	
Случаи до недели 12	7998	12 (0,15)	7982	44 (0,55)	73,00	(48,79, 85,76)

Таблица. Эффективность вакцины в отношении заболеваемости первым

вирусологически подтвержденным вирусом SARS-CoV-2 COVID-19, возникающей после первой дозы + 22 дня и до второй дозы вакцины или через 12 недель после дозы 1

5807 участников в группе AZD1222 для набора для анализа эффективности сероотрицательных SDSD + LDSD имели медианную продолжительность последующего наблюдения от 15 дней после второй дозы (т. е. конечная точка для примирующей конечной точки эффективности) до 48,0 дней (диапазон 1-79 дней) и от первой дозы 132,0 дня (диапазон 41-158 дней); 5829 участников в контрольной группе имели медианную продолжительность последующего наблюдения от 15 дней после второй дозы до 48,0 дней (диапазон 1-79 дней) и от первой дозы до 133,0 дня (диапазон 35-158 дней).

Эффект интервала между дозами в отношении VE ≥ 15 дней после дозы 2

Набор данных, в котором была продемонстрирована эффективность схемы с двумя дозами, содержал данные для широкого диапазона интервалов доз (4-26 недель): 29,3% были < 6 недель, 34,7% были 6-11 недель и 36,0% были ≥ 12 недель.

Были проведены анализы подгрупп эффективности вакцины в зависимости от интервала дозирования. В соответствии с данными об иммуногенности, где наблюдалось усиление ответов связывающих и нейтрализующих антител с увеличением интервала дозирования, эффективность была продемонстрирована с большей уверенностью для интервалов доз 8-12 недель. Для подгруппы с интервалом дозирования 8-11 недель VE составляла 72,85%, 95% CI (43,45, 86,97), для подгруппы с интервалом дозирования > 11 недель составляла 81,90%, 95% CI (59,93, 91,90). Исследовательский анализ подгрупп показал, что эффективность вакцины составляла около 80% при интервалах дозирования длиннее чем 11 недель, однако данные были ограничены, а оценки были ассоциированы с широкими доверительными интервалами.

Хотя в данном документе были подробно раскрыты иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения со ссылками на прилагаемые графические материалы, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается этими точными вариантами осуществления и что специалист в данной области техники сможет осуществлять различные изменения и модификации, не выходя за рамки объема настоящего изобретения, определенного прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Таблица последовательностей

SEQ ID NO: 1	Аминокислотная последовательность шиповидного белка SARS-CoV2 (nCoV-19)
SEQ ID NO: 2	ChAdOx2: вирусный вектор на основе аденовируса шимпанзе C68
SEQ ID NO: 3	Нуклеотидная последовательность кодон-оптимизирована и пересмотрена для устранения повторяющихся оснований, кодирующих шиповидный белок **без** лидерной последовательности tPA
SEQ ID NO: 4	Нуклеотидная последовательность кодон-оптимизирована и пересмотрена для устранения повторяющихся оснований, кодирующих шиповидный белок **с** лидерной последовательностью tPA
SEQ ID NO: 5	Аминокислотная последовательность tPA (мутант P->A)
SEQ ID NO: 6	Аминокислотная последовательность tPA (встречающаяся в природе P)
SEQ ID NO: 7	Аминокислотная последовательность tPA под SEQ ID NO: 5 без "RR"
SEQ ID NO: 8	Аминокислотная последовательность tPA под SEQ ID NO: 6 без "RR"
SEQ ID NO: 9	Нуклеотидная последовательность, кодирующая tPA под SEQ ID NO: 5, которая была кодон-оптимизирована для использования кодонов, свойственных человеку.
SEQ ID NO: 10	Аминокислотная последовательность слитого шиповидного отростка и tPA (tPA подчеркнута) (т. е. аминокислотная последовательность, кодируемая SEQ ID NO: 4)
SEQ ID NO: 11	Нуклеотидная последовательность из генома SARS-CoV2 (nCoV 19) для шиповидного белка (из номера доступа MG772933.1)
SEQ ID NO: 12	Аминокислотная последовательность рецептор-связывающего домена шиповидного отростка и tPA
SEQ ID NO: 13	Нуклеотидная последовательность рецептор-связывающего домена шиповидного отростка и tPA
SEQ ID NO: 14	Аминокислотная последовательность шиповидного белка до слияния с tPA
SEQ ID NO: 15	Нуклеотидная последовательность шиповидного белка до слияния с tPA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая вирусный вектор, при этом вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, имеющую полинуклеотидную последовательность, кодирующую шиповидный белок коронавируса SARS-CoV2, отличающаяся тем, что указанный вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденовируса.

2. Композиция по п. 1, где указанный вектор на основе аденовируса представляет собой ChAdOx 1.

3. Композиция по п. 1 или п. 2, где указанный шиповидный белок содержит рецептор-связывающие домены (RBD).

4. Композиция по любому из пп. 1-3, где указанный шиповидный белок представляет собой полноразмерный шиповидный белок.

5. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где указанный шиповидный белок представлен в виде продукта слияния с последовательностью тканевого активатора плазминогена (tPA) в порядке N-конец - tPA - шиповидный белок - C-конец.

6. Композиция по п. 5, где указанный tPA имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

7. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где указанный шиповидный белок имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1.

8. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где указанная полинуклеотидная последовательность предусматривает последовательность под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, предпочтительно под SEQ ID NO: 4.

9. Композиция по любому из пп. 2-8, где указанная последовательность вирусного вектора является такой, как представленная в ECACC под номером доступа 12052403.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, где введение однократной дозы указанной композиции субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунитет у указанного субъекта.

11. Композиция по любому из пп. 1-9, где введение первой дозы указанной композиции субъекту-млекопитающему с последующим введением второй дозы указанной композиции указанному субъекту-млекопитающему индуцирует защитный иммунитет у указанного субъекта.

12. Композиция по любому из предыдущих пунктов для применения в индуцировании иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего.

13. Композиция по любому из предыдущих пунктов для применения в предупреждении инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего.

14. Применение композиции по любому из пп. 1-13 в медицине.

15. Применение композиции по любому из пп. 1-13 в получении лекарственного препарата для предупреждения инфекции, вызываемой SARS-CoV2, у субъекта-млекопитающего.

16. Способ индуцирования иммунного ответа против SARS-CoV2 у субъекта-млекопитающего, при этом способ включает введение указанному субъекту дозы композиции по любому из пп. 1-12.

17. Композиция для применения по п. 12 или композиция для применения по п. 13, где указанное применение предусматривает

(i) введение указанному субъекту первой дозы указанной композиции и

(ii) введение указанному субъекту второй дозы указанной композиции,

где указанная первая доза и указанная вторая доза содержат приблизительно одинаковое число вирусных частиц.

18. Способ по п. 16 или композиция для применения по п. 17, где каждая указанная доза содержит приблизительно 5×10^{10} вирусных частиц.

19. Способ по п. 16 или п. 18 или композиция для применения по п. 17 или п. 18, где указанная вторая доза вводится с интервалом, составляющим

a) менее чем 6 недель,

b) 6-8 недель,

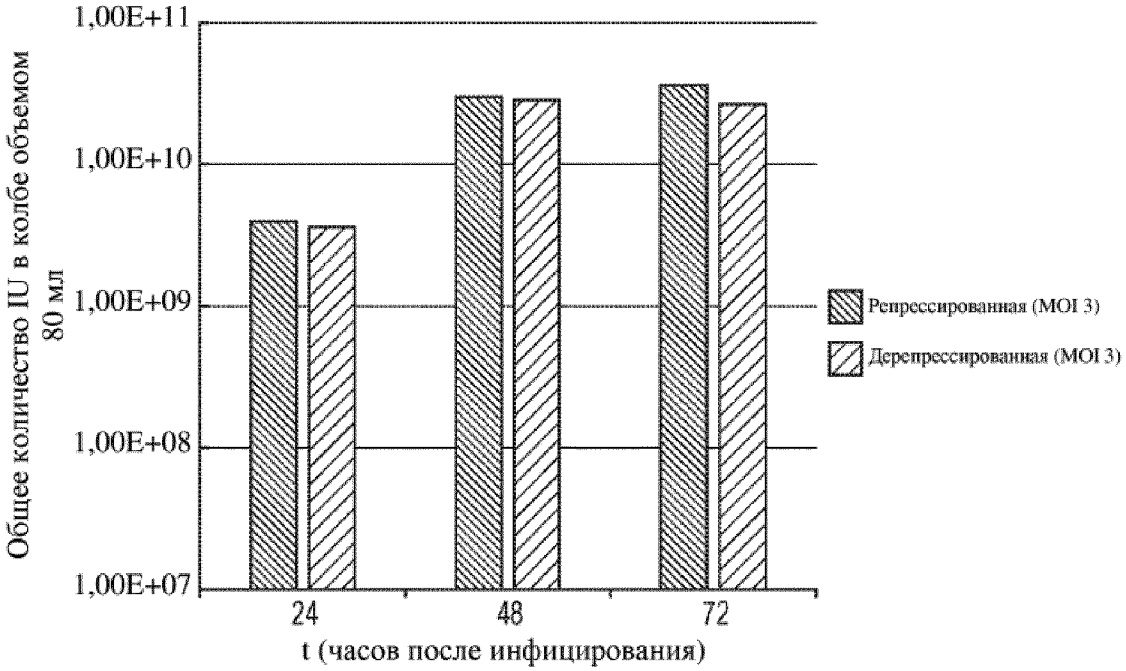
c) 9-11 недель или

d) 12 недель или больше,

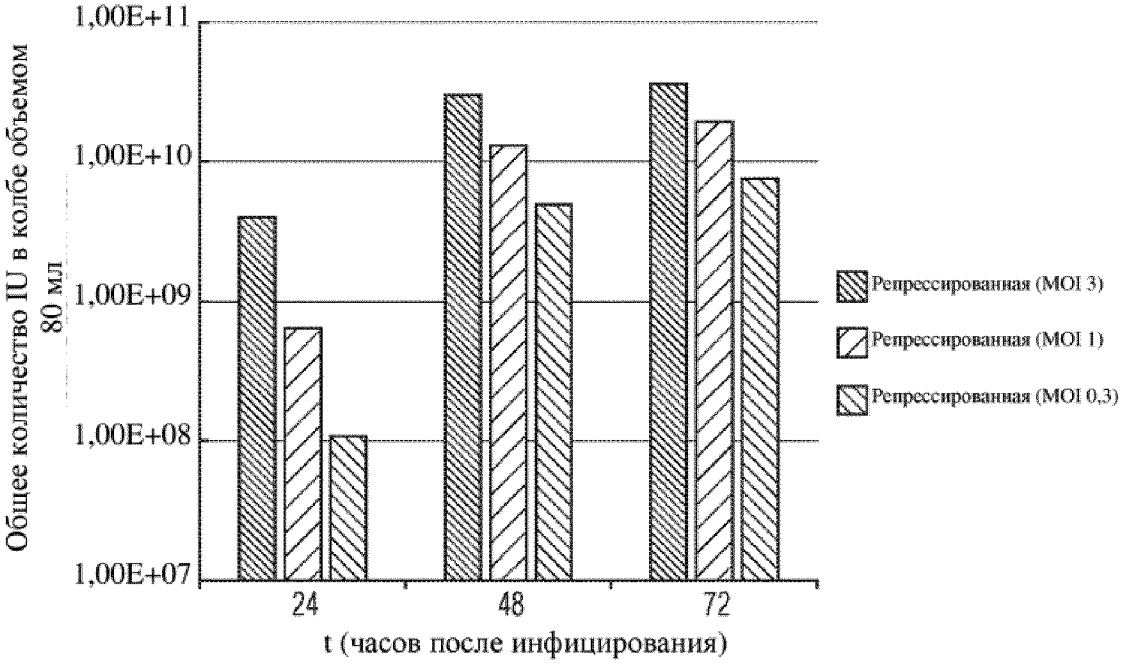
после введения указанной первой дозы.

20. Способ по любому из пп. 16, 18 или п. 19, где указанную композицию вводят посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из интраназального, аэрозольного, внутрикожного и внутримышечного.

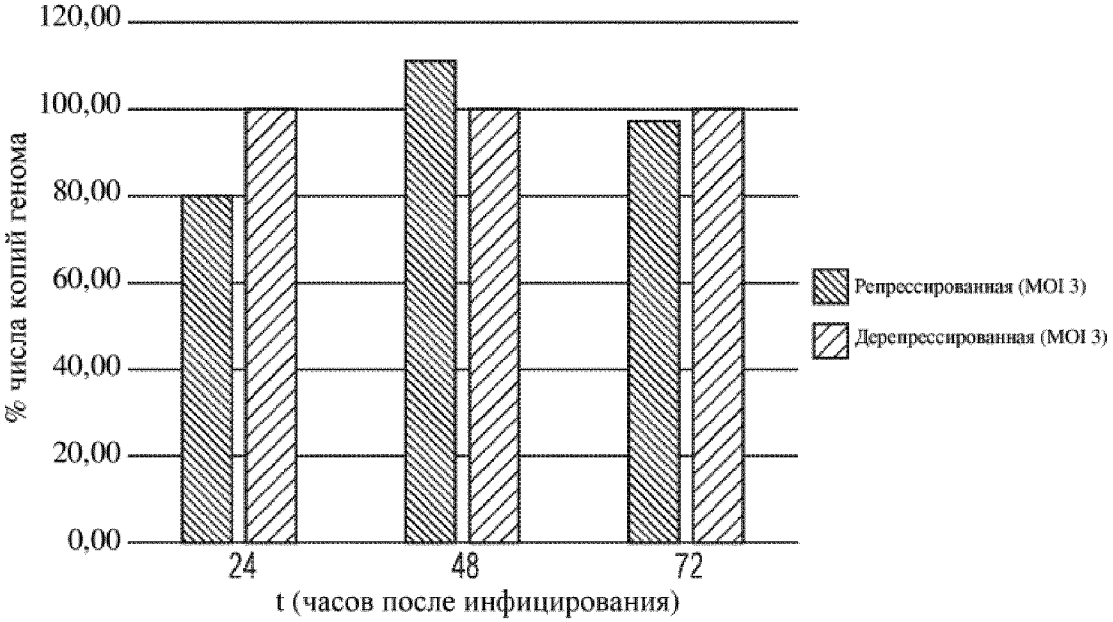
21. Способ по п. 20, где указанное введение является внутримышечным.


1,00E+11
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
Общее количество IU в колбе объемом 80 мл
24
48
72
t (часов после инфицирования)
Репрессированная (MOI 3)
Дерепрессированная (MOI 3)

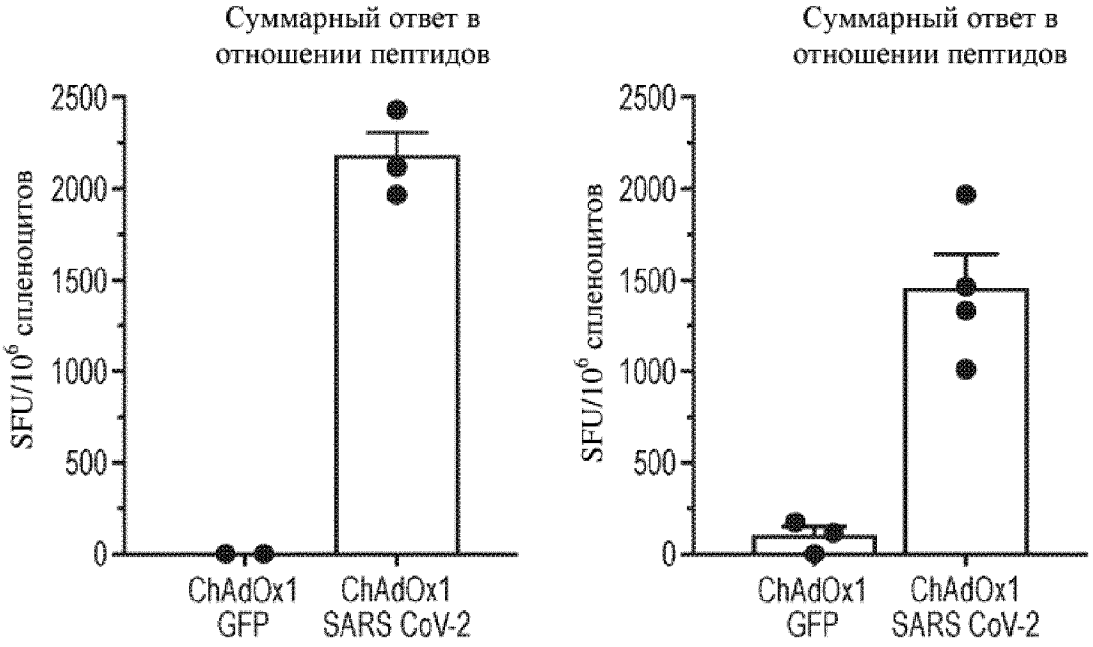
ФИГ. 1


1,00E+11
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
Общее количество IU в колбе объемом 80 мл
24
48
72
t (часов после инфицирования)
Репрессированная (MOI 3)
Репрессированная (MOI 1)
Репрессированная (MOI 0,3)

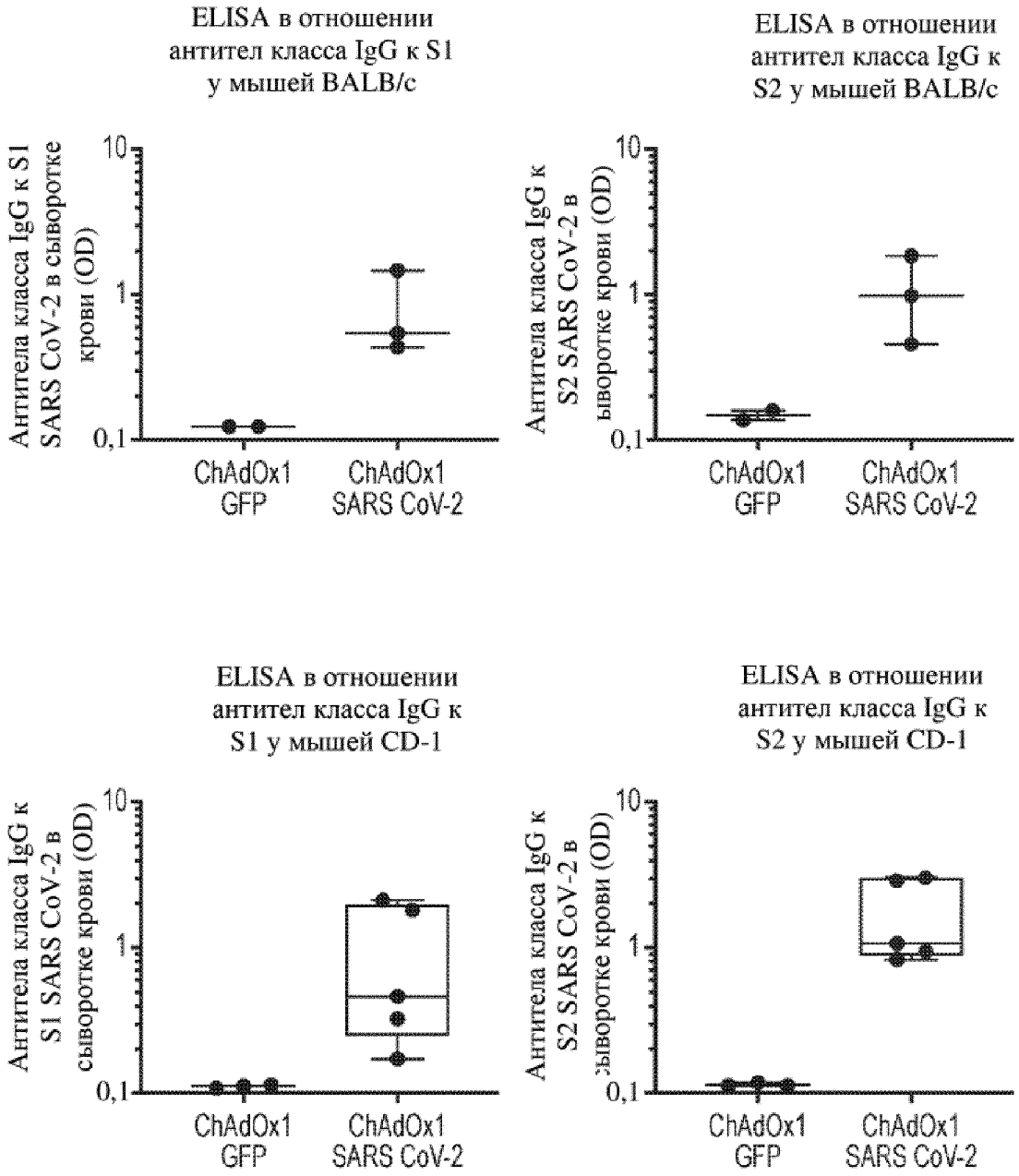
ФИГ. 2


120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00
% числа копий генома
24
48
72
t (часов после инфицирования)
Репрессированная (MOI 3)
Дерепрессированная (MOI 3)

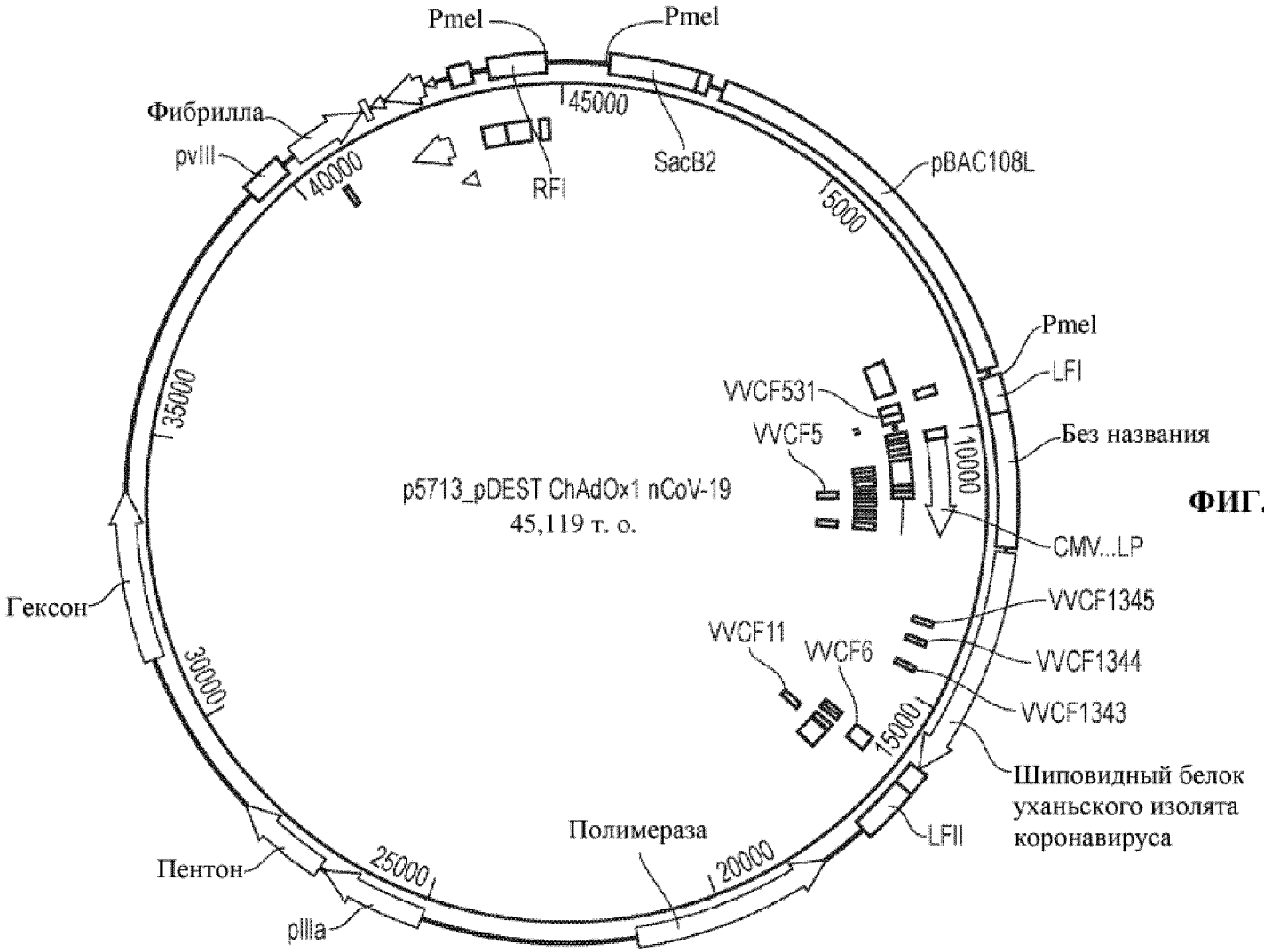
ФИГ. 3


Суммарный ответ в отношении пептидов
SFU/10^6 спленоцитов
2500
2000
1500
1000
500
0
ChAdOx1 GFP
ChAdOx1 SARS CoV-2
Суммарный ответ в отношении пептидов
SFU/10^6 спленоцитов
2500
2000
1500
1000
500
0
ChAdOx1 GFP
ChAdOx1 SARS CoV-2

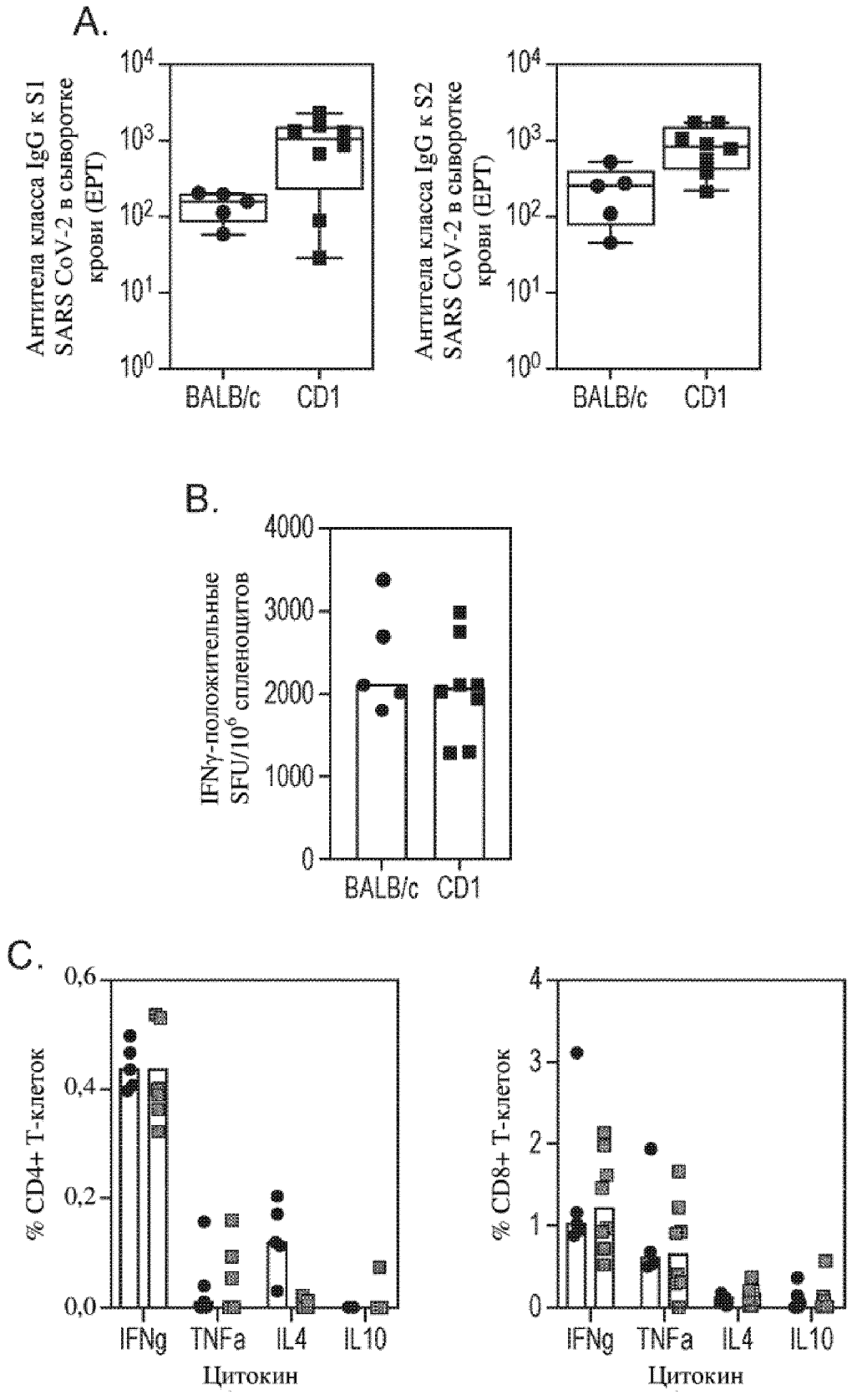
ФИГ. 4


ELISA в отношении антител класса IgG к S1 у мышей BALB/c
Антитела класса IgG к S1 SARS CoV-2 в сыворотке крови (OD)
10
1
0,1
ChAdOx1 GFP
ChAdOx1 SARS CoV-2
ELISA в отношении антител класса IgG к S2 у мышей BALB/c
Антитела класса IgG к S2 SARS CoV-2 в сыворотке крови (OD)
10
1
0,1
ChAdOx1 GFP
ChAdOx1 SARS CoV-2
ELISA в отношении антител класса IgG к S1 у мышей CD-1
Антитела класса IgG к S1 SARS CoV-2 в сыворотке крови (OD)
10
1
0,1
ChAdOx1 GFP
ChAdOx1 SARS CoV-2
ELISA в отношении антител класса IgG к S2 у мышей CD-1
Антитела класса IgG к S2 SARS CoV-2 в сыворотке крови (OD)
10
1
0,1
ChAdOx1 GFP
ChAdOx1 SARS CoV-2

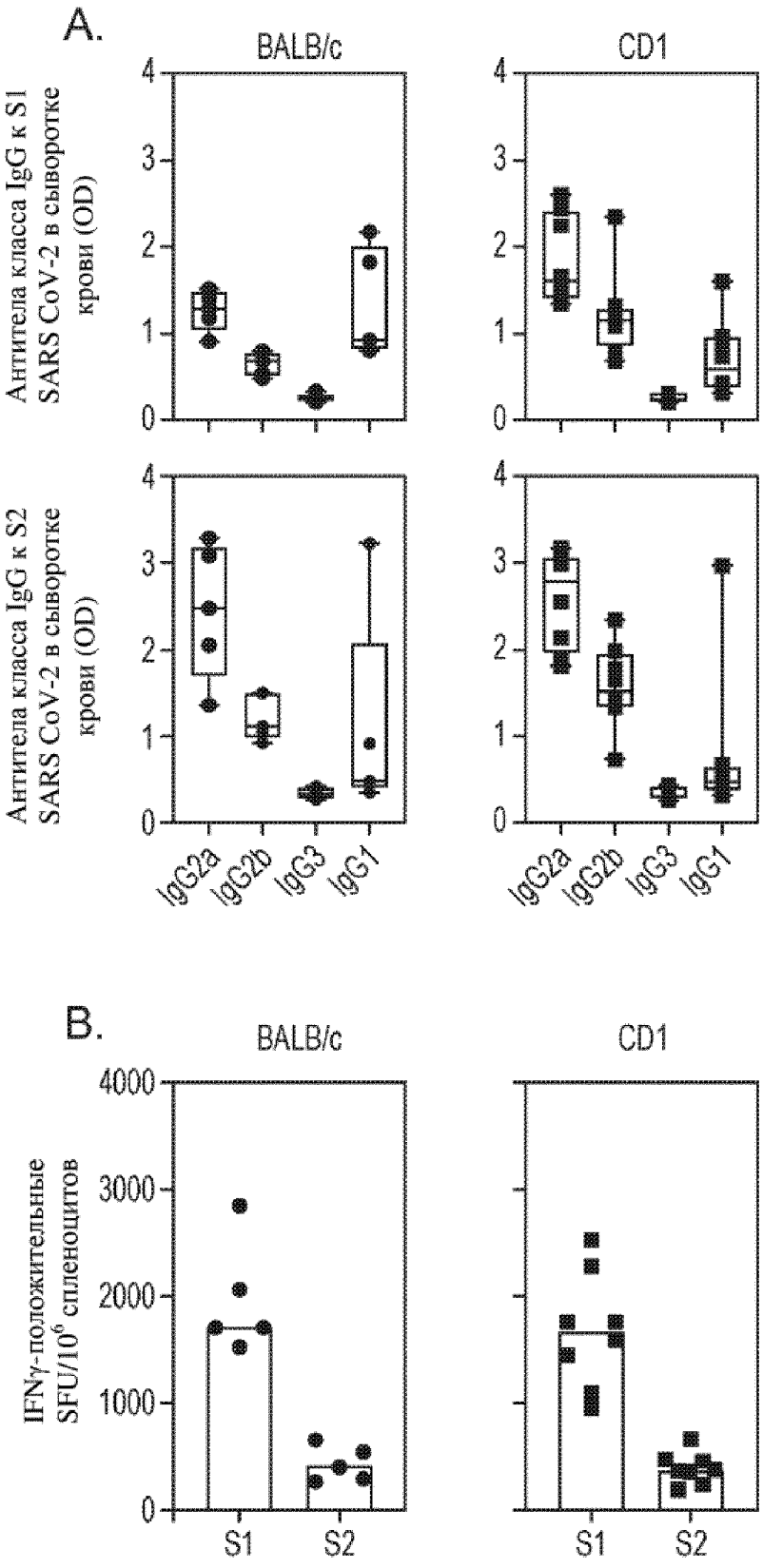
ФИГ. 5


Pmel
Pmel
45000
Фибрилла
pVIII
40000
RFl
SacB2
pBAC108L
5000
Pmel
LFl
VVCF531
VVCF5
Без названия
10000
p5713_pDEST ChAdOx1 nCoV-19
45,119 т. о.
CMV...LP
35000
Гексон
VVCF1345
VVCF11
VVCF6
VVCF1344
30000
VVCF1343
15000
Шиповидный белок
уханьского изолята
коронавируса
Полимераза
LFII
Пентон
25000
20000
pIIIa

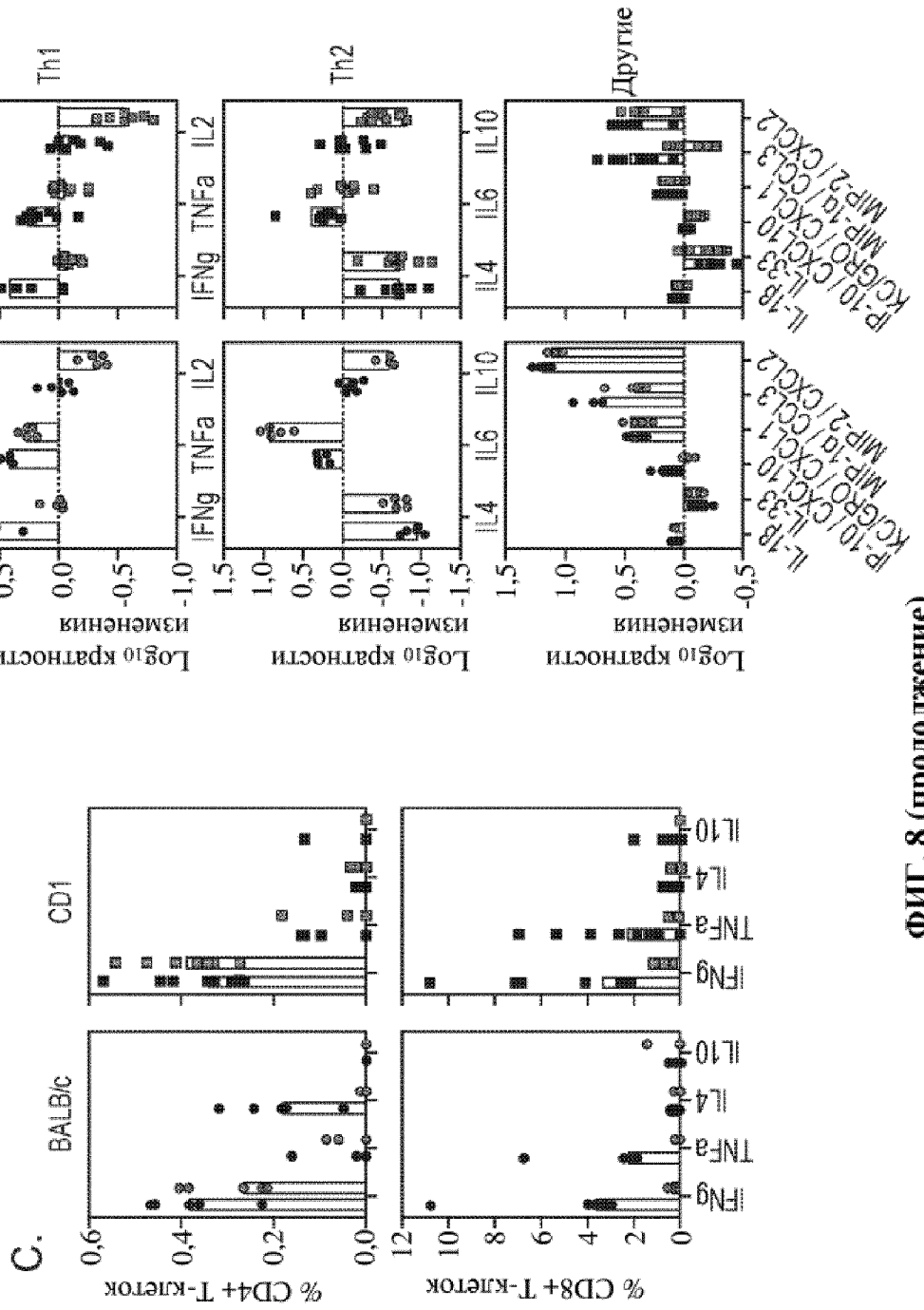
ФИГ. 6


A.
Антитела класса IgG к S1 SARS CoV-2 в сыворотке крови (ЕРТ)
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
BALB/c
CD1
Антитела класса IgG к S2 SARS CoV-2 в сыворотке крови (ЕРТ)
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
BALB/c
CD1
B.
IFNγ-положительные SFU/10^6 спленоцитов
4000
3000
2000
1000
0
BALB/c
CD1
C.
% CD4+ Т-клеток
0,6
0,4
0,2
0,0
IFNg
TNFa
IL4
IL10
Цитокин
% CD8+ Т-клеток
4
3
2
1
0
IFNg
TNFa
IL4
IL10
Цитокин

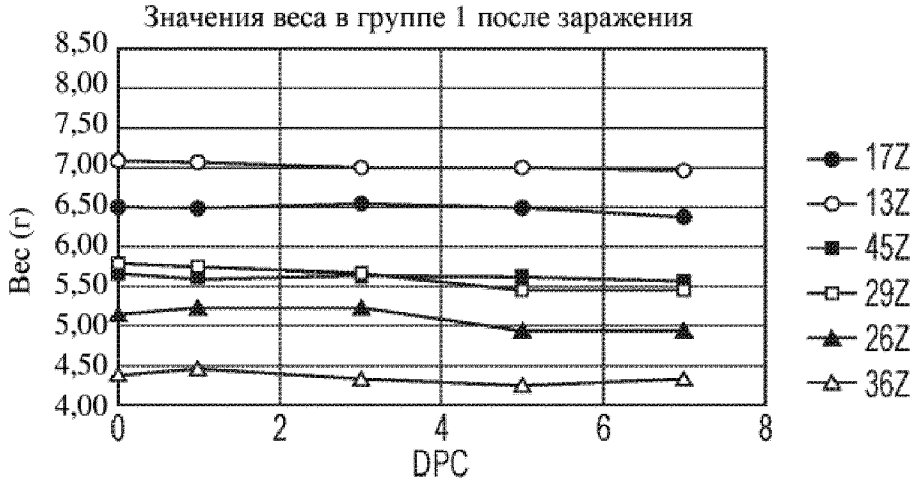
ФИГ. 7


A.
BALB/c
CD1
Антитела класса IgG к S1 SARS CoV-2 в сыворотке крови (OD)
Антитела класса IgG к S2 SARS CoV-2 в сыворотке крови (OD)
0
1
2
3
4
IgG2a
IgG2b
IgG3
IgG1
B.
BALB/c
CD1
IFNγ-положительные SFU/10^6 спленоцитов
0
1000
2000
3000
4000
S1
S2

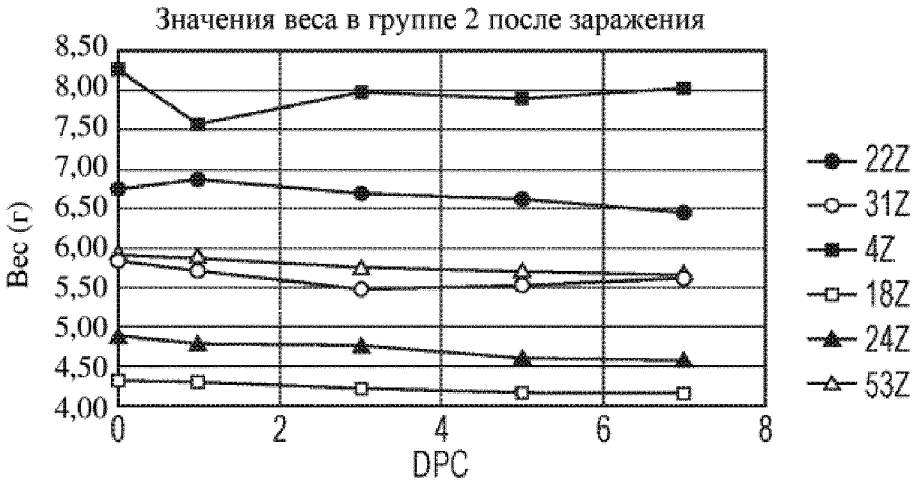
ФИГ. 8



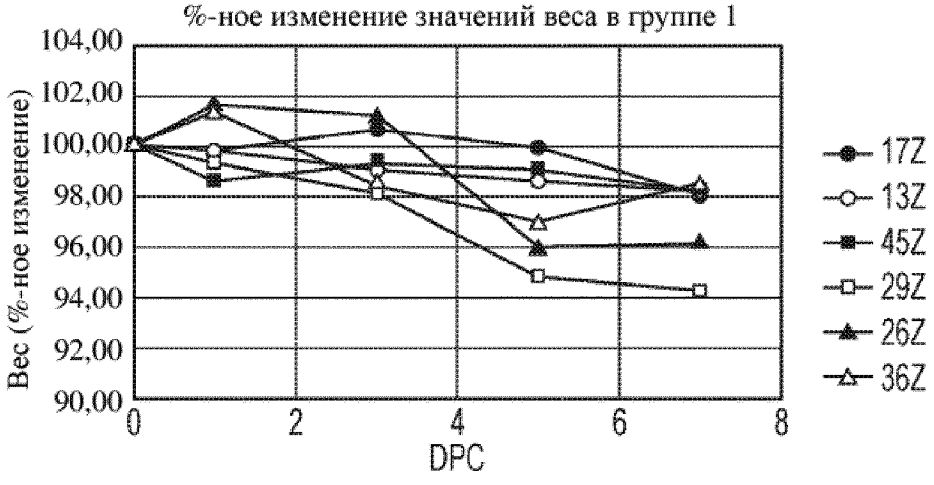
ФИГ. 8 (продолжение)



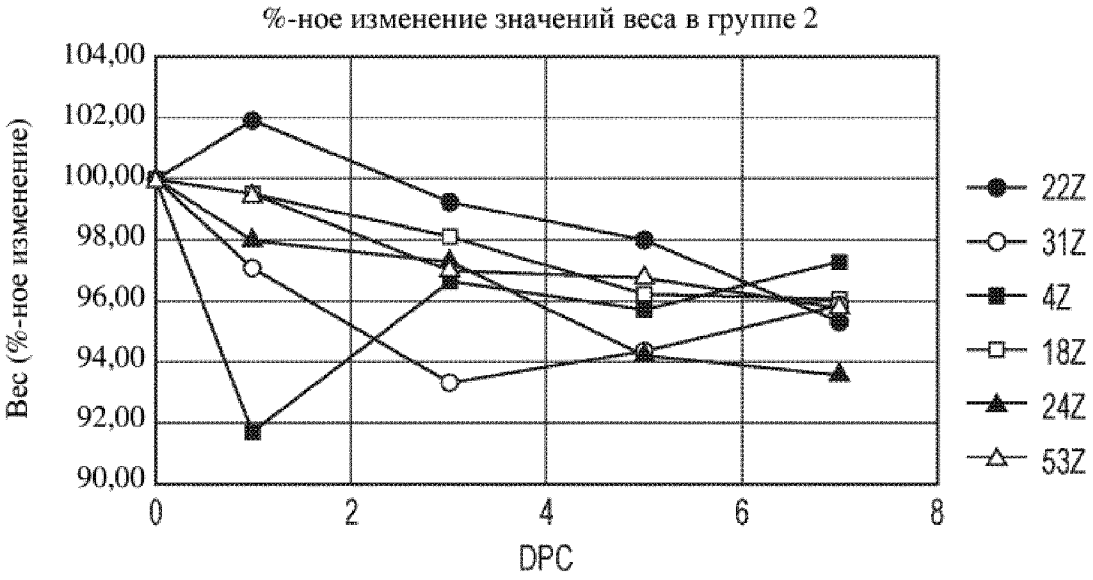
ФИГ. 9A



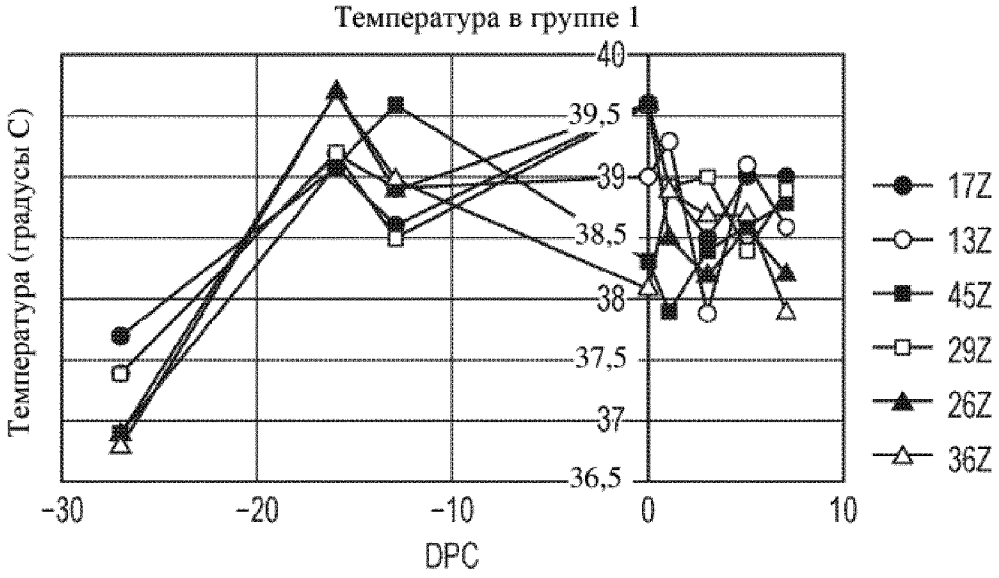
ФИГ. 9B



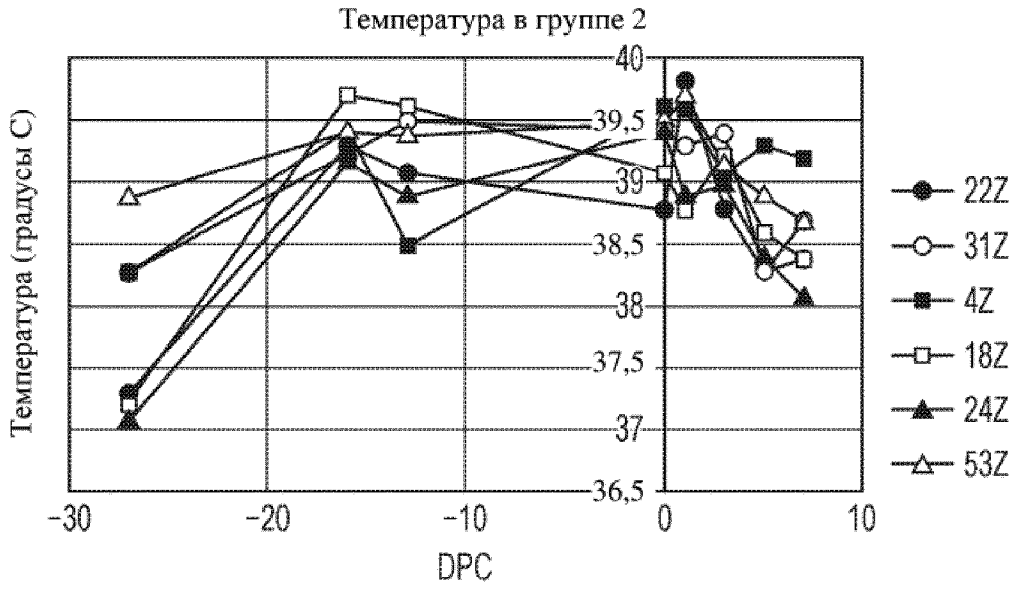
ФИГ. 9C



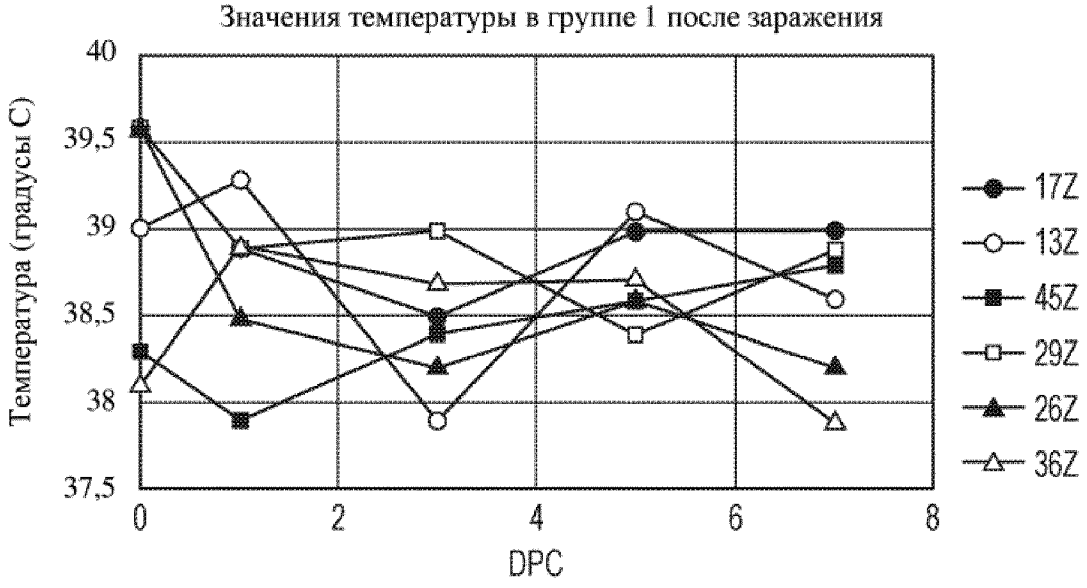
ФИГ. 9D



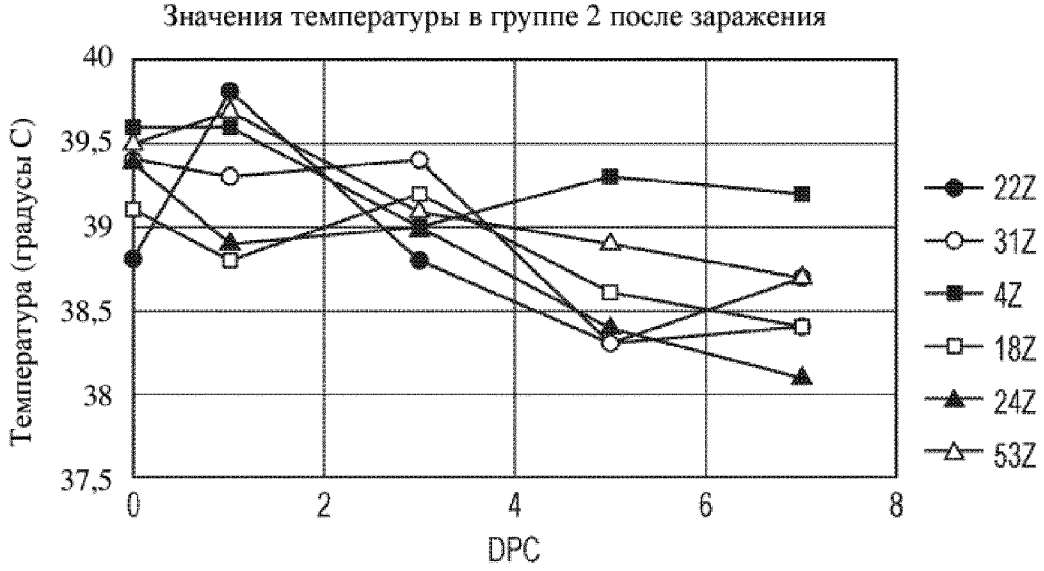
ФИГ. 10A



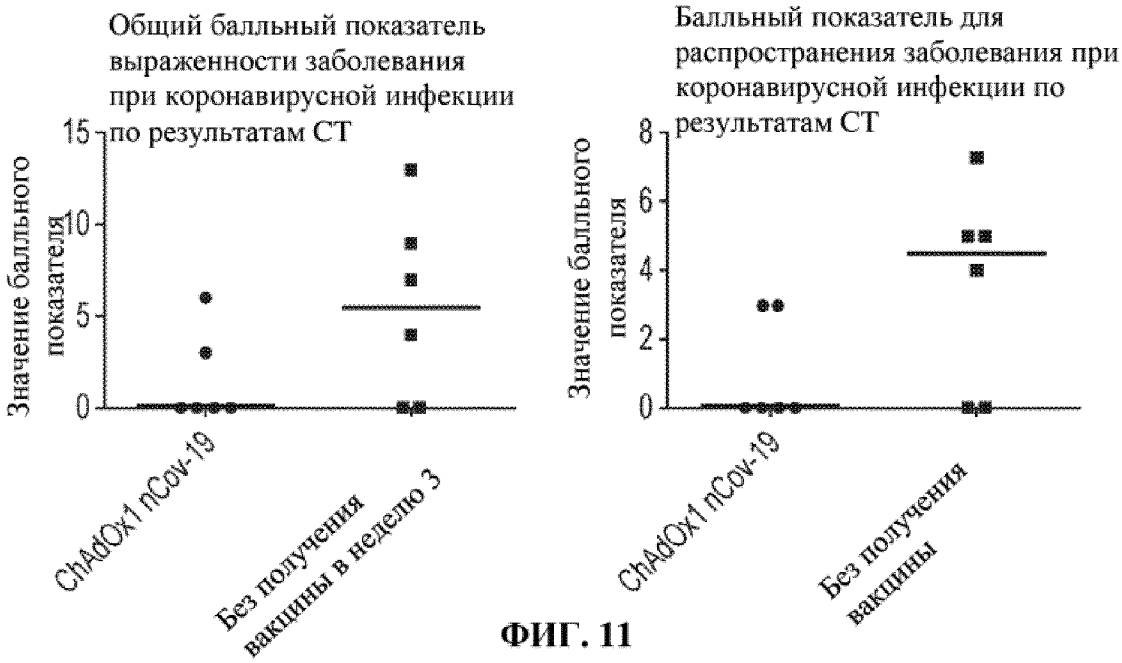
ФИГ. 10B



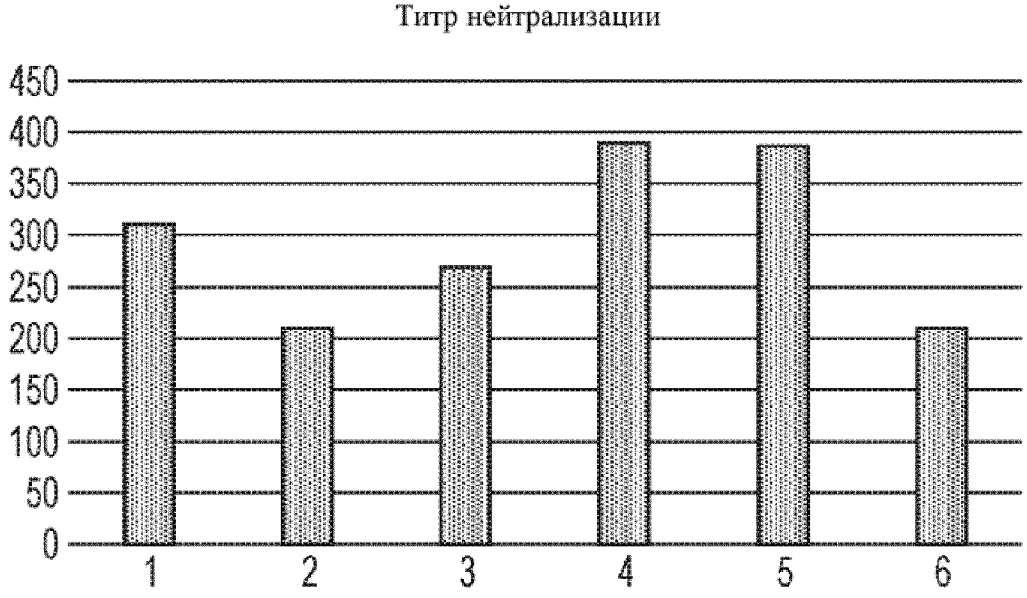
ФИГ. 10C



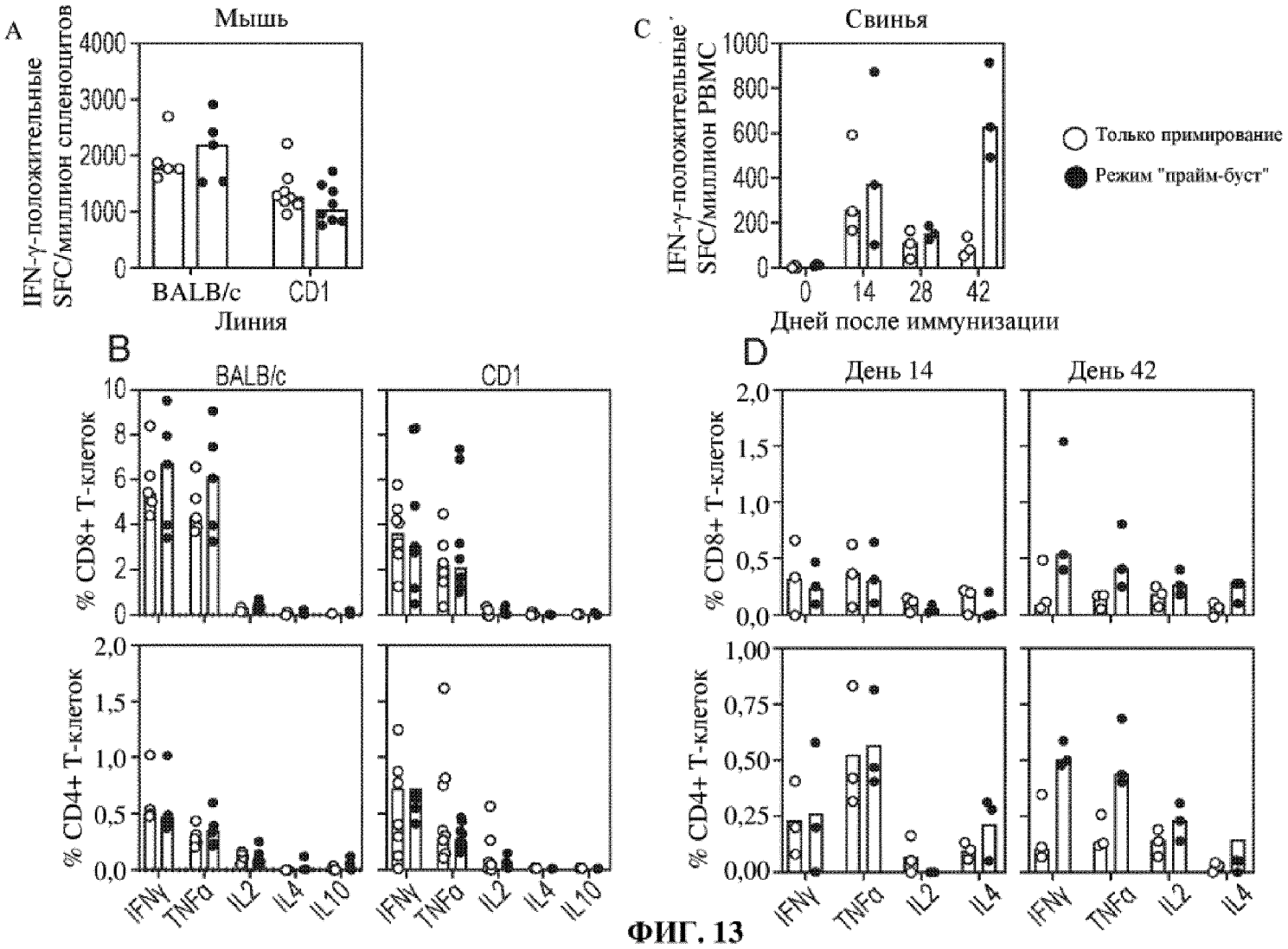
ФИГ. 10D



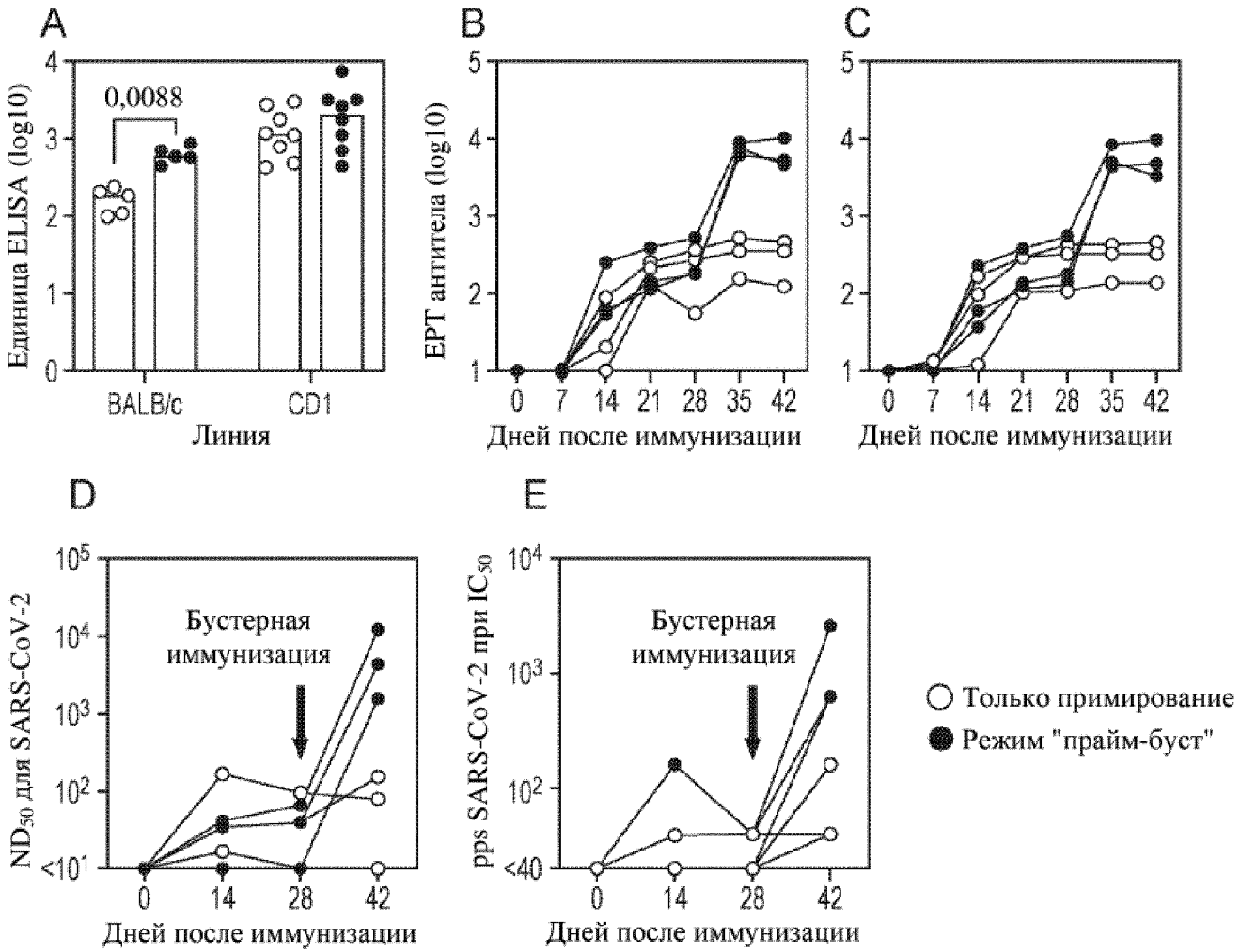
ФИГ. 11


Титр нейтрализации
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6

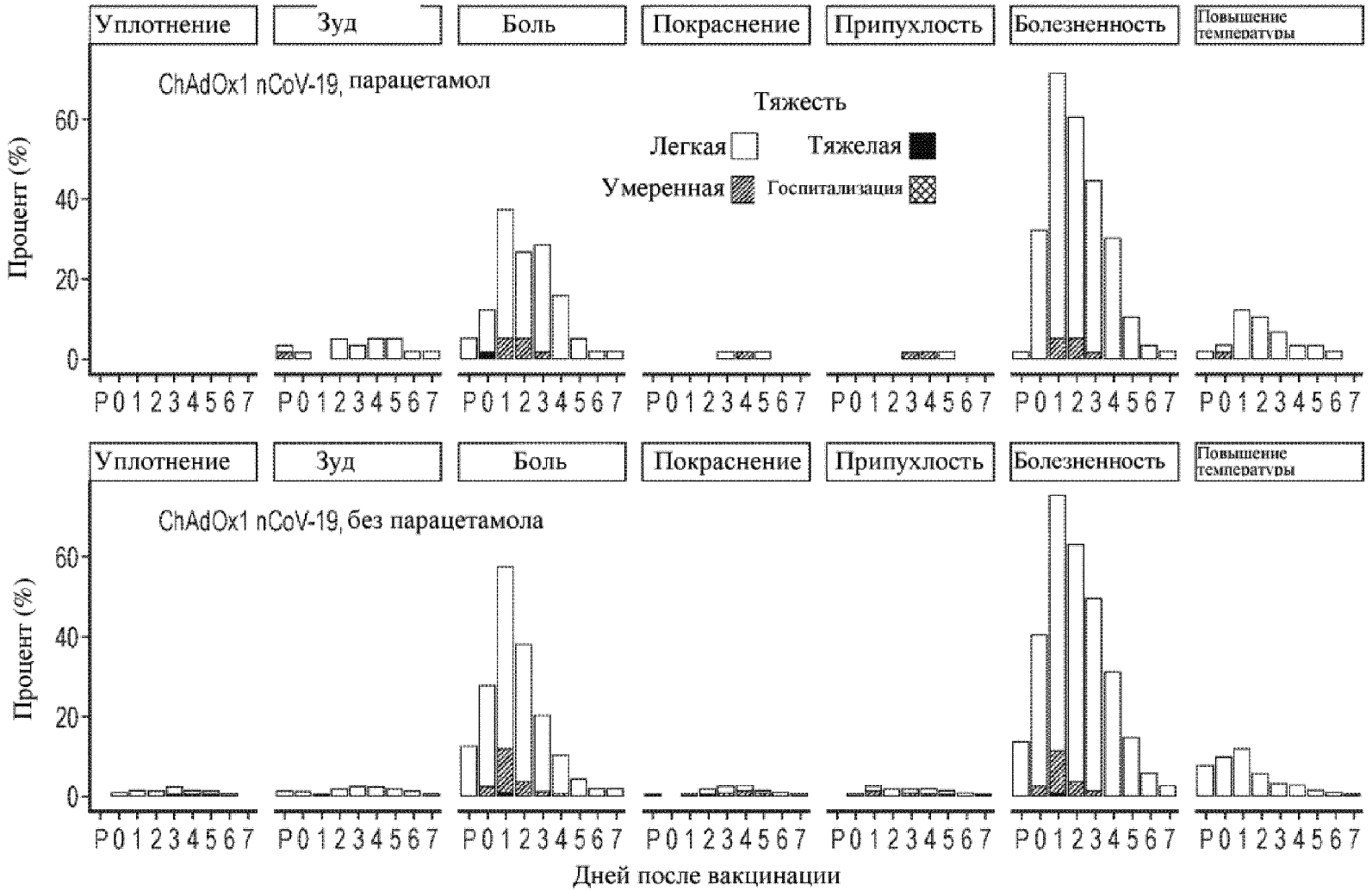
ФИГ. 12


A
Мышь
IFN-γ-положительные SFC/миллион спленоцитов
4000
3000
2000
1000
0
BALB/c
CD1
Линия
C
Свинья
IFN-γ-положительные SFC/миллион PBMC
1000
800
600
400
200
0
0
14
28
42
Дней после иммунизации
Только примирование
Режим "прайм-буст"
B
BALB/c
CD1
% CD8+ Т-клеток
% CD4+ Т-клеток
IFNγ
TNFα
IL2
IL4
IL10
D
День 14
День 42
% CD8+ Т-клеток
% CD4+ Т-клеток
IFNγ
TNFα
IL2
IL4

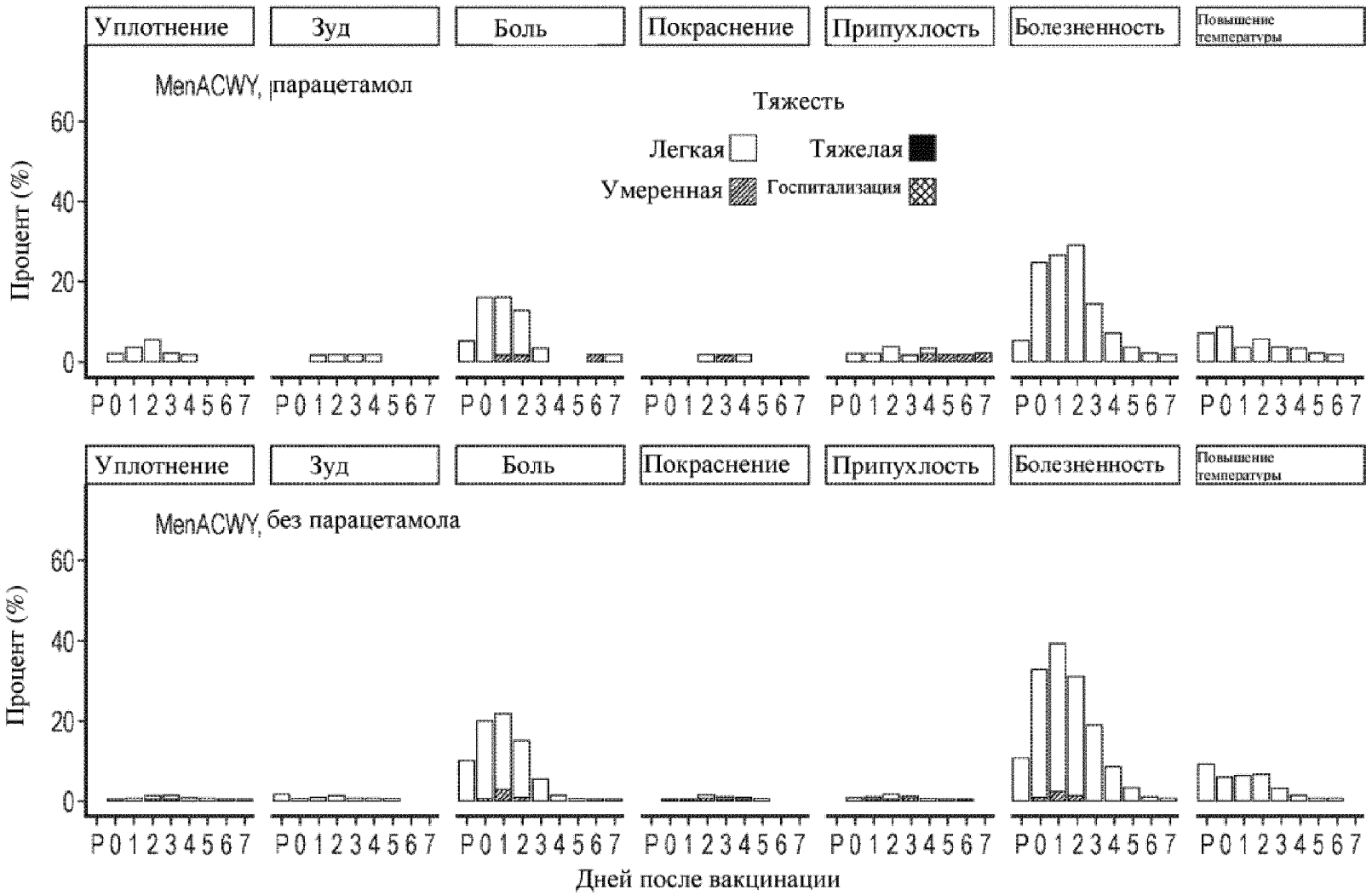
ФИГ. 13


A
B
C
D
E
Единица ELISA (log10)
0,0088
BALB/c
CD1
Линия
ЕРТ антитела (log10)
Дней после иммунизации
Дней после иммунизации
ND_{50} для SARS-CoV-2
Бустерная иммунизация
Дней после иммунизации
pps SARS-CoV-2 при IC_{50}
Бустерная иммунизация
Дней после иммунизации
Только примирование
Режим "прайм-буст"

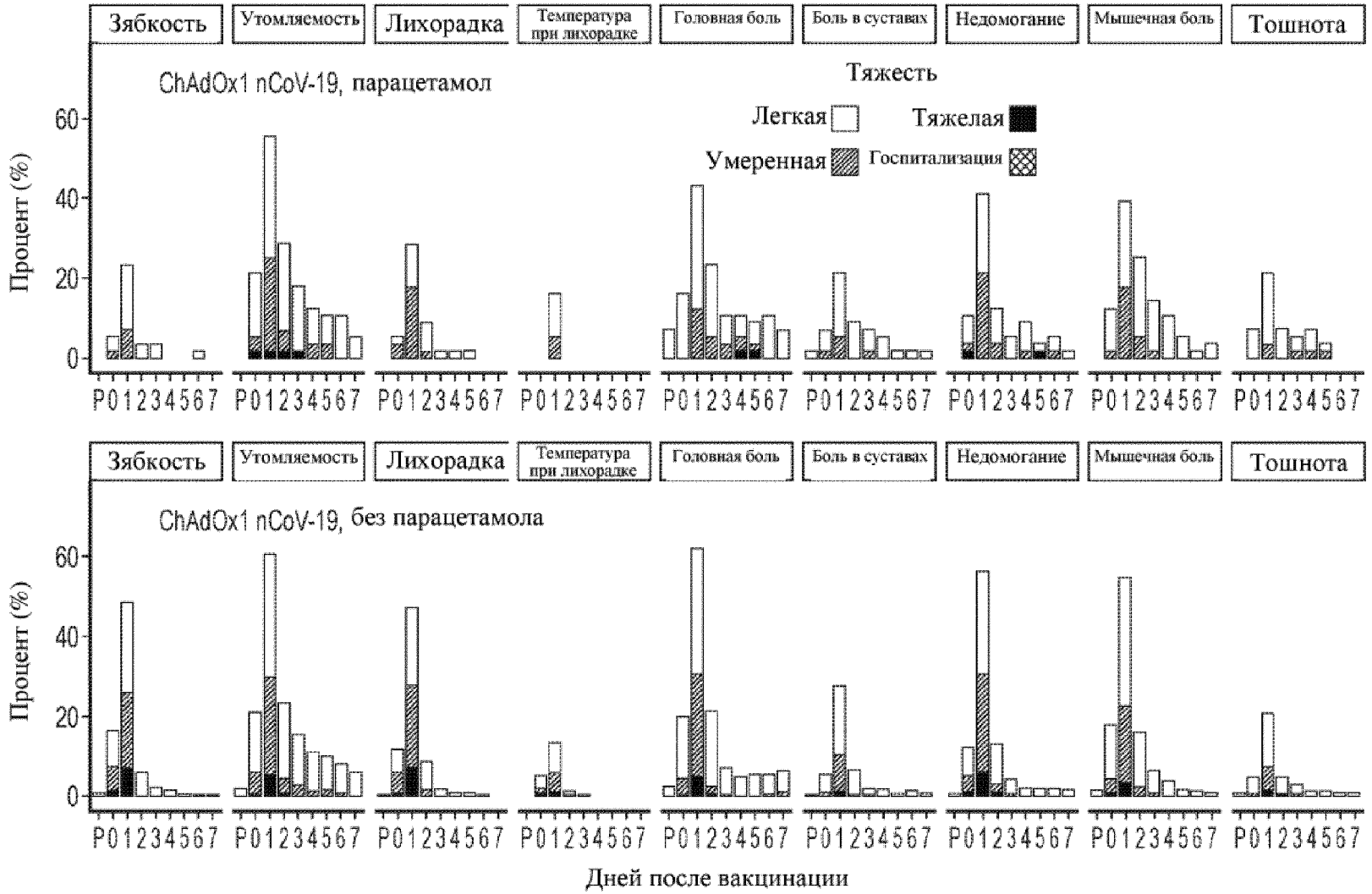
ФИГ. 14


Уплотнение
Зуд
Боль
Покраснение
Припухлость
Болезненность
Повышение температуры
ChAdOx1 nCoV-19, парацетамол
Тяжесть
Легкая
Тяжелая
Умеренная
Госпитализация
Процент (%)
0
20
40
60
P 0 1 2 3 4 5 6 7
ChAdOx1 nCoV-19, без парацетамола
Дней после вакцинации

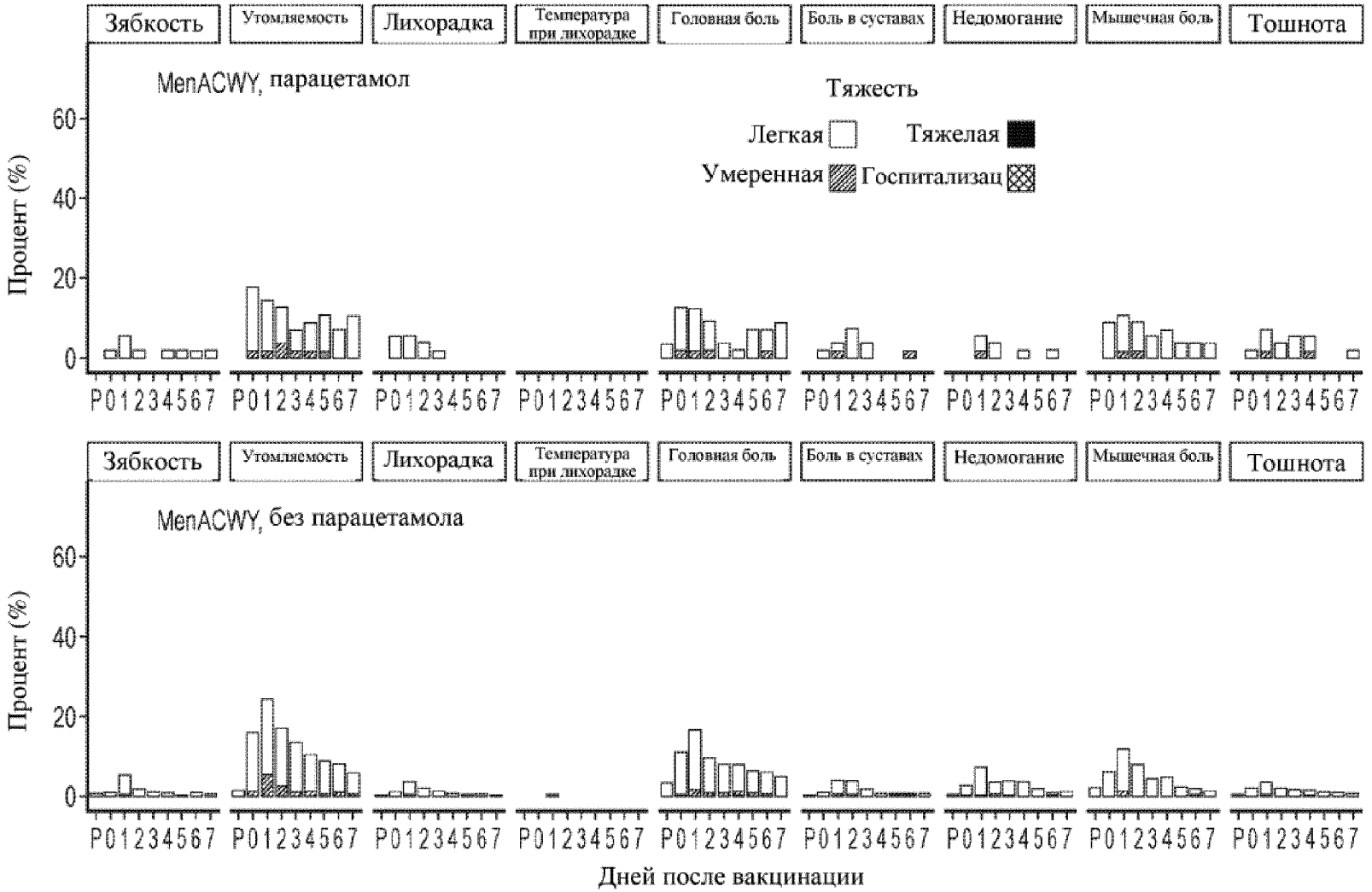
ФИГ. 15А



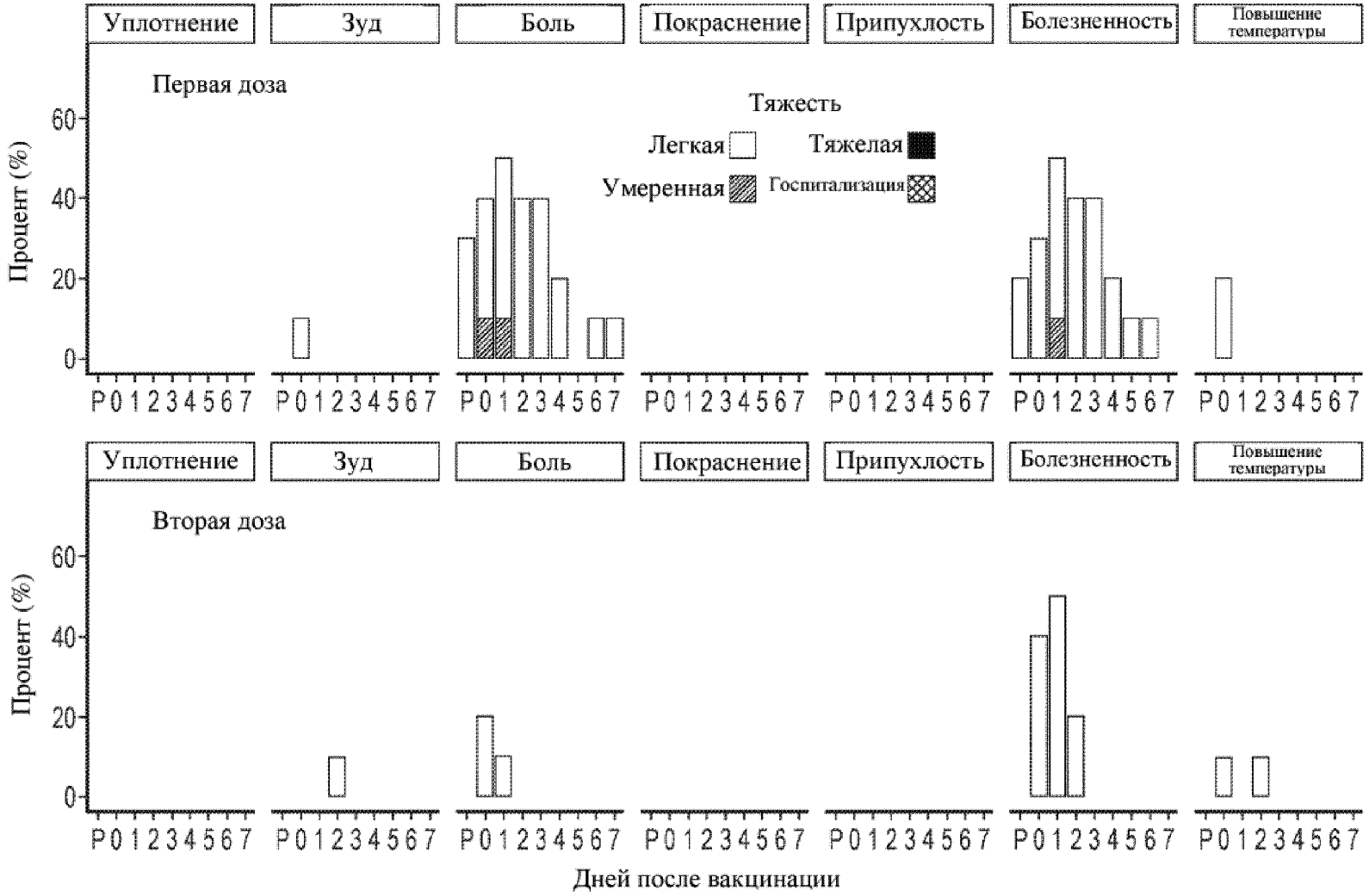
ФИГ. 15А (продолжение)


Зябкость
Утомляемость
Лихорадка
Температура при лихорадке
Головная боль
Боль в суставах
Недомогание
Мышечная боль
Тошнота
ChAdOx1 nCoV-19, парацетамол
Тяжесть
Легкая
Тяжелая
Умеренная
Госпитализация
Процент (%)
0
20
40
60
P01234567
ChAdOx1 nCoV-19, без парацетамола
Дней после вакцинации

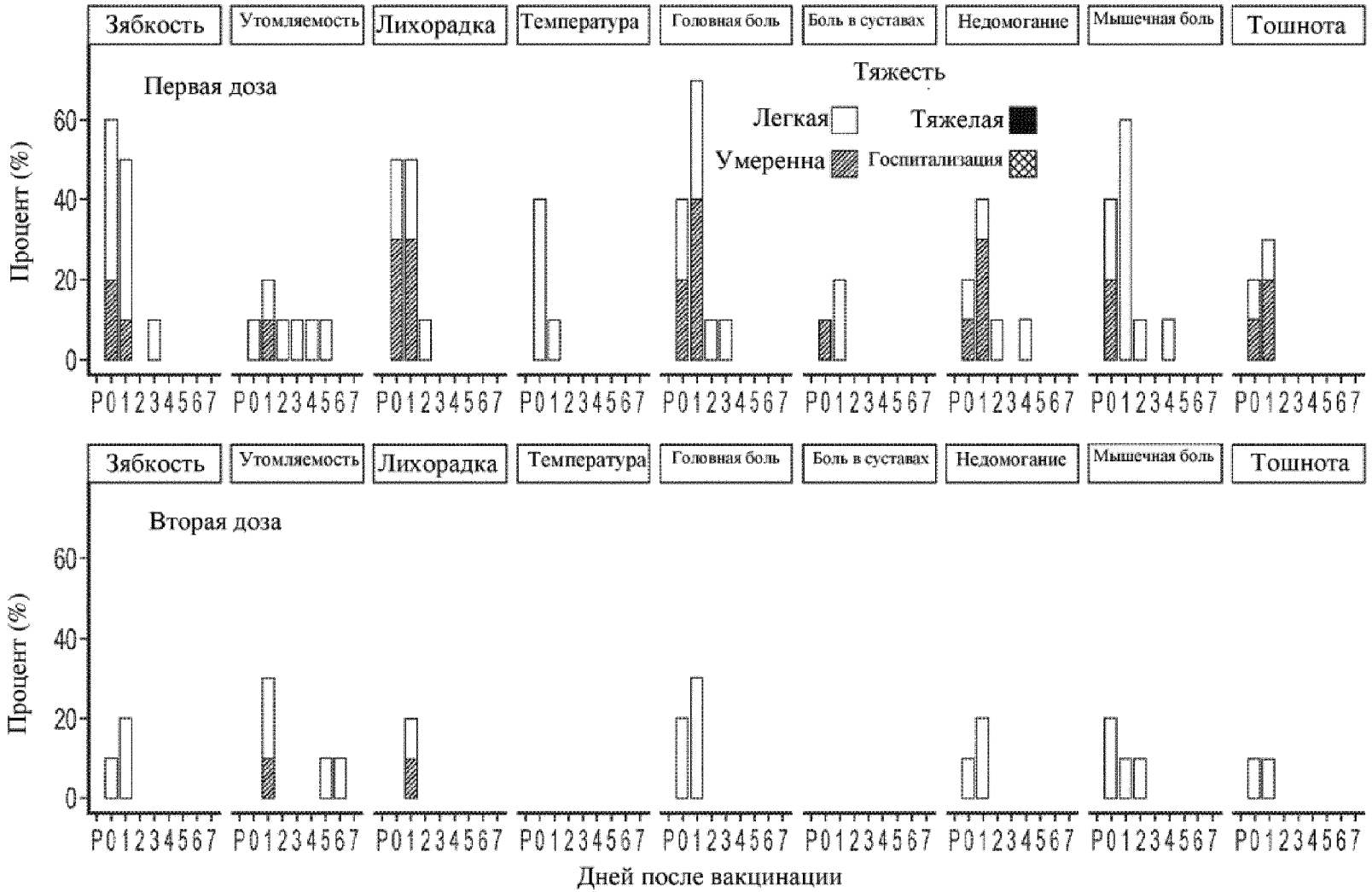
ФИГ. 15B



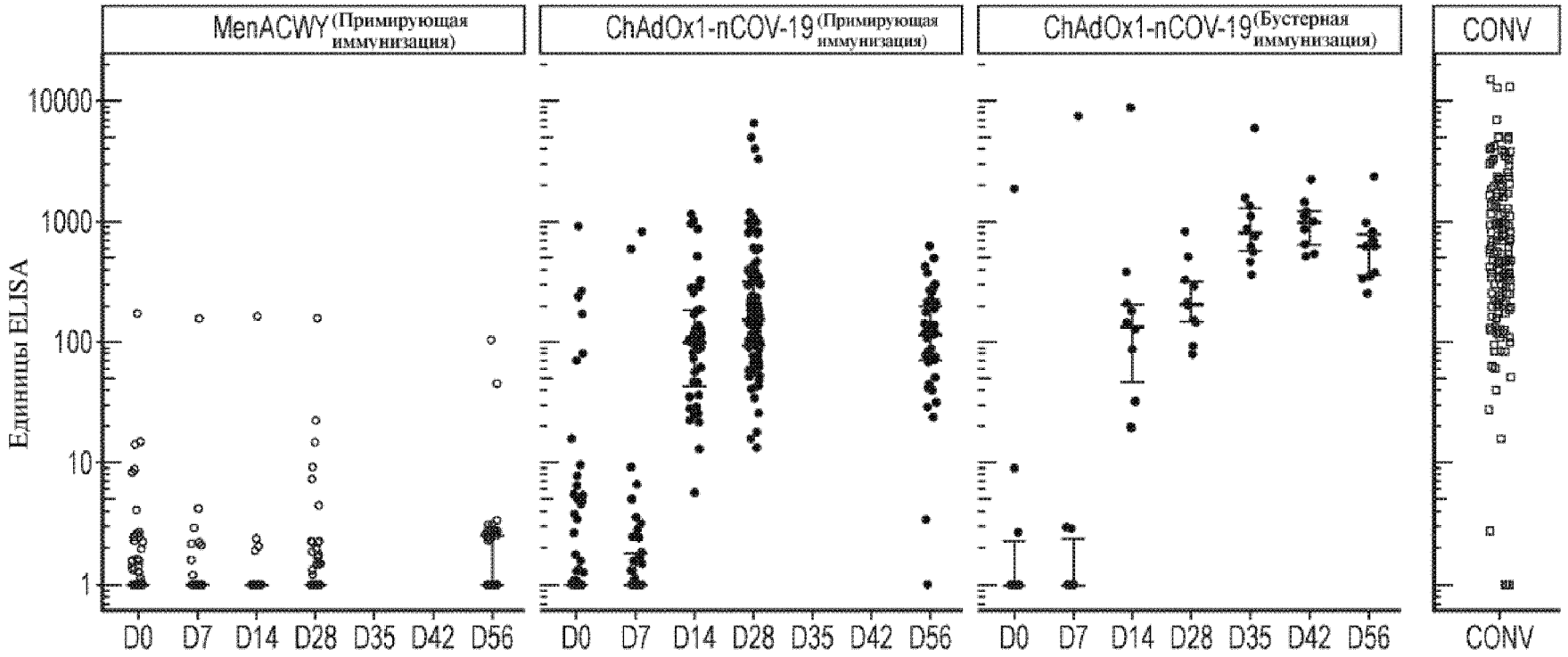
ФИГ. 15B (продолжение)


Уплотнение
Зуд
Боль
Покраснение
Припухлость
Болезненность
Повышение температуры
Первая доза
Тяжесть
Легкая
Тяжелая
Умеренная
Госпитализация
Процент (%)
60
40
20
0
P 0 1 2 3 4 5 6 7
Вторая доза
Дней после вакцинации

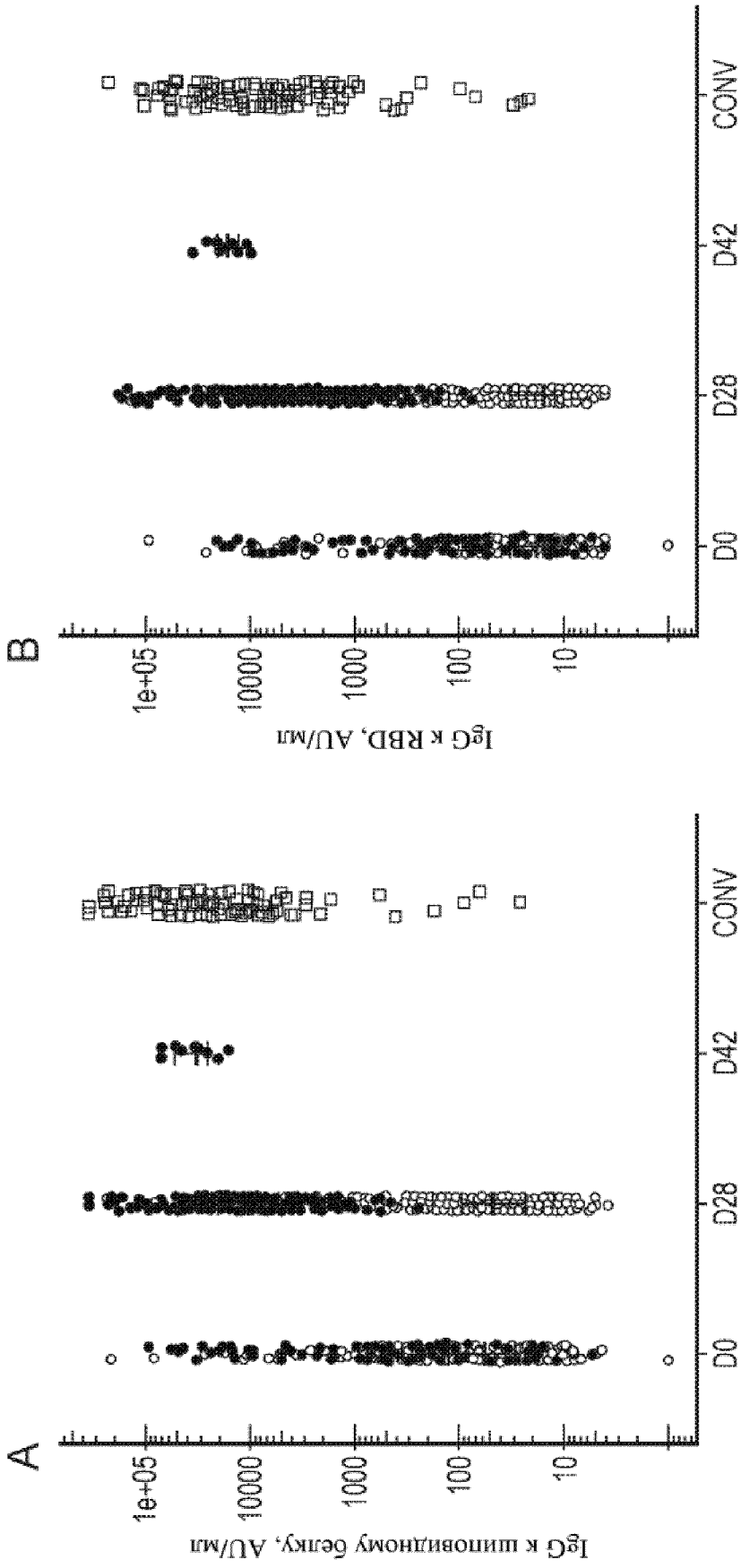
ФИГ. 16А


Зябкость
Утомляемость
Лихорадка
Температура
Головная боль
Боль в суставах
Недомогание
Мышечная боль
Тошнота
Первая доза
Тяжесть
Легкая
Тяжелая
Умеренна
Госпитализация
Процент (%)
0
20
40
60
P01234567
Вторая доза
Дней после вакцинации

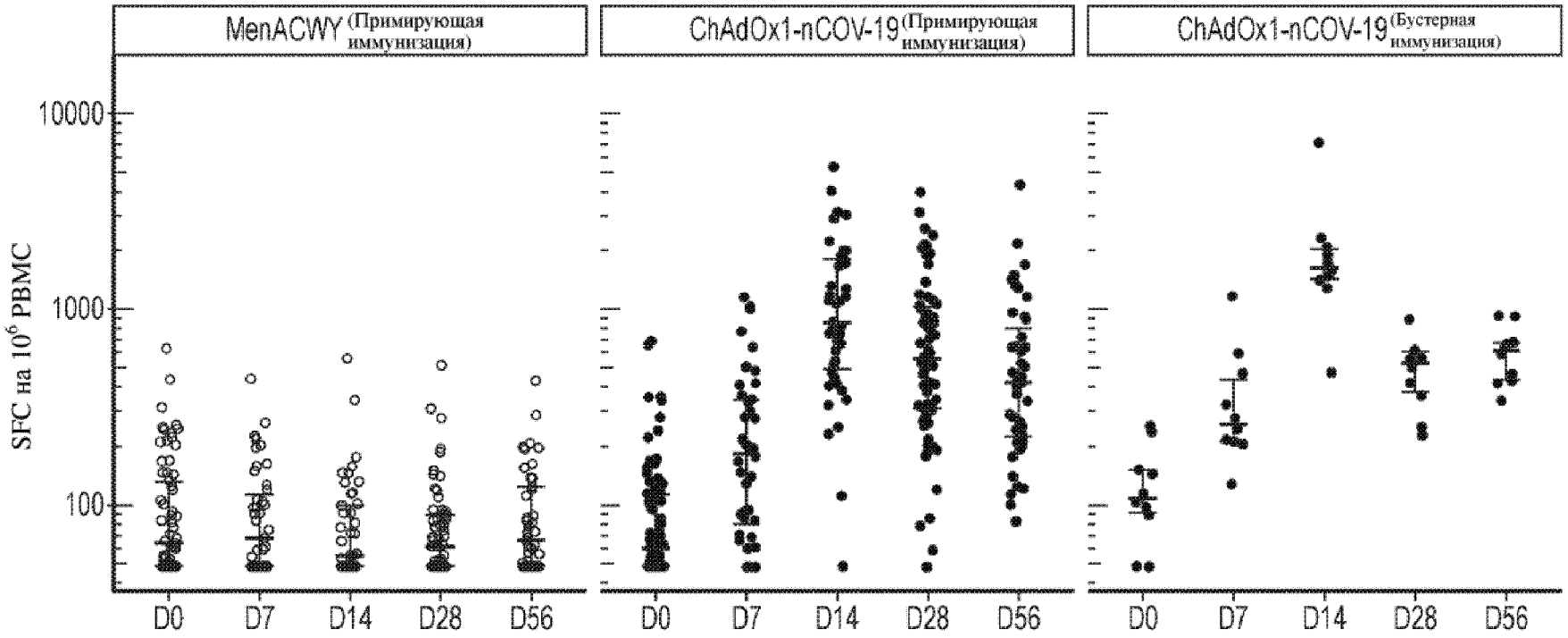
ФИГ. 16B


MenACWY (Примирующая иммунизация)
ChAdOx1-nCOV-19 (Примирующая иммунизация)
ChAdOx1-nCOV-19 (Бустерная иммунизация)
CONV
Единицы ELISA
10000
1000
100
10
1
D0
D7
D14
D28
D35
D42
D56
CONV

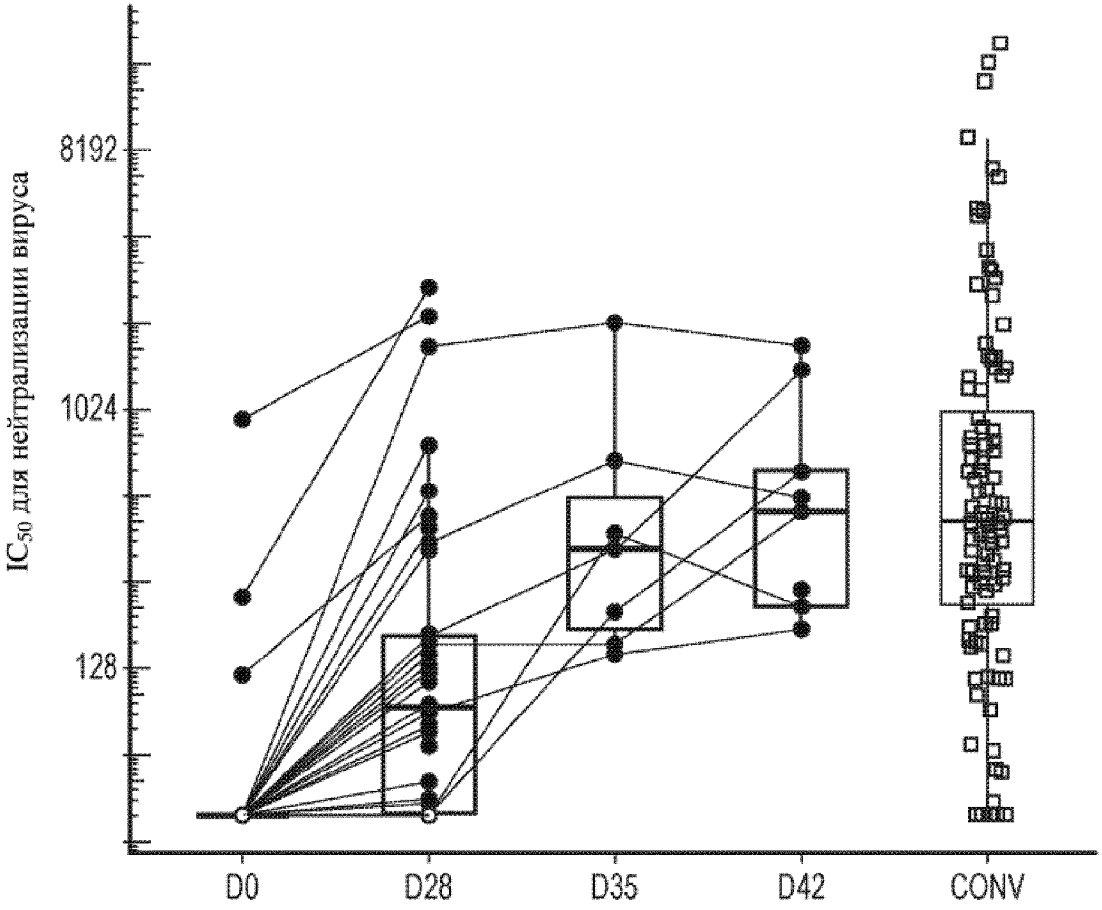
ФИГ. 17


A
IgG к шиповидному белку, AU/мл
1e+05
10000
1000
100
10
D0
D28
D42
CONV
B
IgG к RBD, AU/мл
1e+05
10000
1000
100
10
D0
D28
D42
CONV

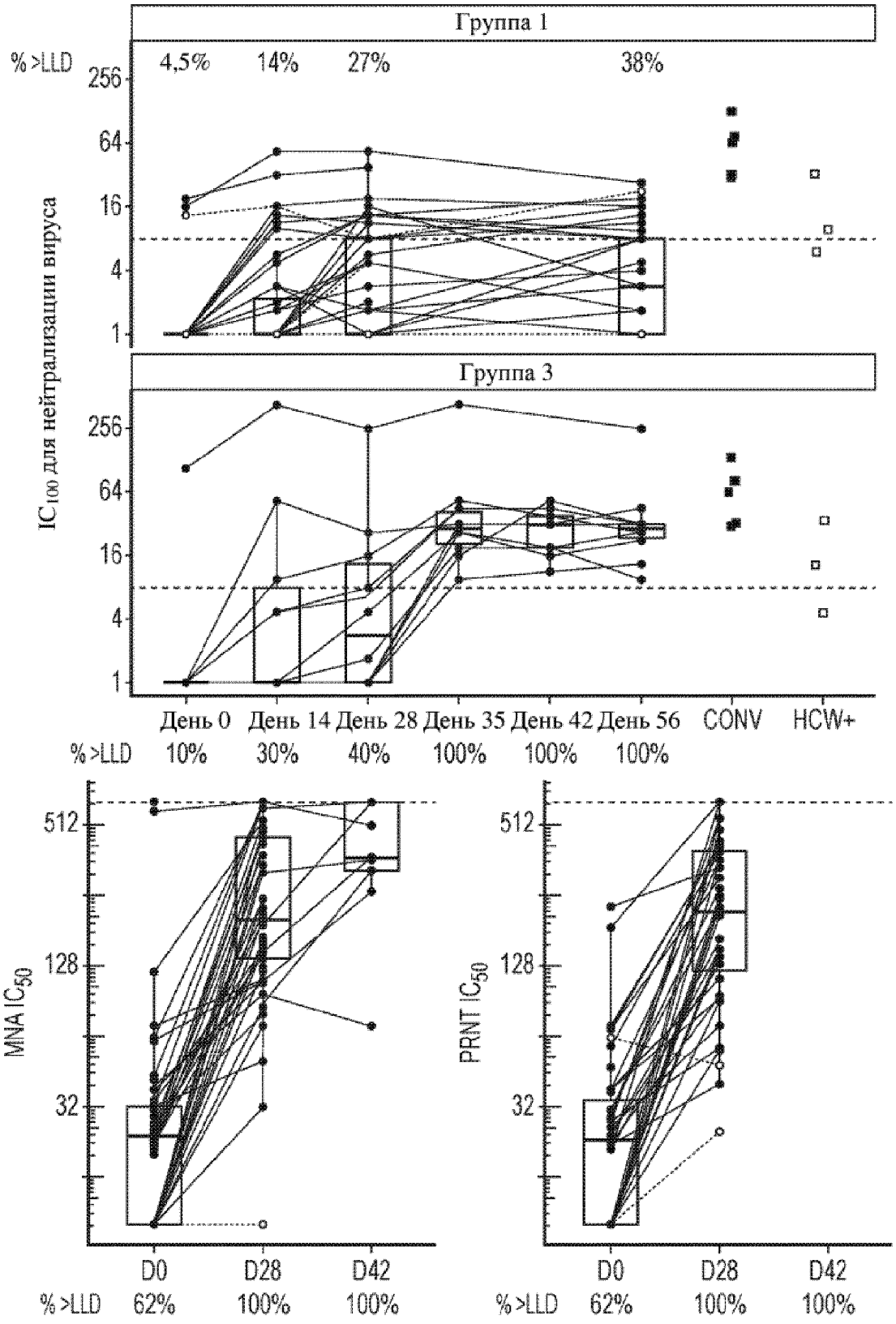
ФИГ. 18


MenACWY (Примирующая иммунизация)
ChAdOx1-nCOV-19 (Примирующая иммунизация)
ChAdOx1-nCOV-19 (Бустерная иммунизация)
SFC на 10^6 PBMC
10000
1000
100
D0
D7
D14
D28
D56

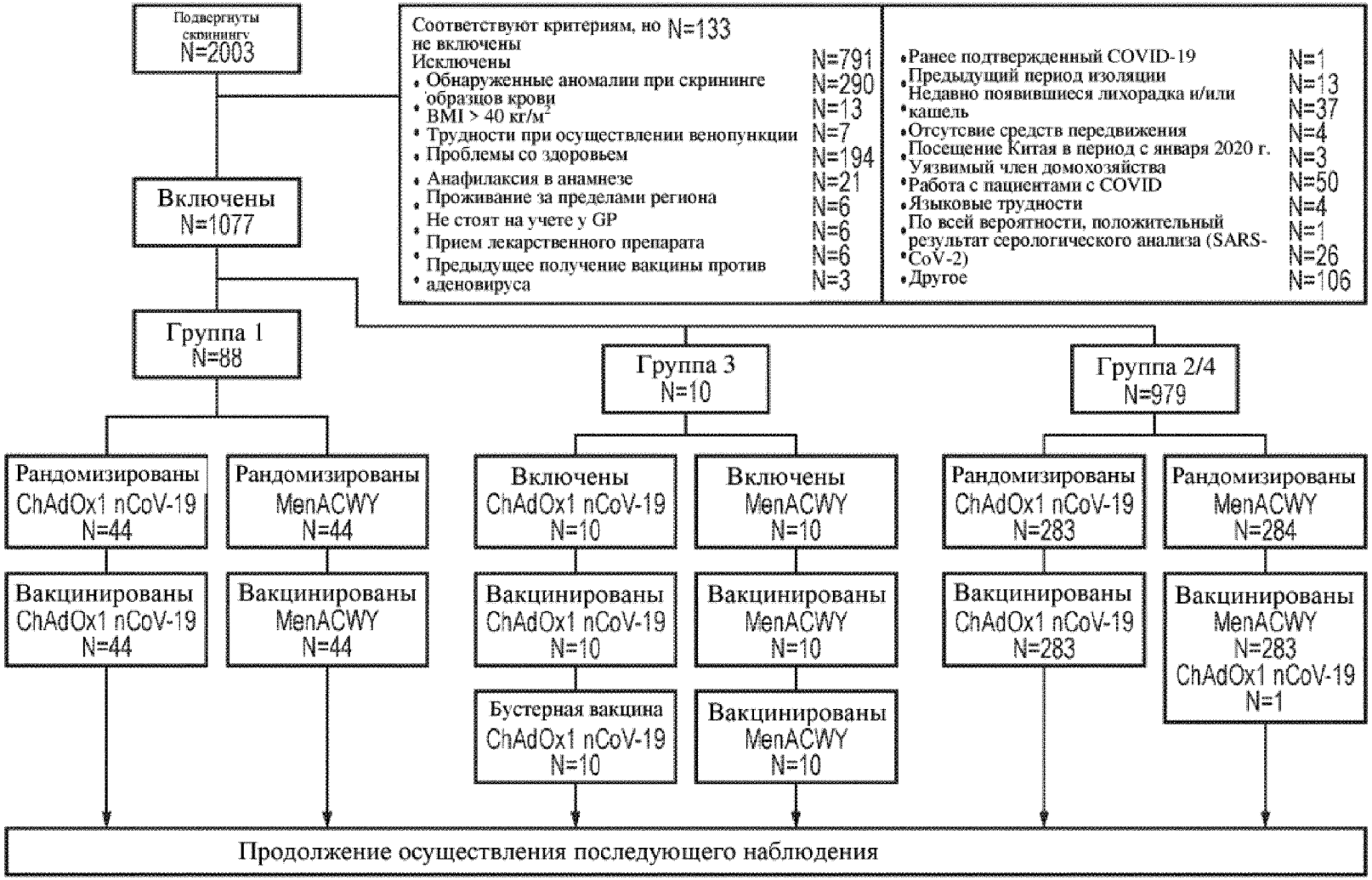
ФИГ. 19


IC50 для нейтрализации вируса
8192
1024
128
D0
D28
D35
D42
CONV

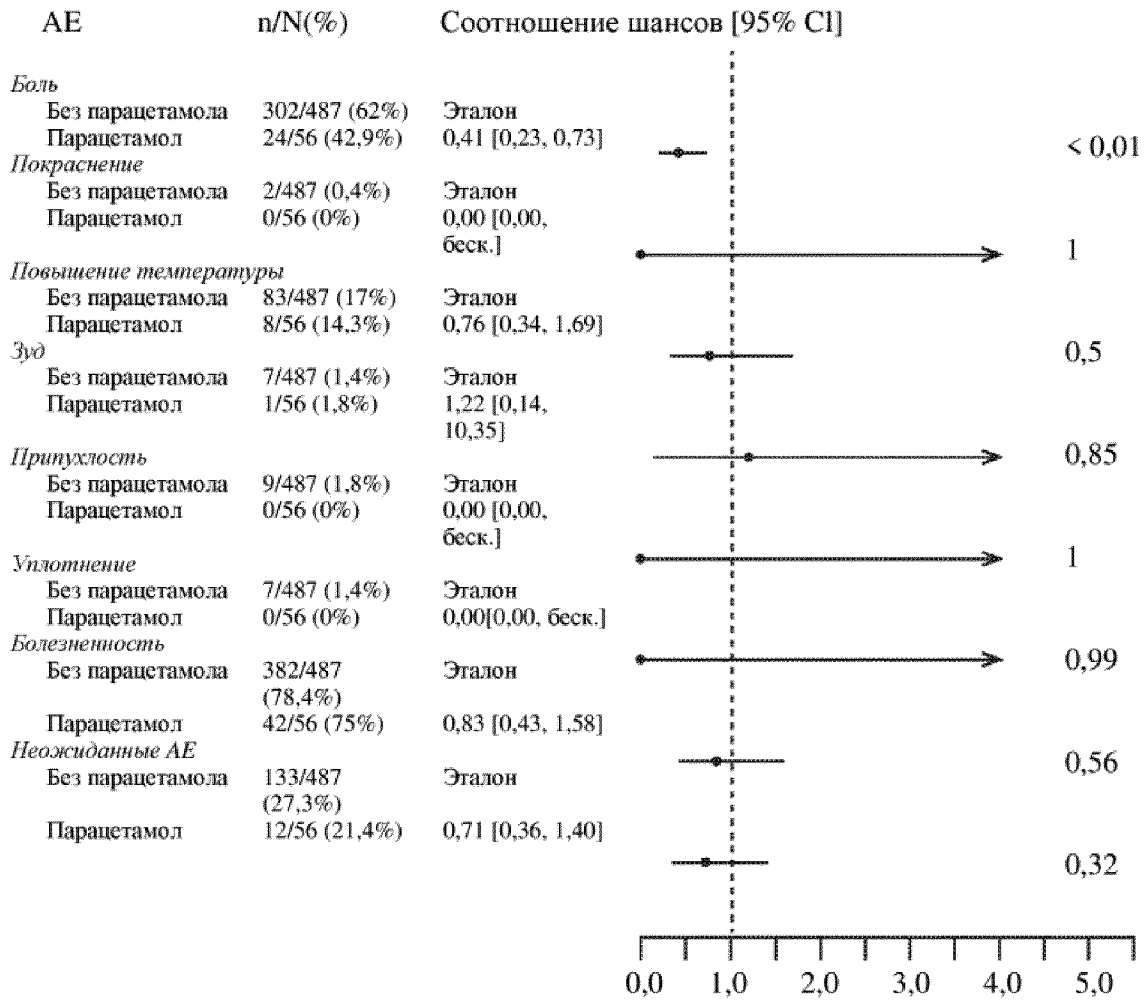
ФИГ. 20


Группа 1
% >LLD
4,5%
14%
27%
38%
256
64
16
4
1
IC100 для нейтрализации вируса
Группа 3
256
64
16
4
1
День 0
День 14
День 28
День 35
День 42
День 56
CONV
HCW+
% >LLD
10%
30%
40%
100%
100%
100%
512
128
32
MNA IC50
D0
D28
D42
% >LLD
62%
100%
100%
512
128
32
PRNT IC50
D0
D28
D42
% >LLD
62%
100%
100%

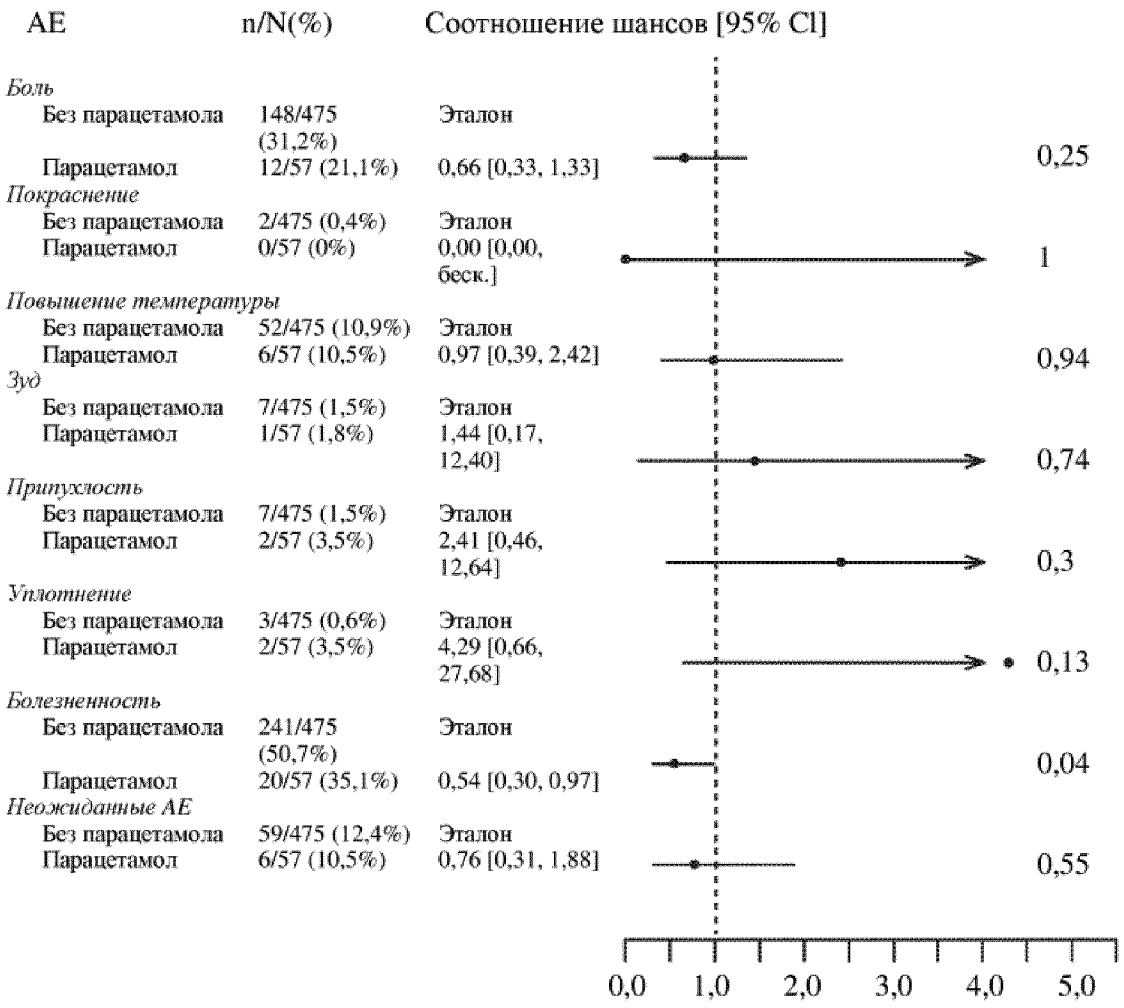
ФИГ. 21


Подвергнуты скринингу N=2003
Соответствуют критериям, но не включены N=133
Исключены
Обнаруженные аномалии при скрининге образцов крови N=791
BMI > 40 кг/м2 N=290
Трудности при осуществлении венопункции N=13
Проблемы со здоровьем N=7
Анафилаксия в анамнезе N=194
Проживание за пределами региона N=21
Не стоят на учете у GP N=6
Прием лекарственного препарата N=6
Предыдущее получение вакцины против аденовируса N=6
N=3
Ранее подтвержденный COVID-19 N=1
Предыдущий период изоляции N=13
Недавно появившиеся лихорадка и/или кашель N=37
Отсутсвие средств передвижения N=4
Посещение Китая в период с января 2020 г. N=3
Уязвимый член домохозяйства N=50
Работа с пациентами с COVID N=4
Языковые трудности N=1
По всей вероятности, положительный результат серологического анализа (SARS-CoV-2) N=26
Другое N=106
Включены N=1077
Группа 1 N=88
Группа 3 N=10
Группа 2/4 N=979
Рандомизированы ChAdOx1 nCoV-19 N=44
Рандомизированы MenACWY N=44
Включены ChAdOx1 nCoV-19 N=10
Включены MenACWY N=10
Рандомизированы ChAdOx1 nCoV-19 N=283
Рандомизированы MenACWY N=284
Вакцинированы ChAdOx1 nCoV-19 N=44
Вакцинированы MenACWY N=44
Вакцинированы ChAdOx1 nCoV-19 N=10
Вакцинированы MenACWY N=10
Вакцинированы ChAdOx1 nCoV-19 N=283
Вакцинированы MenACWY N=283 ChAdOx1 nCoV-19 N=1
Бустерная вакцина ChAdOx1 nCoV-19 N=10
Вакцинированы MenACWY N=10
Продолжение осуществления последующего наблюдения

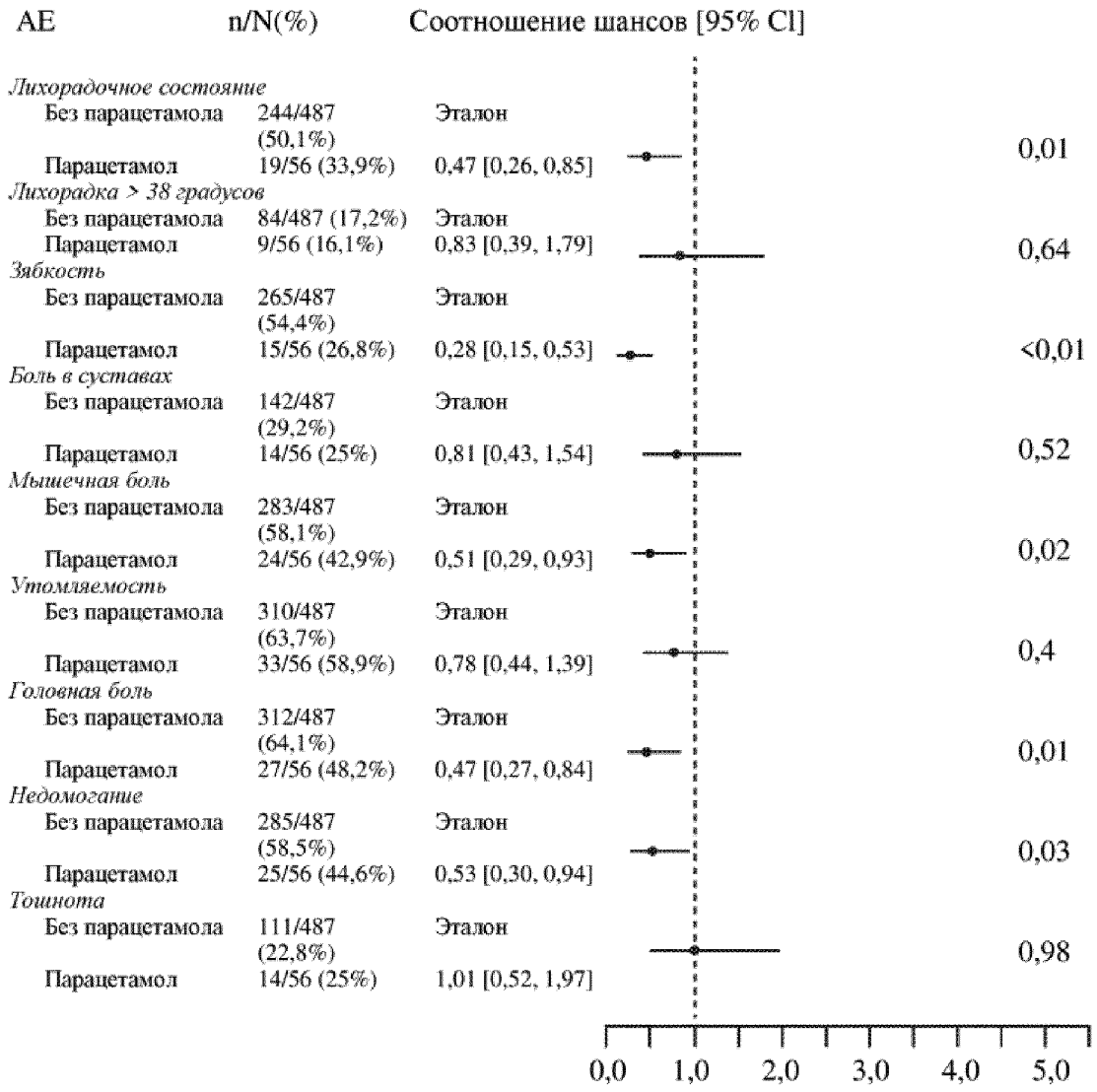
ФИГ. 22


AE
n/N(%)
Соотношение шансов [95% CI]
Боль
Без парацетамола 302/487 (62%) Эталон
Парацетамол 24/56 (42,9%) 0,41 [0,23, 0,73]
Покраснение
Без парацетамола 2/487 (0,4%) Эталон
Парацетамол 0/56 (0%) 0,00 [0,00, беск.]
Повышение температуры
Без парацетамола 83/487 (17%) Эталон
Парацетамол 8/56 (14,3%) 0,76 [0,34, 1,69]
Зуд
Без парацетамола 7/487 (1,4%) Эталон
Парацетамол 1/56 (1,8%) 1,22 [0,14, 10,35]
Припухлость
Без парацетамола 9/487 (1,8%) Эталон
Парацетамол 0/56 (0%) 0,00 [0,00, беск.]
Уплотнение
Без парацетамола 7/487 (1,4%) Эталон
Парацетамол 0/56 (0%) 0,00[0,00, беск.]
Болезненность
Без парацетамола 382/487 (78,4%) Эталон
Парацетамол 42/56 (75%) 0,83 [0,43, 1,58]
Неожиданные АЕ
Без парацетамола 133/487 (27,3%) Эталон
Парацетамол 12/56 (21,4%) 0,71 [0,36, 1,40]
< 0,01
1
0,5
0,85
1
0,99
0,56
0,32
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
5,0

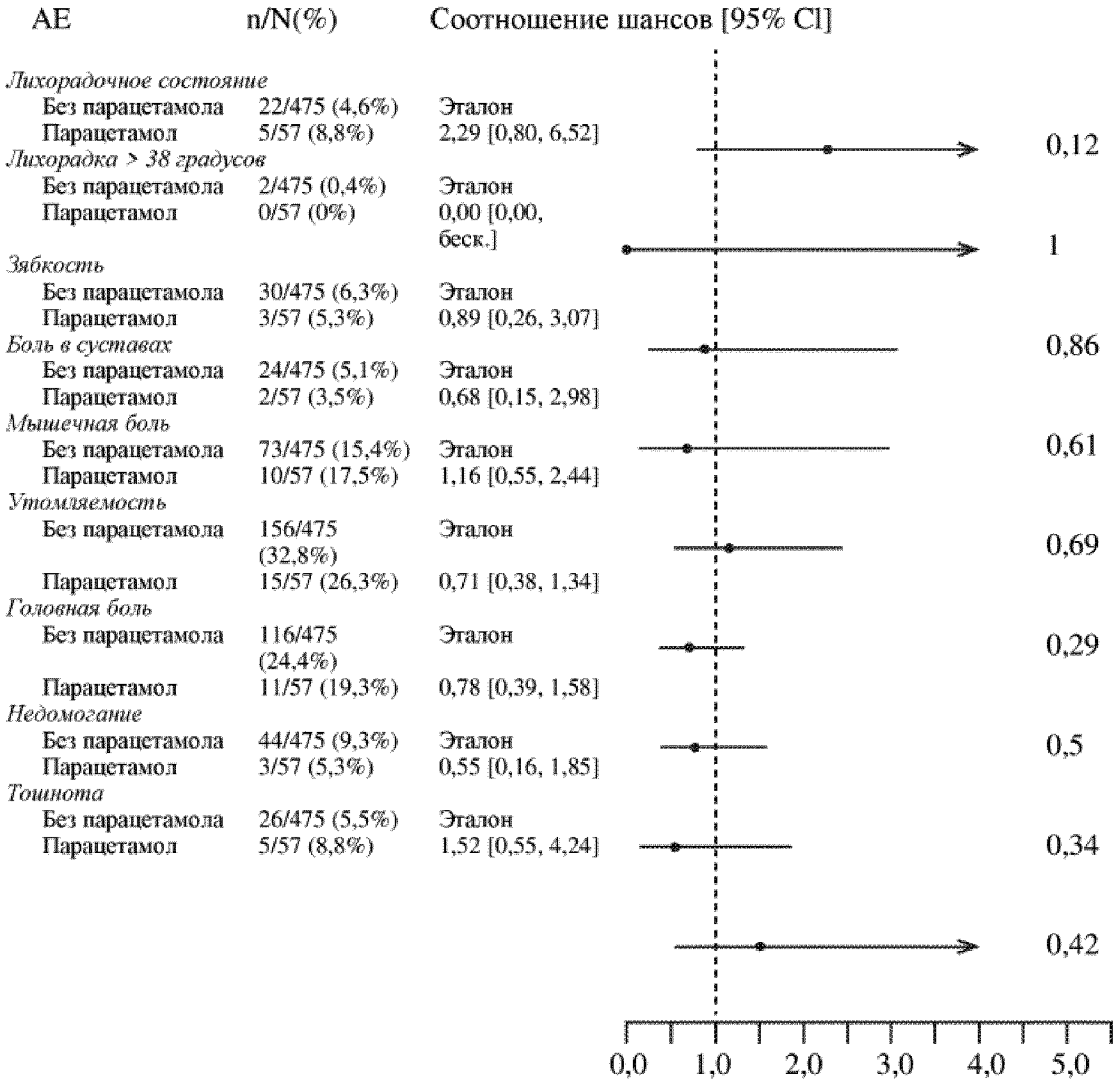
ФИГ. 23А


AE
n/N(%)
Соотношение шансов [95% CI]
Боль
Без парацетамола 148/475 (31,2%) Эталон
Парацетамол 12/57 (21,1%) 0,66 [0,33, 1,33]
0,25
Покраснение
Без парацетамола 2/475 (0,4%) Эталон
Парацетамол 0/57 (0%) 0,00 [0,00, беск.]
1
Повышение температуры
Без парацетамола 52/475 (10,9%) Эталон
Парацетамол 6/57 (10,5%) 0,97 [0,39, 2,42]
0,94
Зуд
Без парацетамола 7/475 (1,5%) Эталон
Парацетамол 1/57 (1,8%) 1,44 [0,17, 12,40]
0,74
Припухлость
Без парацетамола 7/475 (1,5%) Эталон
Парацетамол 2/57 (3,5%) 2,41 [0,46, 12,64]
0,3
Уплотнение
Без парацетамола 3/475 (0,6%) Эталон
Парацетамол 2/57 (3,5%) 4,29 [0,66, 27,68]
0,13
Болезненность
Без парацетамола 241/475 (50,7%) Эталон
Парацетамол 20/57 (35,1%) 0,54 [0,30, 0,97]
0,04
Неожиданные AE
Без парацетамола 59/475 (12,4%) Эталон
Парацетамол 6/57 (10,5%) 0,76 [0,31, 1,88]
0,55
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
5,0

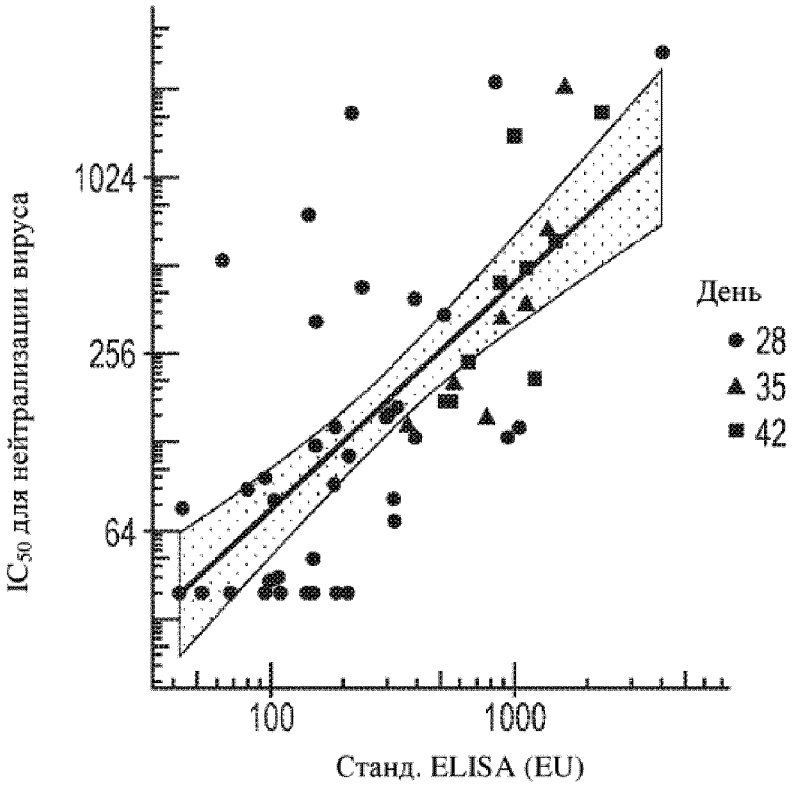
ФИГ. 23B

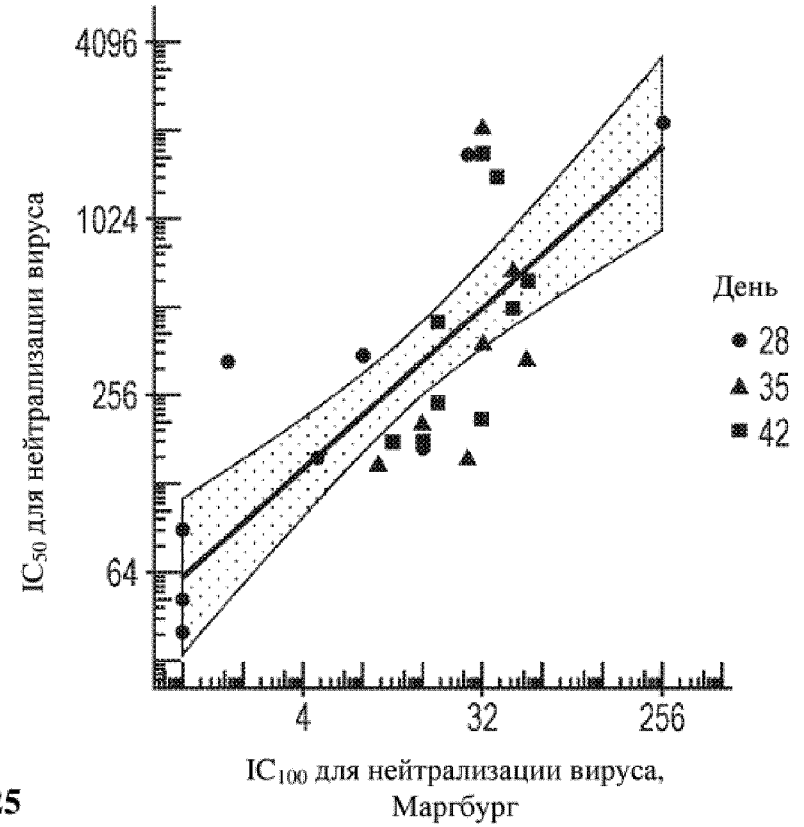

AE
n/N(%)
Соотношение шансов [95% CI]
Лихорадочное состояние
Без парацетамола 244/487 (50,1%)
Парацетамол 19/56 (33,9%) 0,47 [0,26, 0,85] 0,01
Лихорадка > 38 градусов
Без парацетамола 84/487 (17,2%) Эталон
Парацетамол 9/56 (16,1%) 0,83 [0,39, 1,79] 0,64
Зябкость
Без парацетамола 265/487 (54,4%) Эталон
Парацетамол 15/56 (26,8%) 0,28 [0,15, 0,53] <0,01
Боль в суставах
Без парацетамола 142/487 (29,2%) Эталон
Парацетамол 14/56 (25%) 0,81 [0,43, 1,54] 0,52
Мышечная боль
Без парацетамола 283/487 (58,1%) Эталон
Парацетамол 24/56 (42,9%) 0,51 [0,29, 0,93] 0,02
Утомляемость
Без парацетамола 310/487 (63,7%) Эталон
Парацетамол 33/56 (58,9%) 0,78 [0,44, 1,39] 0,4
Головная боль
Без парацетамола 312/487 (64,1%) Эталон
Парацетамол 27/56 (48,2%) 0,47 [0,27, 0,84] 0,01
Недомогание
Без парацетамола 285/487 (58,5%) Эталон
Парацетамол 25/56 (44,6%) 0,53 [0,30, 0,94] 0,03
Тошнота
Без парацетамола 111/487 (22,8%) Эталон
Парацетамол 14/56 (25%) 1,01 [0,52, 1,97] 0,98
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
5,0

ФИГ. 24А

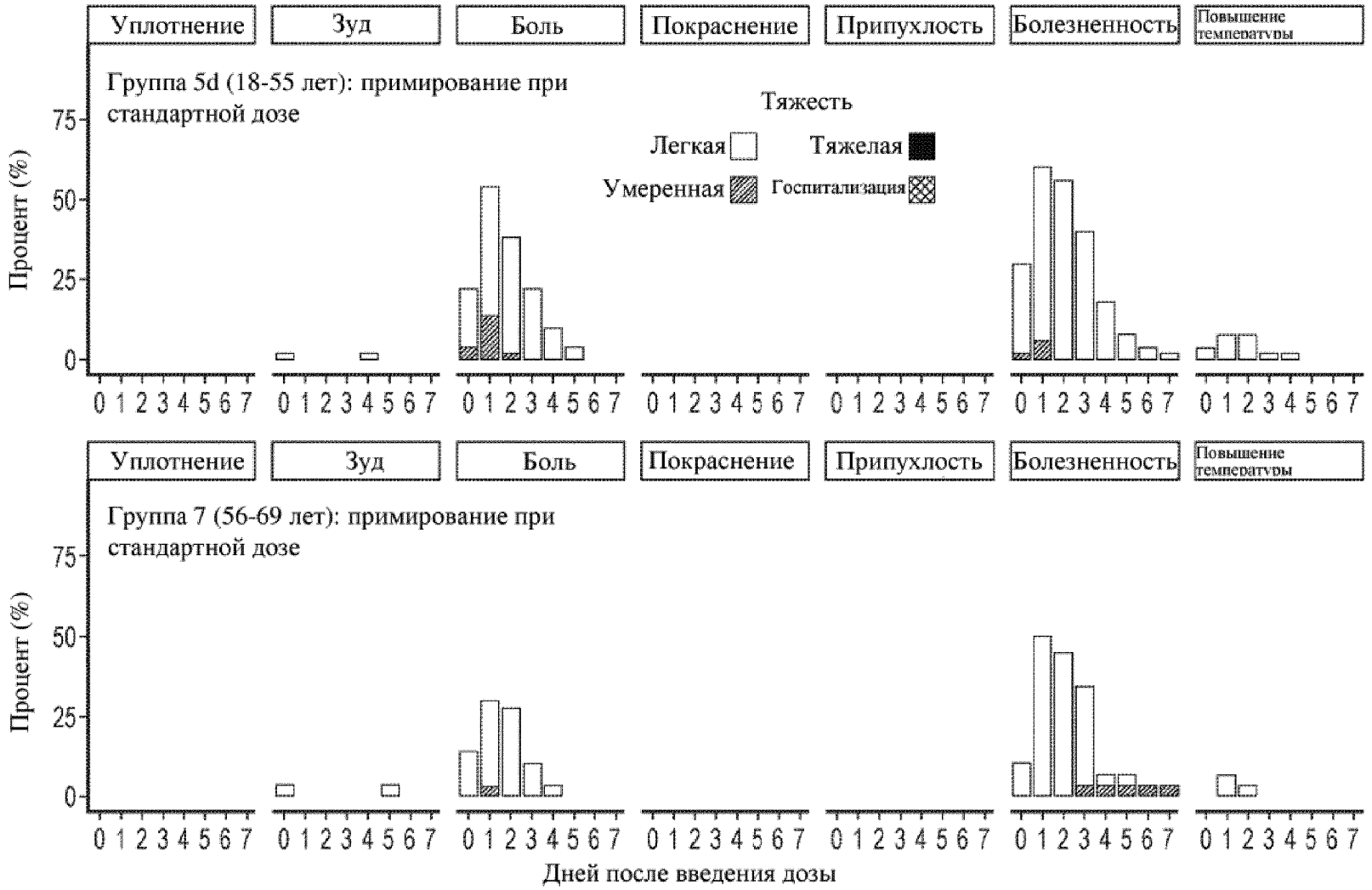

AE
n/N(%)
Соотношение шансов [95% CI]
Лихорадочное состояние
Без парацетамола 22/475 (4,6%) Эталон
Парацетамол 5/57 (8,8%) 2,29 [0,80, 6,52]
Лихорадка > 38 градусов
Без парацетамола 2/475 (0,4%) Эталон
Парацетамол 0/57 (0%) 0,00 [0,00, беск.]
Зябкость
Без парацетамола 30/475 (6,3%) Эталон
Парацетамол 3/57 (5,3%) 0,89 [0,26, 3,07]
Боль в суставах
Без парацетамола 24/475 (5,1%) Эталон
Парацетамол 2/57 (3,5%) 0,68 [0,15, 2,98]
Мышечная боль
Без парацетамола 73/475 (15,4%) Эталон
Парацетамол 10/57 (17,5%) 1,16 [0,55, 2,44]
Утомляемость
Без парацетамола 156/475 (32,8%) Эталон
Парацетамол 15/57 (26,3%) 0,71 [0,38, 1,34]
Головная боль
Без парацетамола 116/475 (24,4%) Эталон
Парацетамол 11/57 (19,3%) 0,78 [0,39, 1,58]
Недомогание
Без парацетамола 44/475 (9,3%) Эталон
Парацетамол 3/57 (5,3%) 0,55 [0,16, 1,85]
Тошнота
Без парацетамола 26/475 (5,5%) Эталон
Парацетамол 5/57 (8,8%) 1,52 [0,55, 4,24]
0,12
1
0,86
0,61
0,69
0,29
0,5
0,34
0,42
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
5,0

ФИГ. 24B

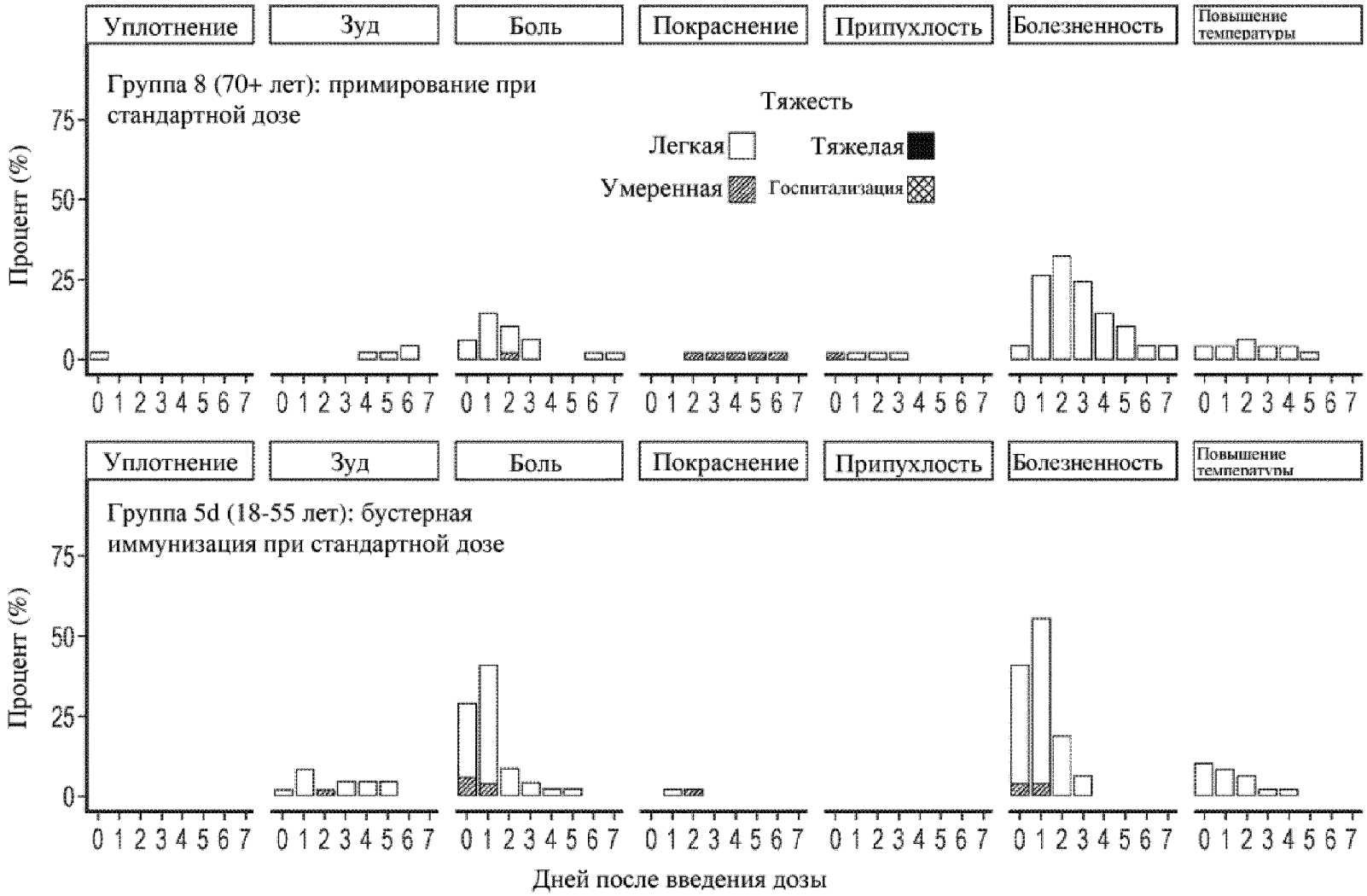

IC50 для нейтрализации вируса
1024
256
64
100
1000
Станд. ELISA (EU)
День
28
35
42


IC50 для нейтрализации вируса
4096
1024
256
64
4
32
256
IC100 для нейтрализации вируса, Маргбург
День
28
35
42

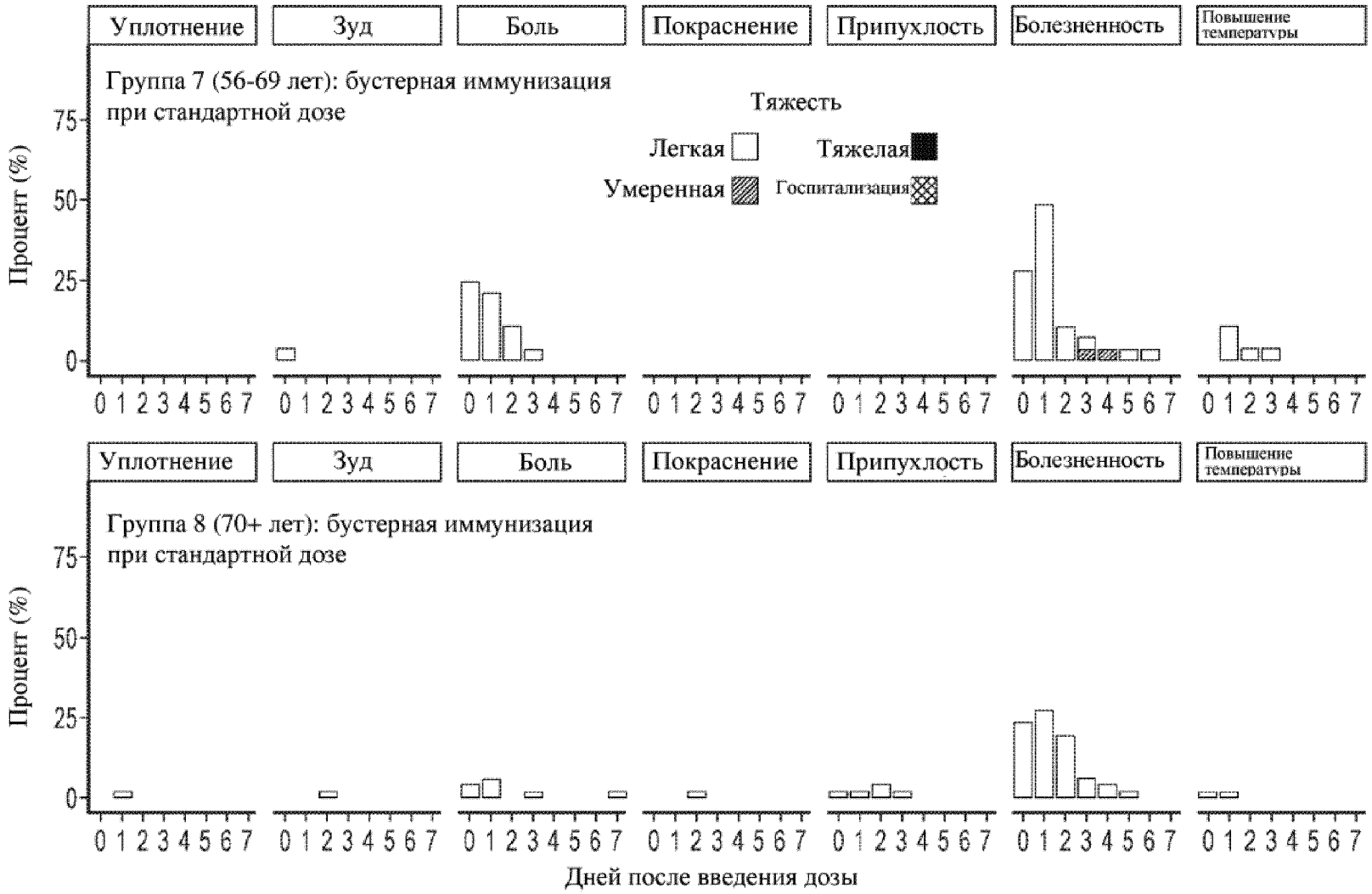
ФИГ. 25


Уплотнение
Зуд
Боль
Покраснение
Припухлость
Болезненность
Повышение температуры
Группа 5d (18-55 лет): примирование при стандартной дозе
Тяжесть
Легкая
Тяжелая
Умеренная
Госпитализация
Процент (%)
75
50
25
0
0 1 2 3 4 5 6 7
Группа 7 (56-69 лет): примирование при стандартной дозе
Дней после введения дозы

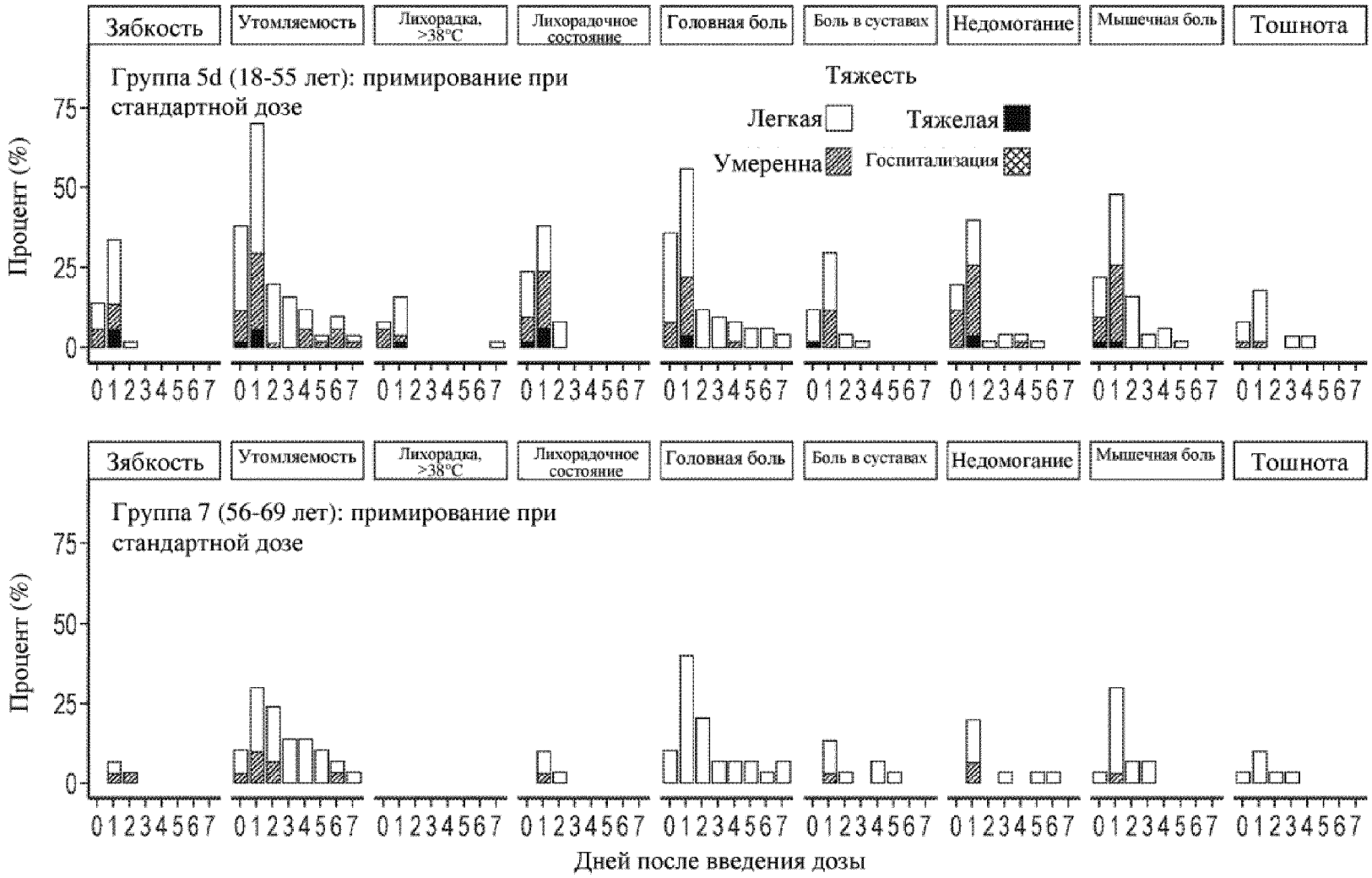
ФИГ. 26



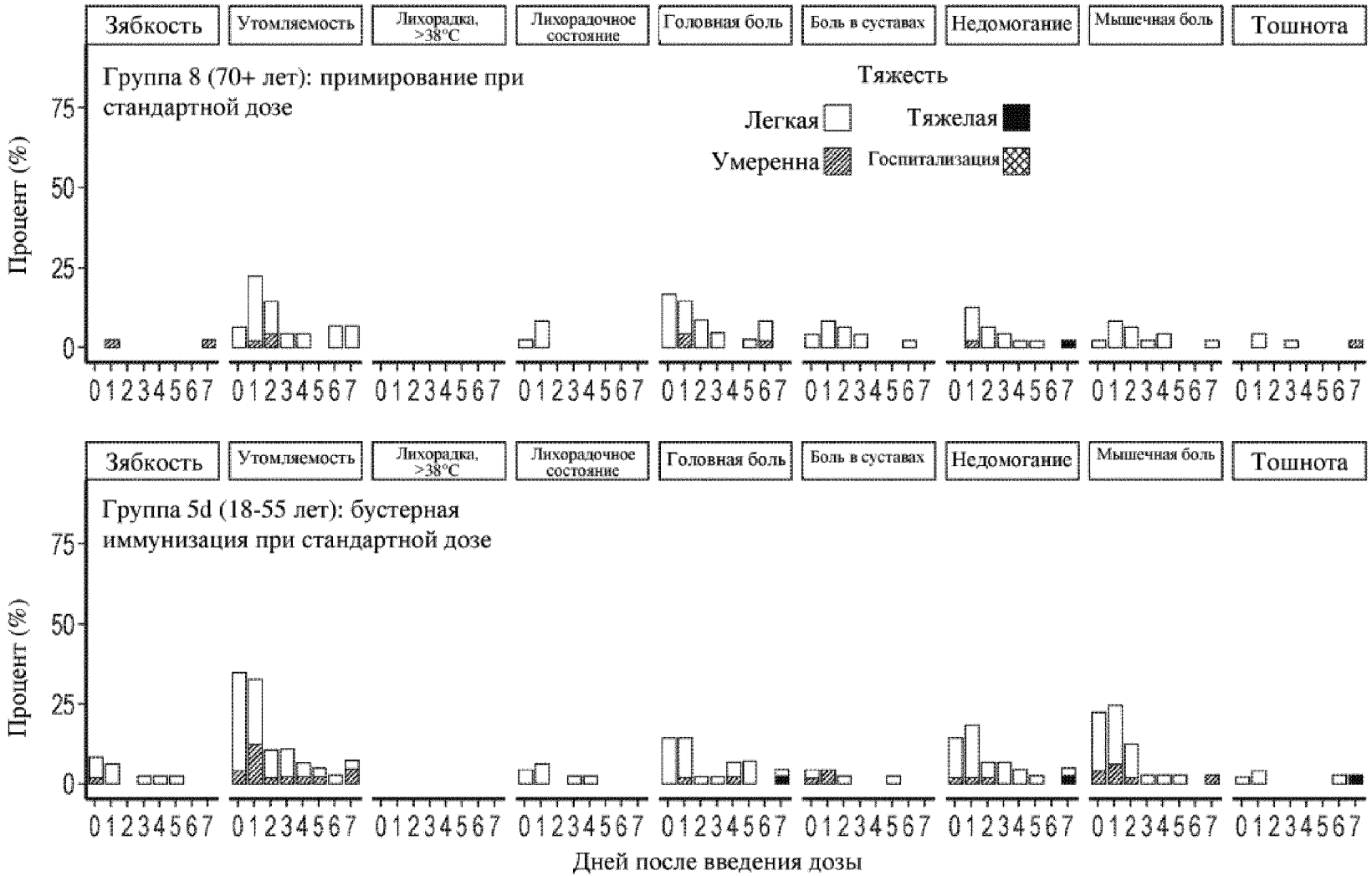
ФИГ. 26 (продолжение)



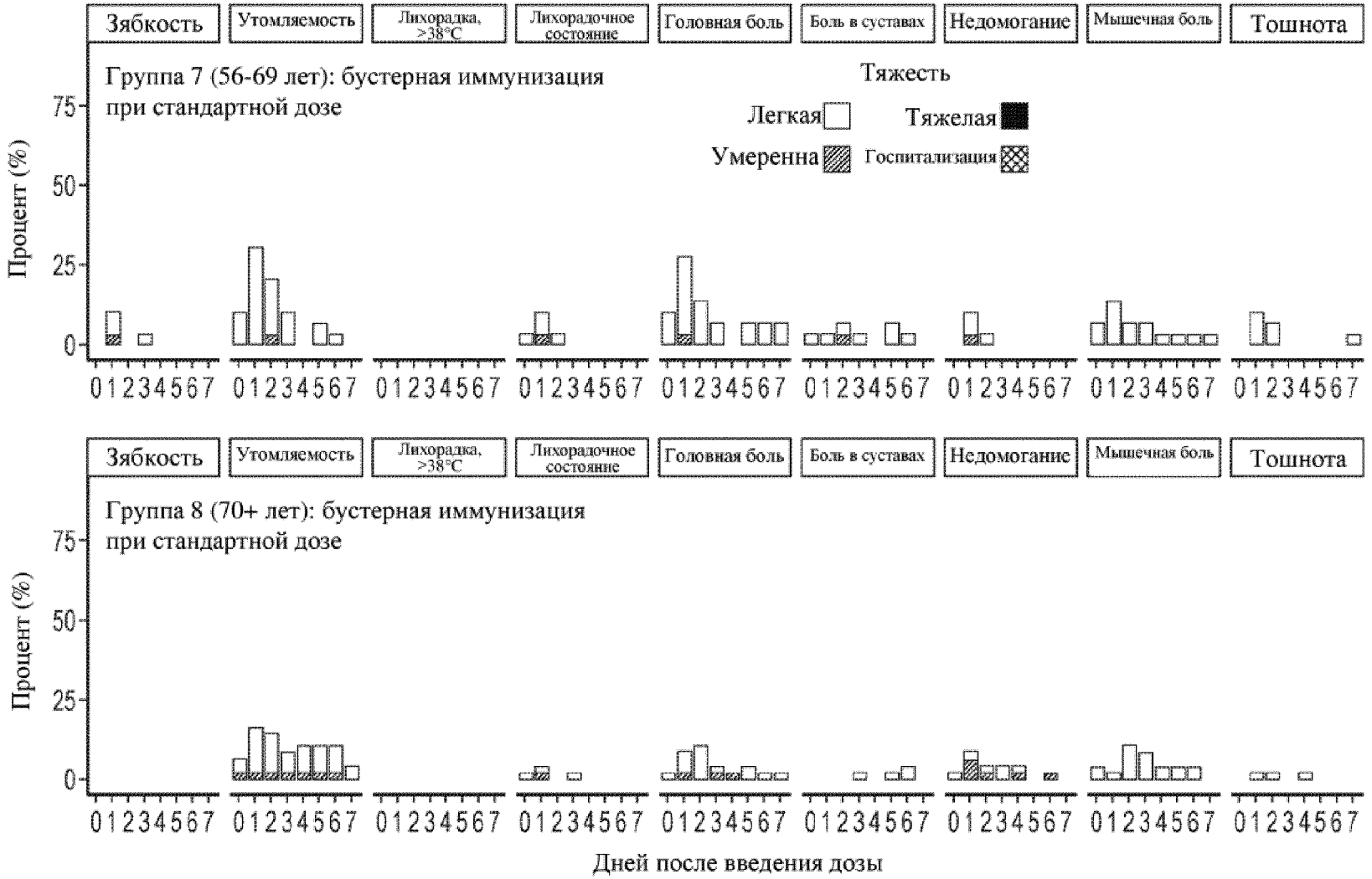
ФИГ. 26 (продолжение)


Зябкость
Утомляемость
Лихорадка, >38°C
Лихорадочное состояние
Головная боль
Боль в суставах
Недомогание
Мышечная боль
Тошнота
Группа 5d (18-55 лет): примирование при стандартной дозе
Тяжесть
Легкая
Тяжелая
Умеренна
Госпитализация
Процент (%)
0
25
50
75
0 1 2 3 4 5 6 7
Группа 7 (56-69 лет): примирование при стандартной дозе
Дней после введения дозы

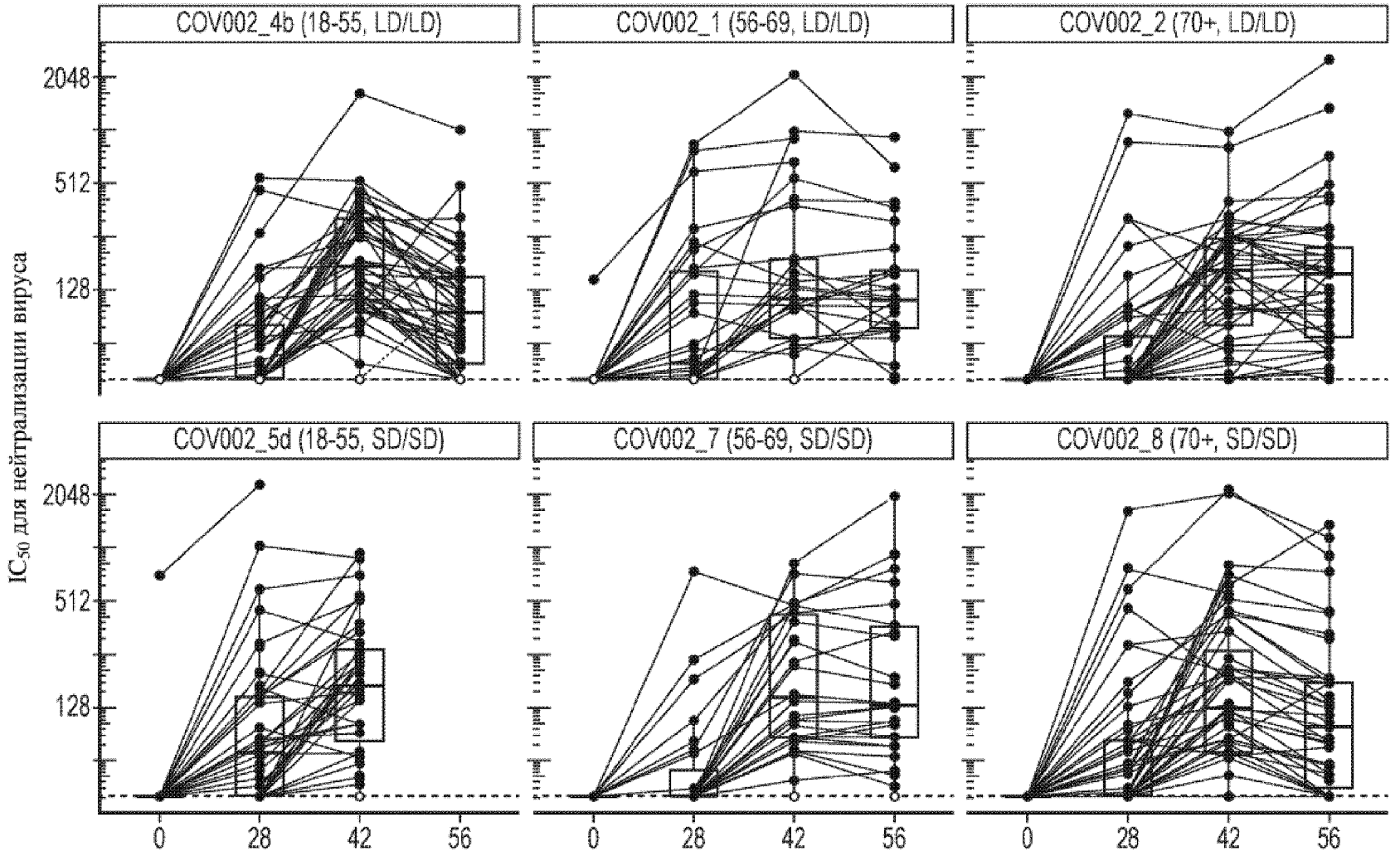
ФИГ. 27



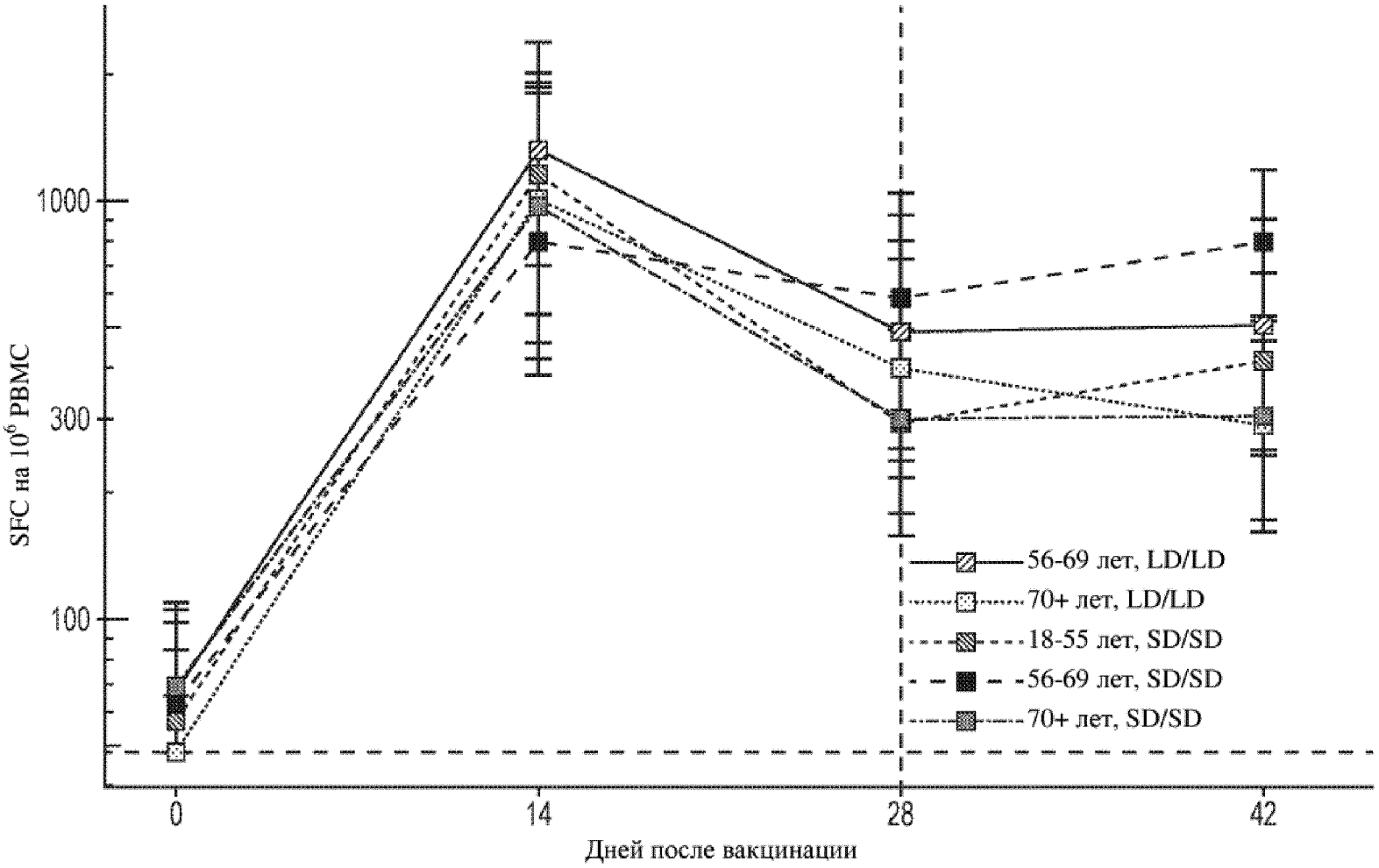
ФИГ. 27
(продолжение)



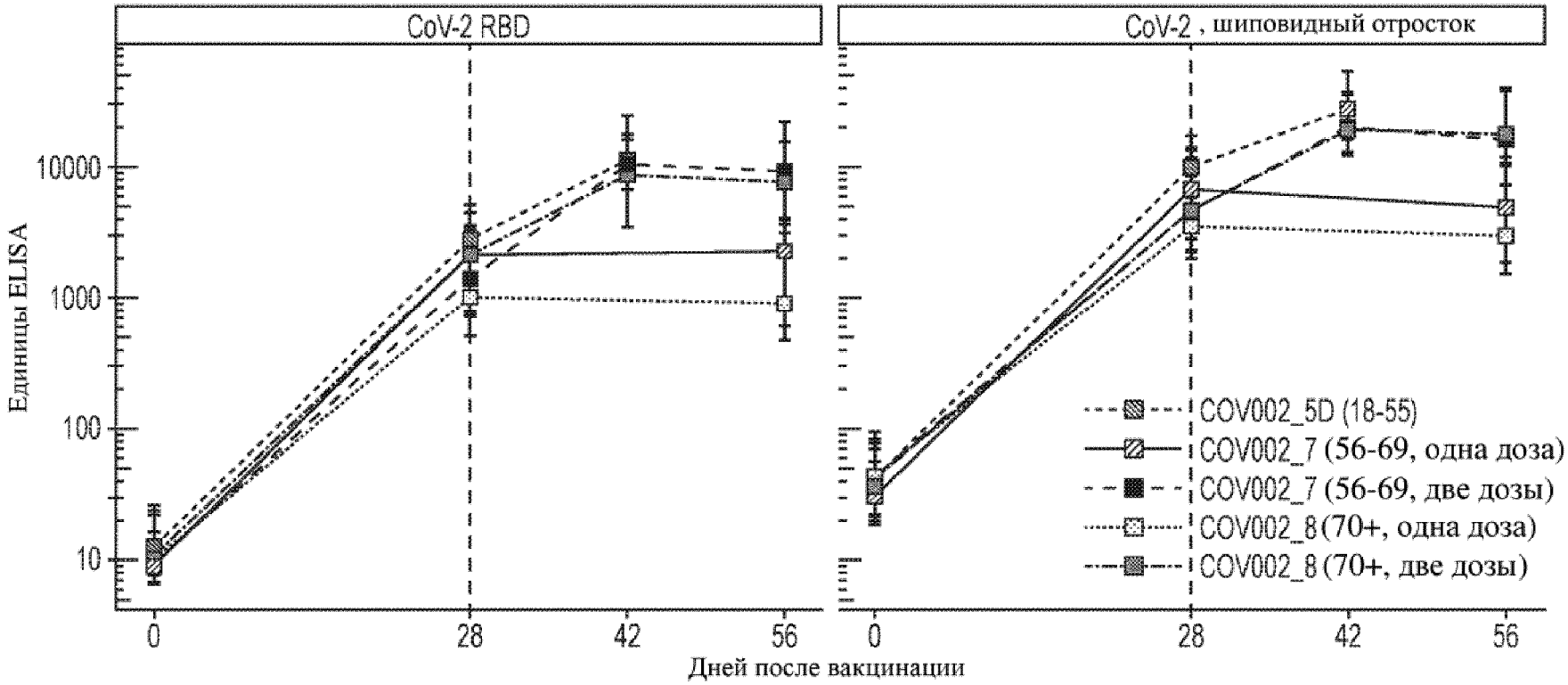
ФИГ. 27 (продолжение)


COV002_4b (18-55, LD/LD)
COV002_1 (56-69, LD/LD)
COV002_2 (70+, LD/LD)
COV002_5d (18-55, SD/SD)
COV002_7 (56-69, SD/SD)
COV002_8 (70+, SD/SD)
IC50 для нейтрализации вируса
2048
512
128
0
28
42
56

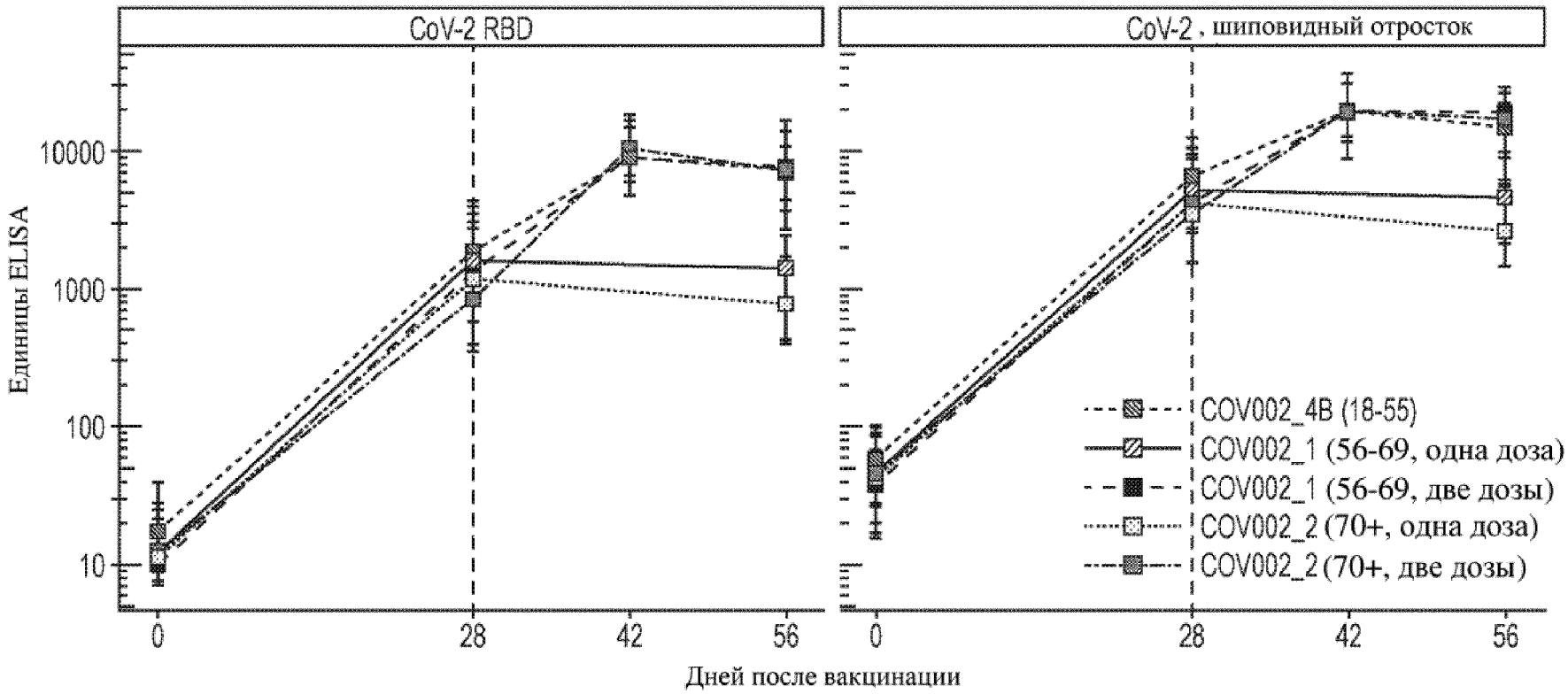
ФИГ. 28


1000
300
100
SFC на 10^6 PBMC
0
14
28
42
Дней после вакцинации
56-69 лет, LD/LD
70+ лет, LD/LD
18-55 лет, SD/SD
56-69 лет, SD/SD
70+ лет, SD/SD

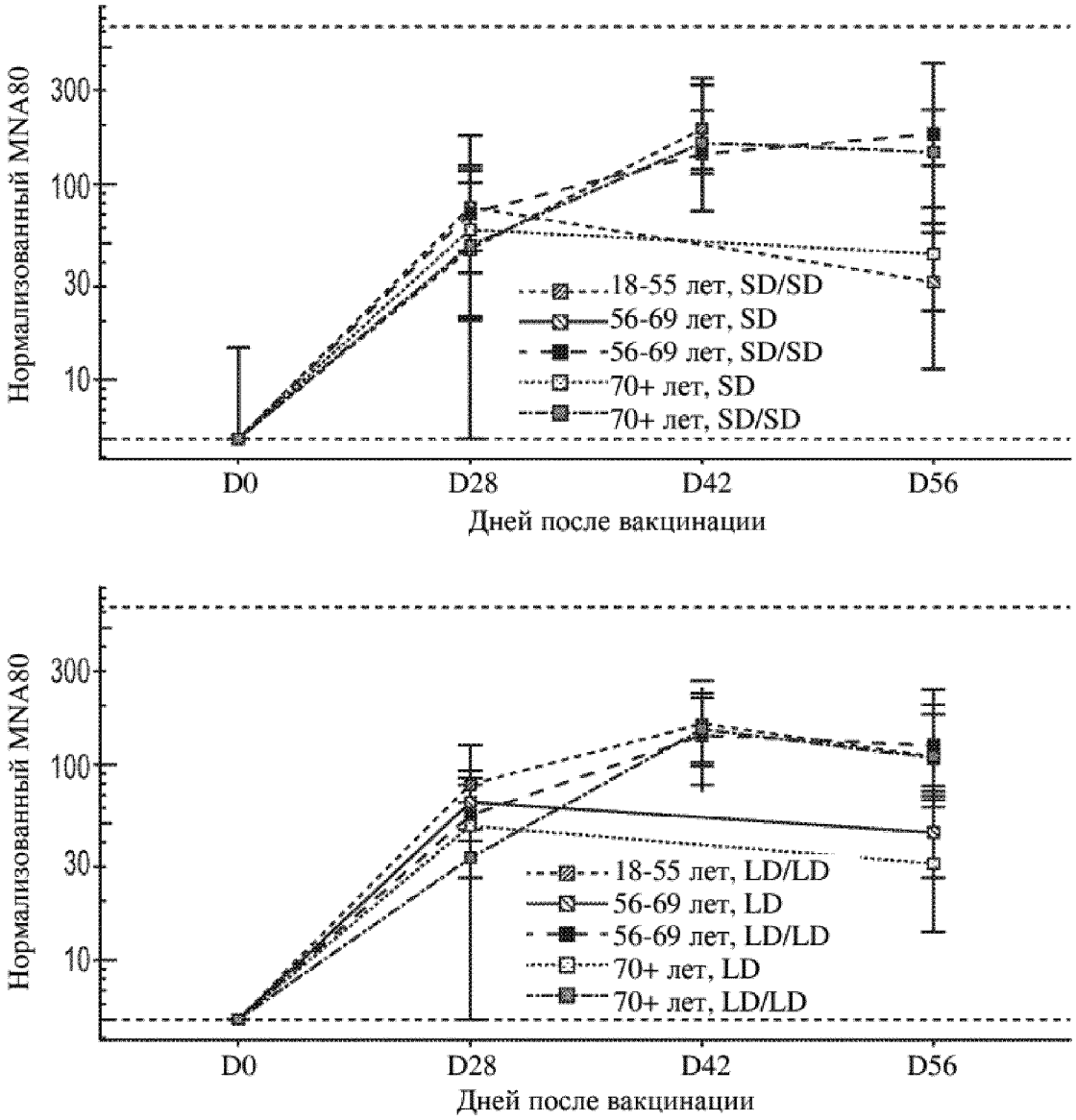
ФИГ. 29


CoV-2 RBD
CoV-2 , шиповидный отросток
Единицы ELISA
10000
1000
100
10
0
28
42
56
Дней после вакцинации
COV002_5D (18-55)
COV002_7 (56-69, одна доза)
COV002_7 (56-69, две дозы)
COV002_8 (70+, одна доза)
COV002_8 (70+, две дозы)

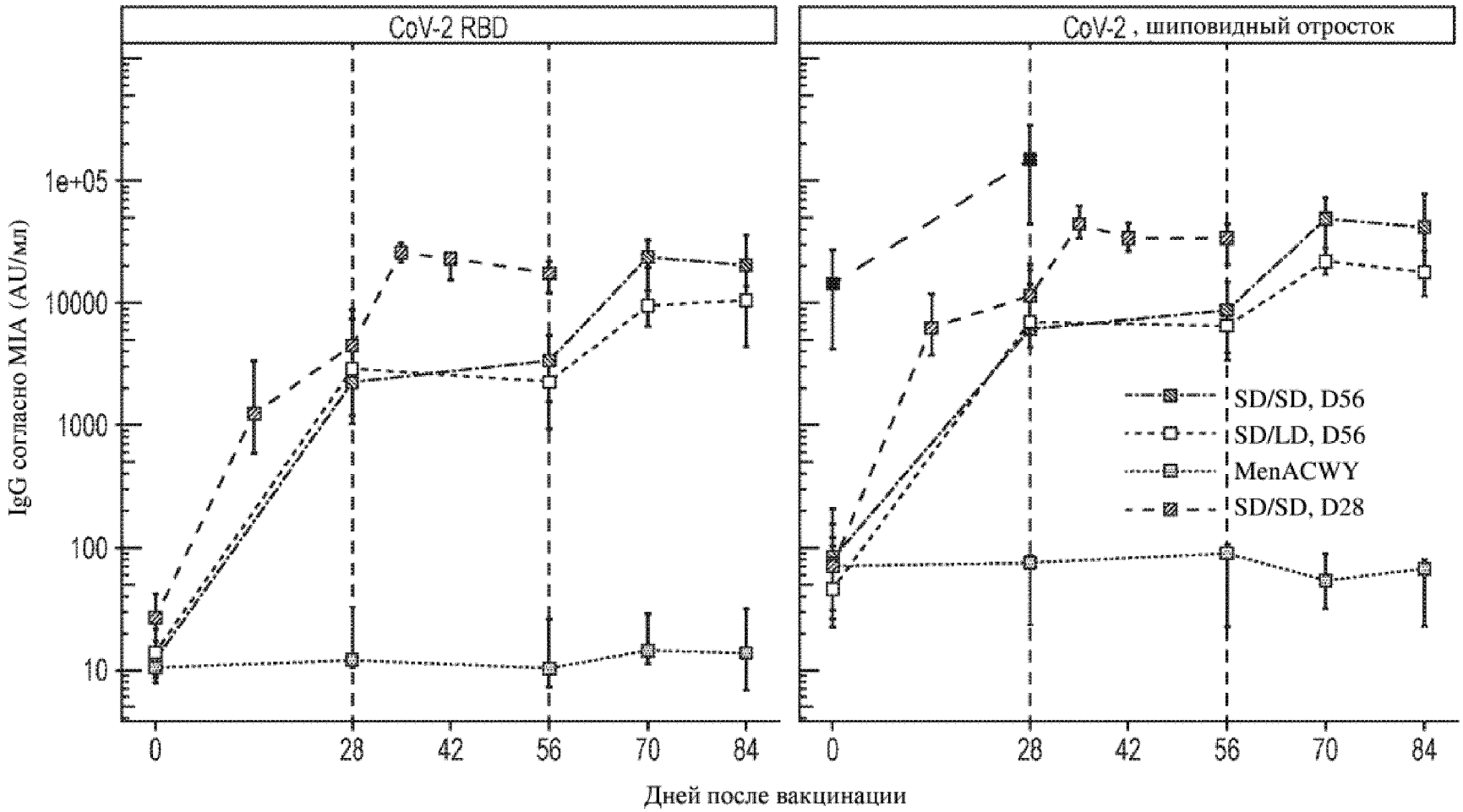
ФИГ. 30



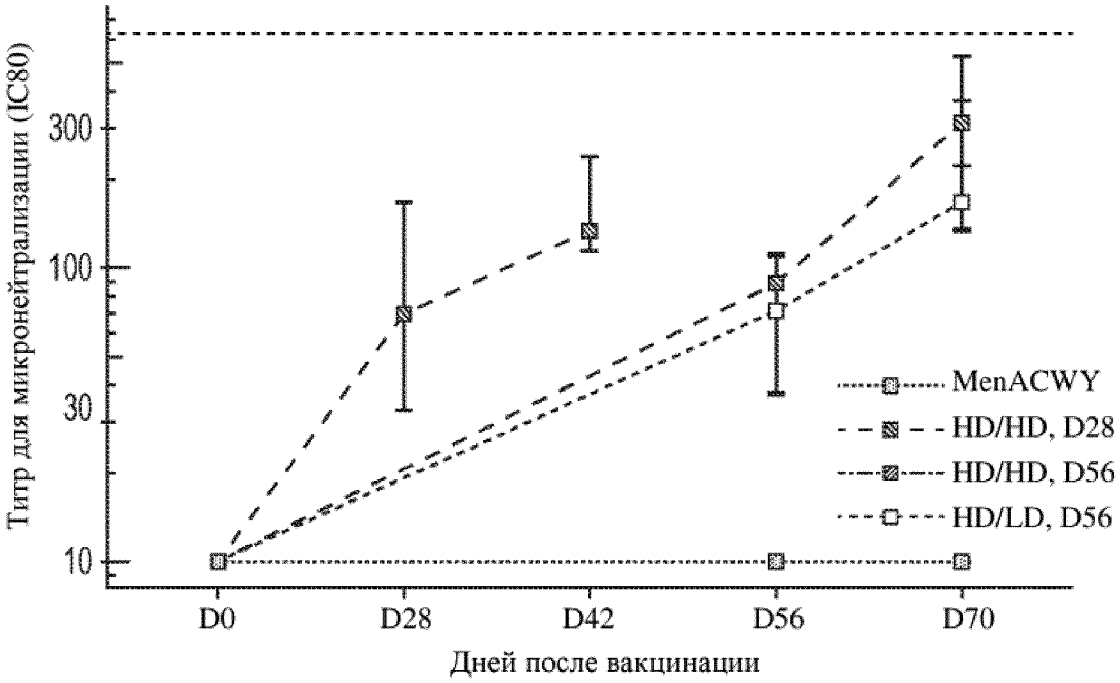
ФИГ. 30 (продолжение)


Нормализованный MNA80
300
100
30
10
18-55 лет, SD/SD
56-69 лет, SD
56-69 лет, SD/SD
70+ лет, SD
70+ лет, SD/SD
D0
D28
D42
D56
Дней после вакцинации
Нормализованный MNA80
300
100
30
10
18-55 лет, LD/LD
56-69 лет, LD
56-69 лет, LD/LD
70+ лет, LD
70+ лет, LD/LD
D0
D28
D42
D56
Дней после вакцинации

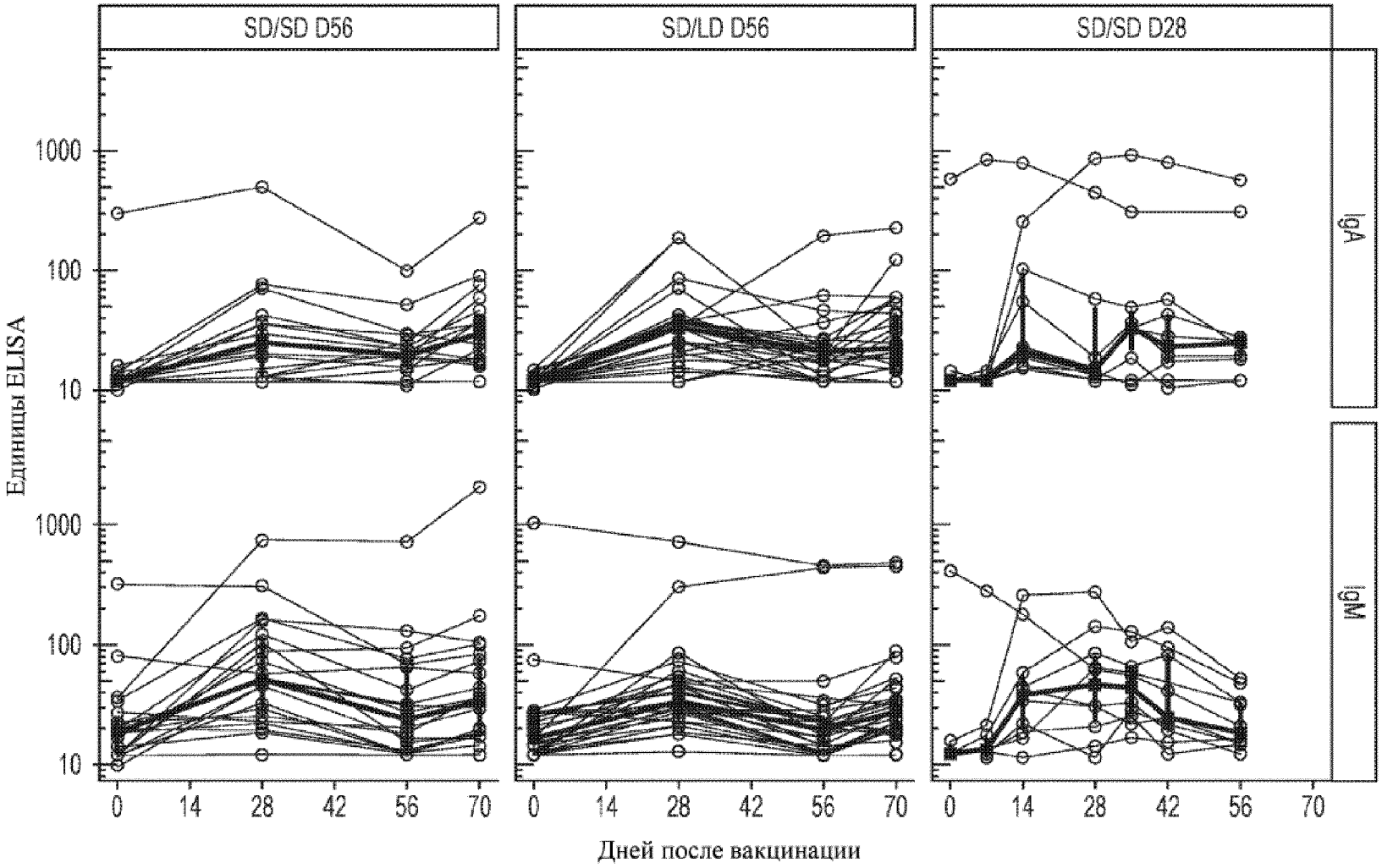
ФИГ. 31


CoV-2 RBD
CoV-2 , шиповидный отросток
IgG согласно MIA (AU/мл)
1e+05
10000
1000
100
10
0
28
42
56
70
84
Дней после вакцинации
SD/SD, D56
SD/LD, D56
MenACWY
SD/SD, D28

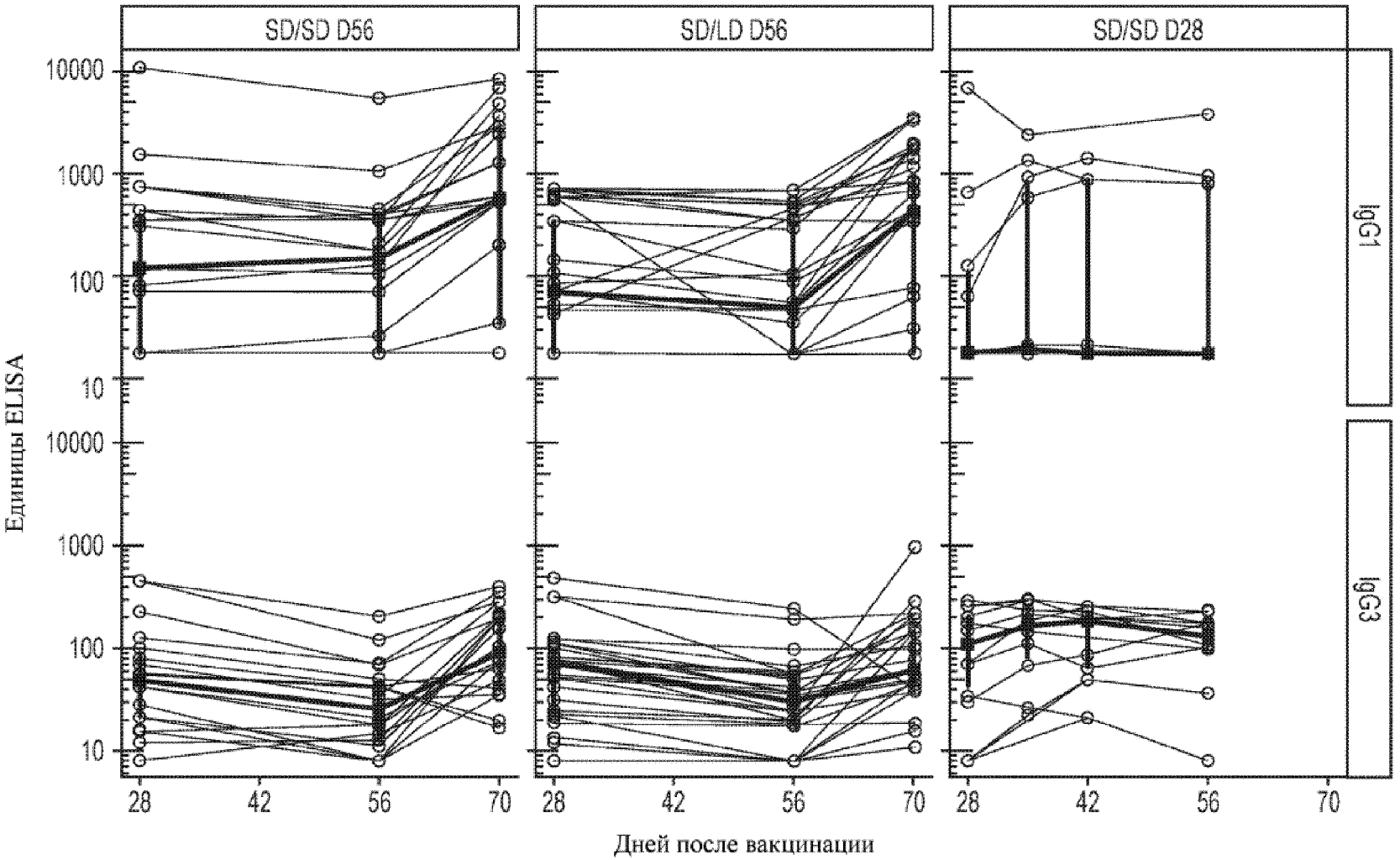
ФИГ. 32


Титр для микронейтрализации (IC80)
300
100
30
10
D0
D28
D42
D56
D70
Дней после вакцинации
MenACWY
HD/HD, D28
HD/HD, D56
HD/LD, D56

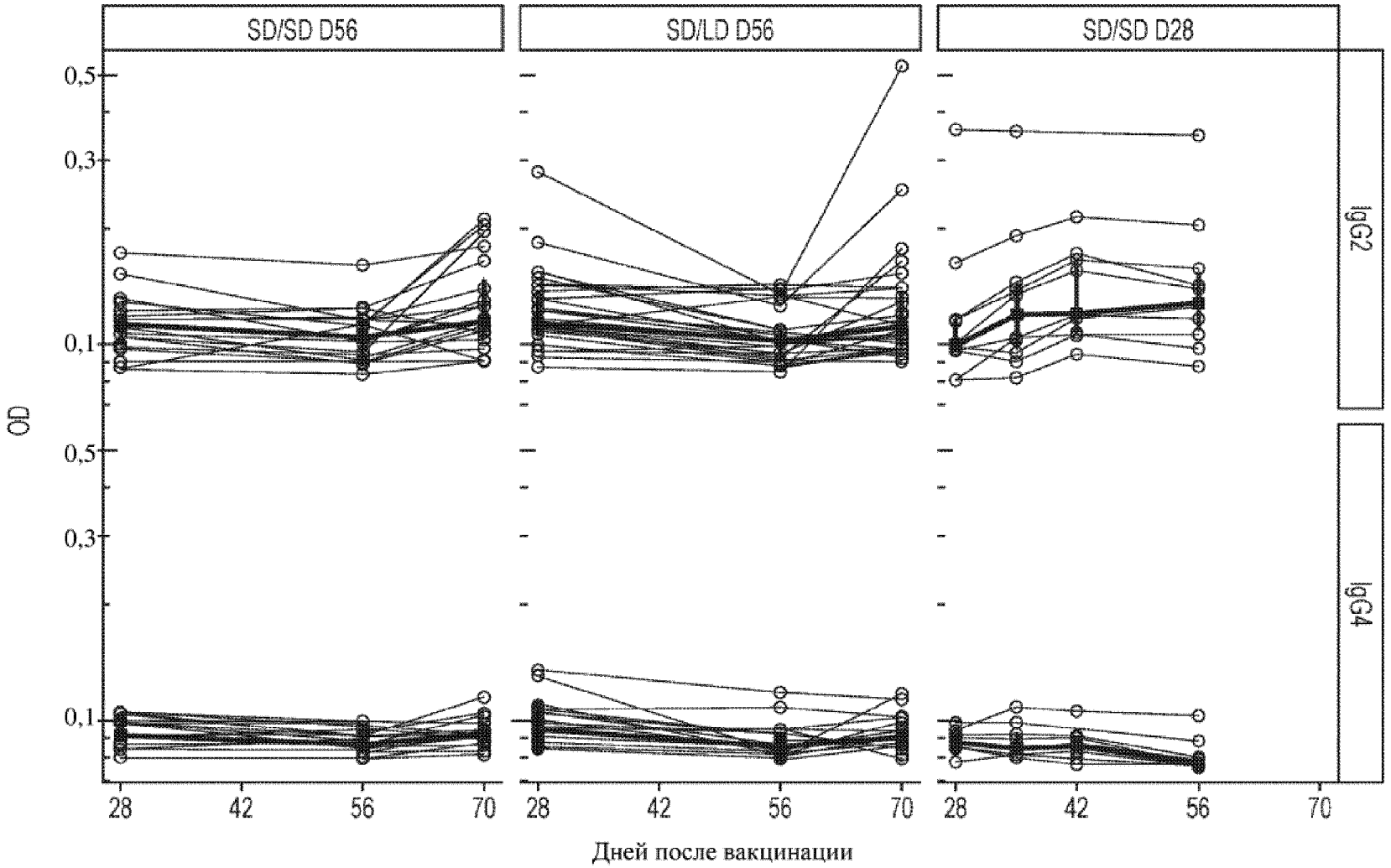
ФИГ. 33


SD/SD D56
SD/LD D56
SD/SD D28
IgA
IgM
Единицы ELISA
1000
100
10
0
14
28
42
56
70
Дней после вакцинации

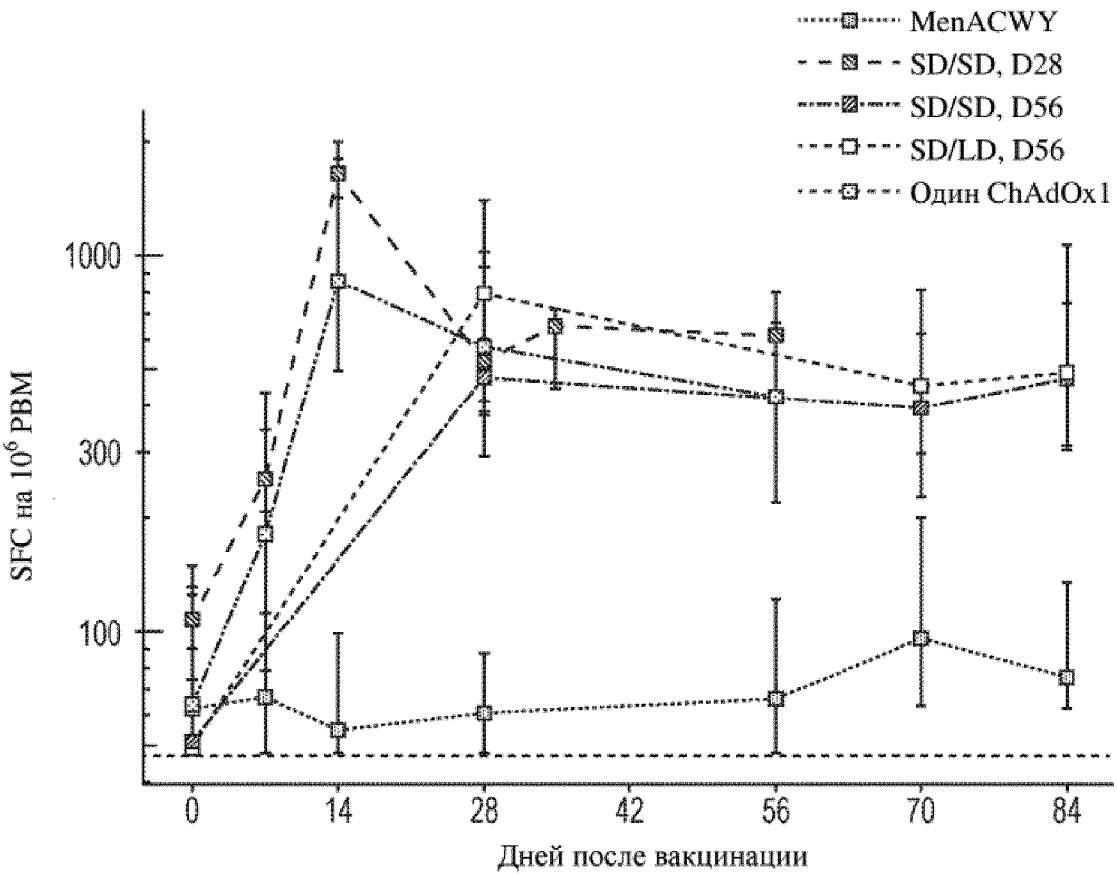
ФИГ. 34


SD/SD D56
SD/LD D56
SD/SD D28
IgG1
IgG3
10000
1000
100
10
28
42
56
70
Единицы ELISA
Дней после вакцинации

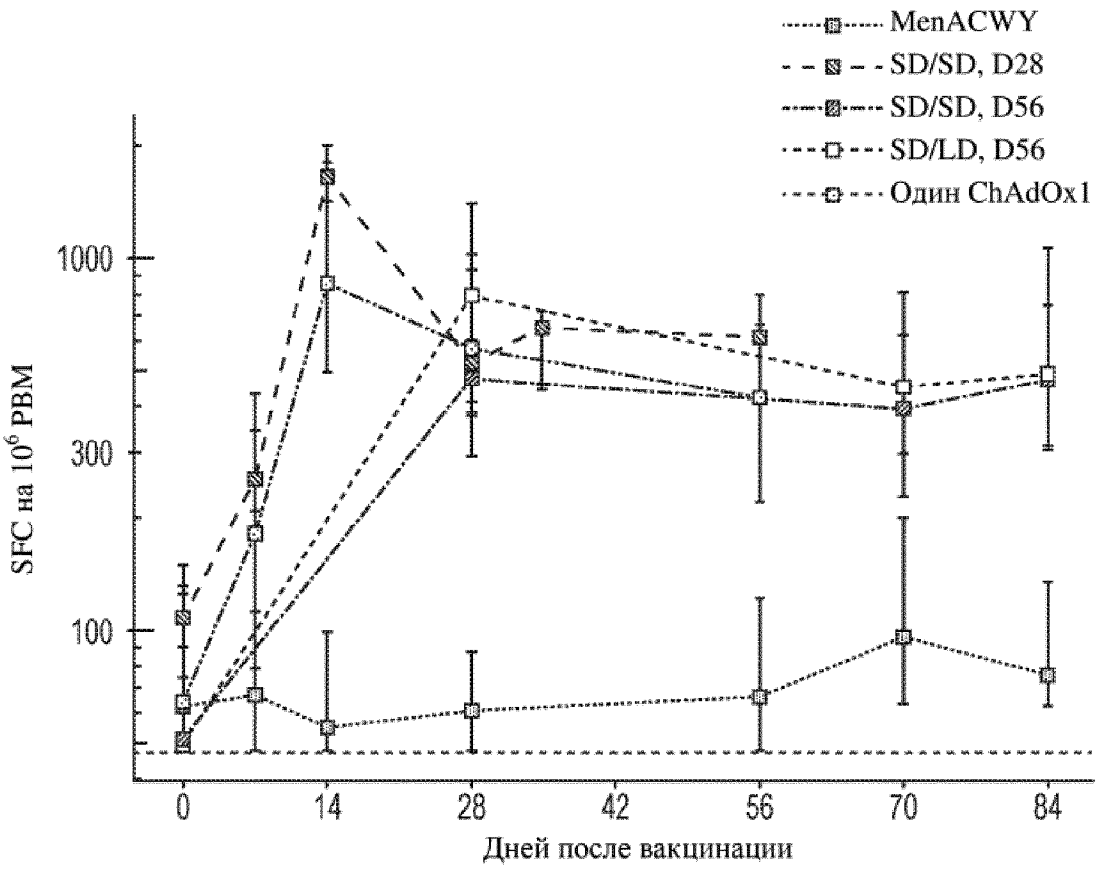
ФИГ. 35



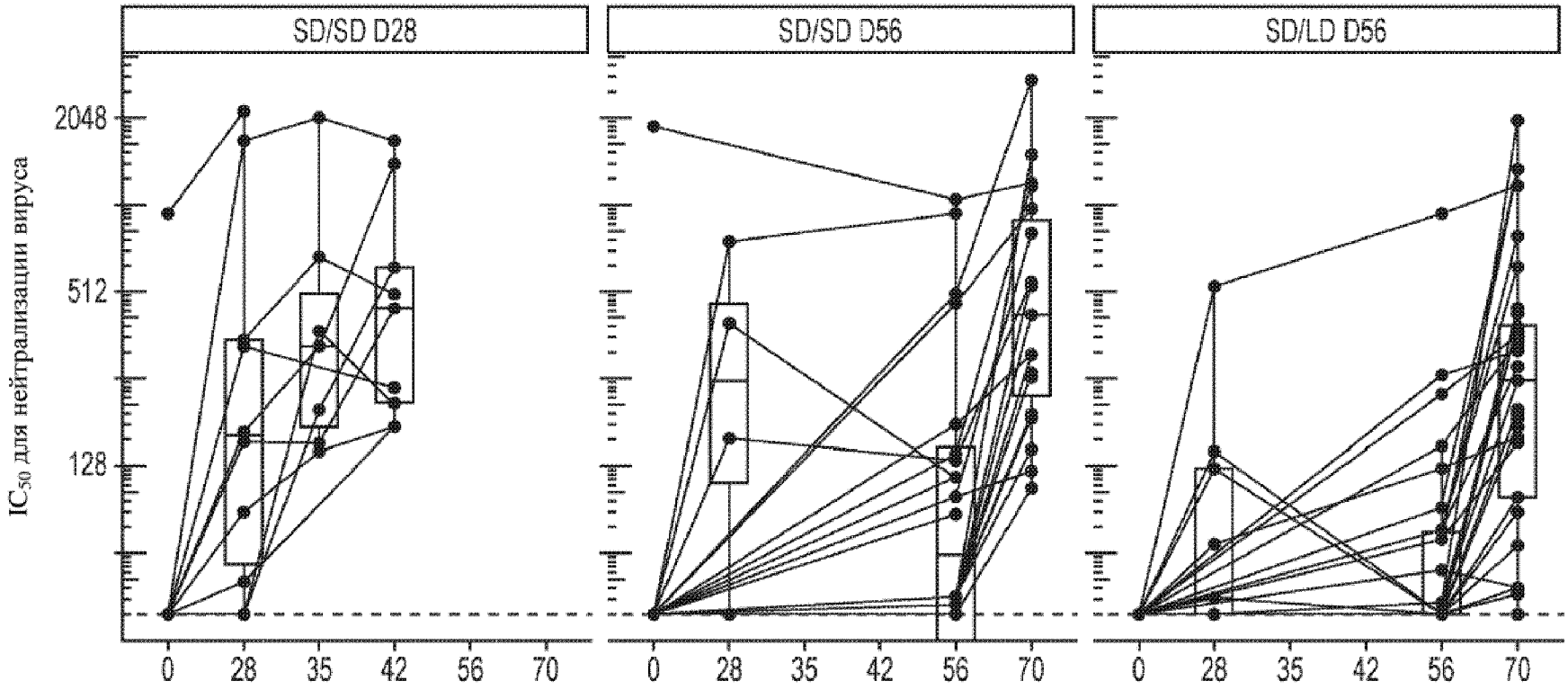
ФИГ. 35 (продолжение)


MenACWY
SD/SD, D28
SD/SD, D56
SD/LD, D56
Один ChAdOx1
1000
300
100
SFC на 10^6 PBM
0
14
28
42
56
70
84
Дней после вакцинации

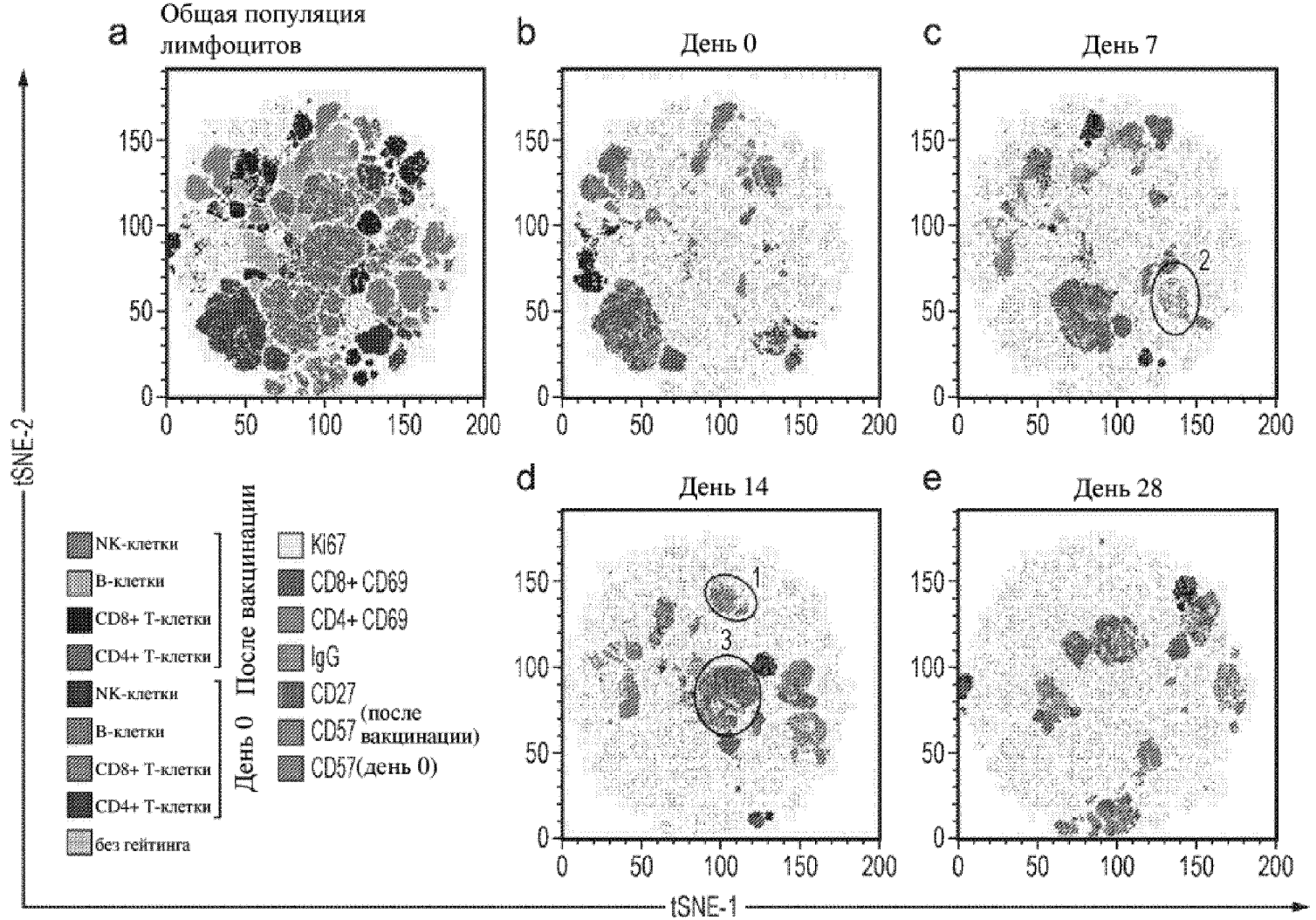
ФИГ. 36


MenACWY
SD/SD, D28
SD/SD, D56
SD/LD, D56
Один ChAdOx1
SFC на 10^6 PBM
1000
300
100
0
14
28
42
56
70
84
Дней после вакцинации

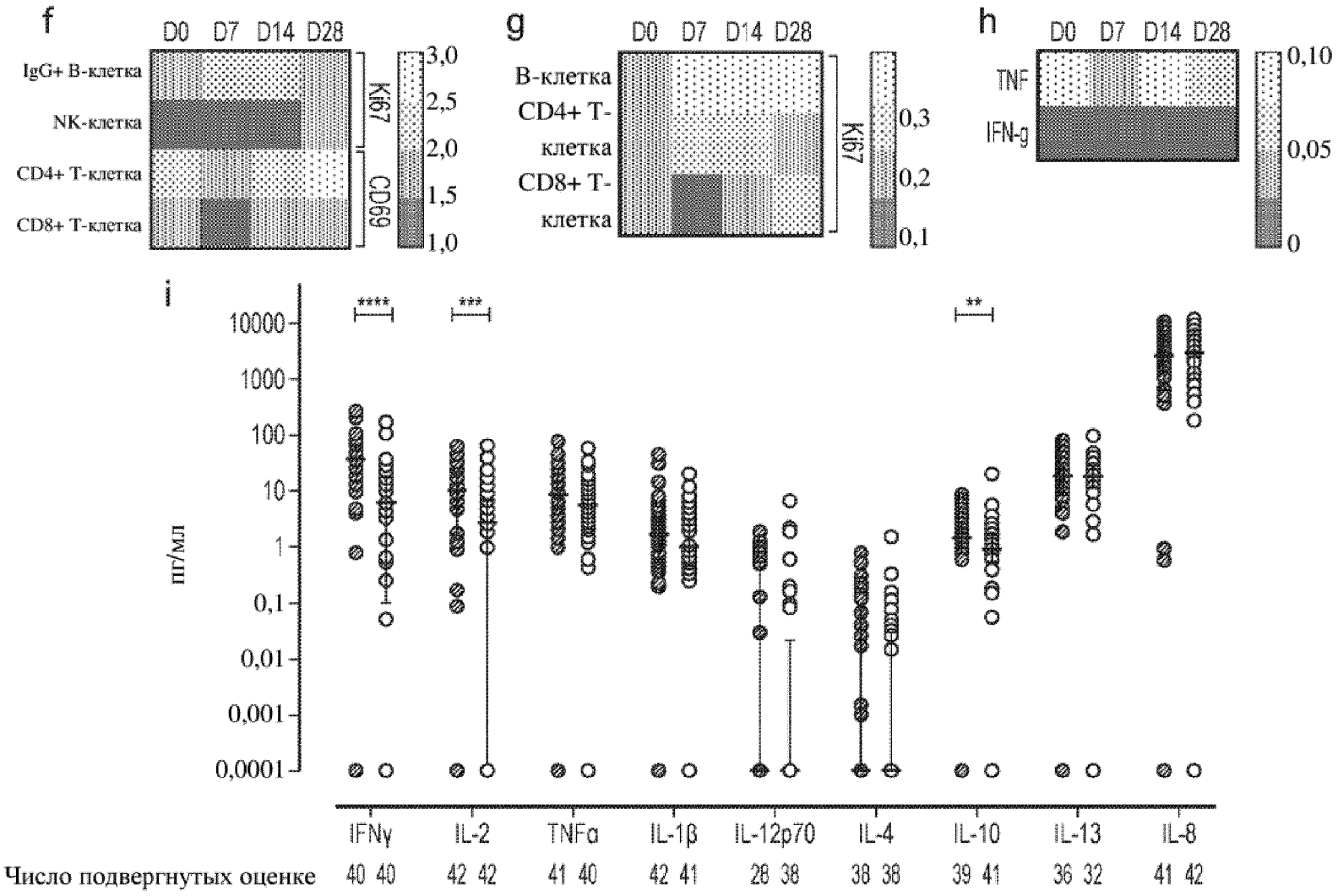
ФИГ. 37


SD/SD D28
SD/SD D56
SD/LD D56
IC50 для нейтрализации вируса
2048
512
128
0
28
35
42
56
70

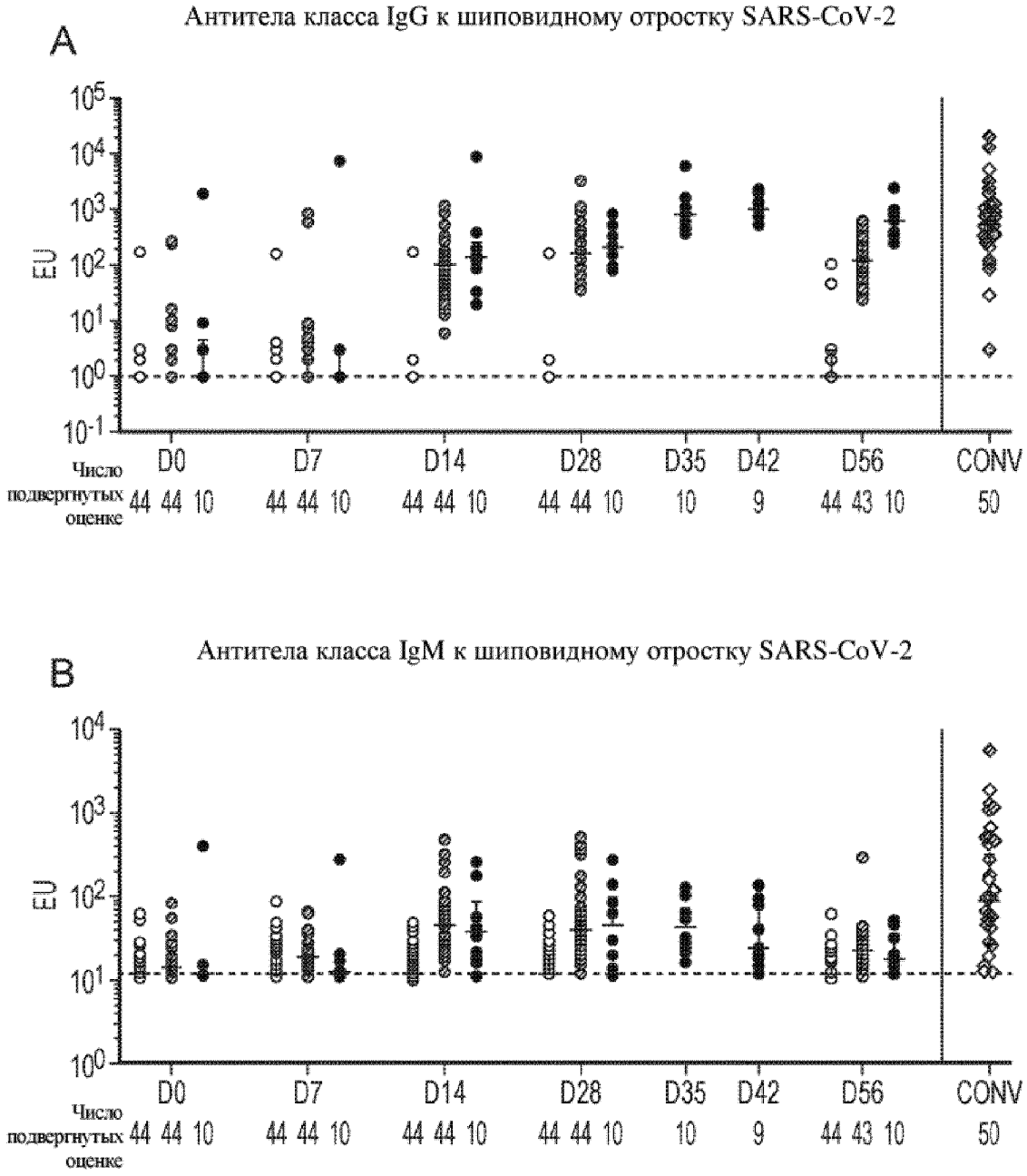
ФИГ. 38


a
Общая популяция лимфоцитов
b
День 0
c
День 7
d
День 14
e
День 28
tSNE-2
tSNE-1
0
50
100
150
200
1
2
3
NK-клетки
B-клетки
CD8+ T-клетки
CD4+ T-клетки
NK-клетки
B-клетки
CD8+ T-клетки
CD4+ T-клетки
без гейтинга
После вакцинации
День 0
Ki67
CD8+ CD69
CD4+ CD69
IgG
CD27
CD57 (после вакцинации)
CD57(день 0)

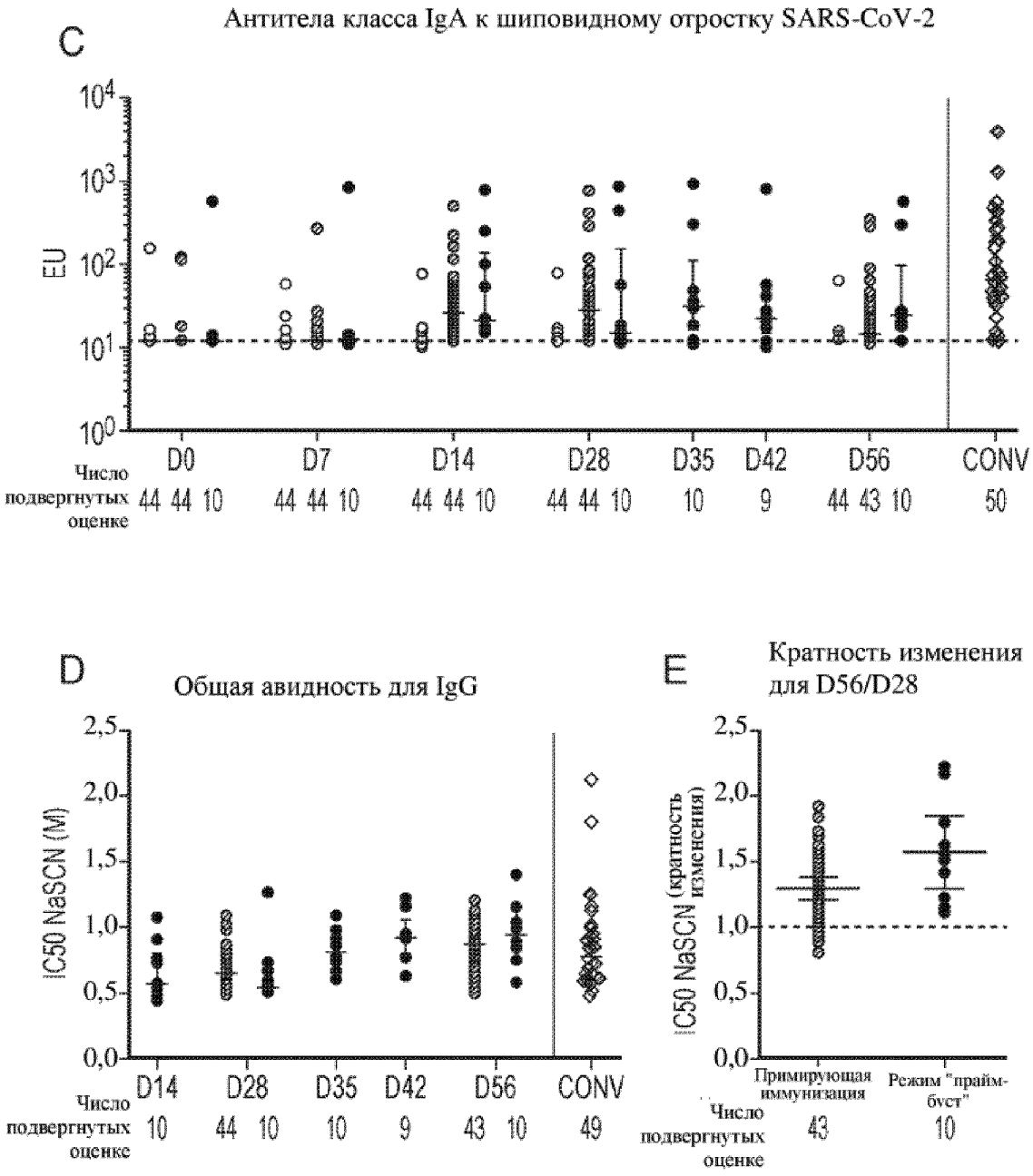
ФИГ. 39



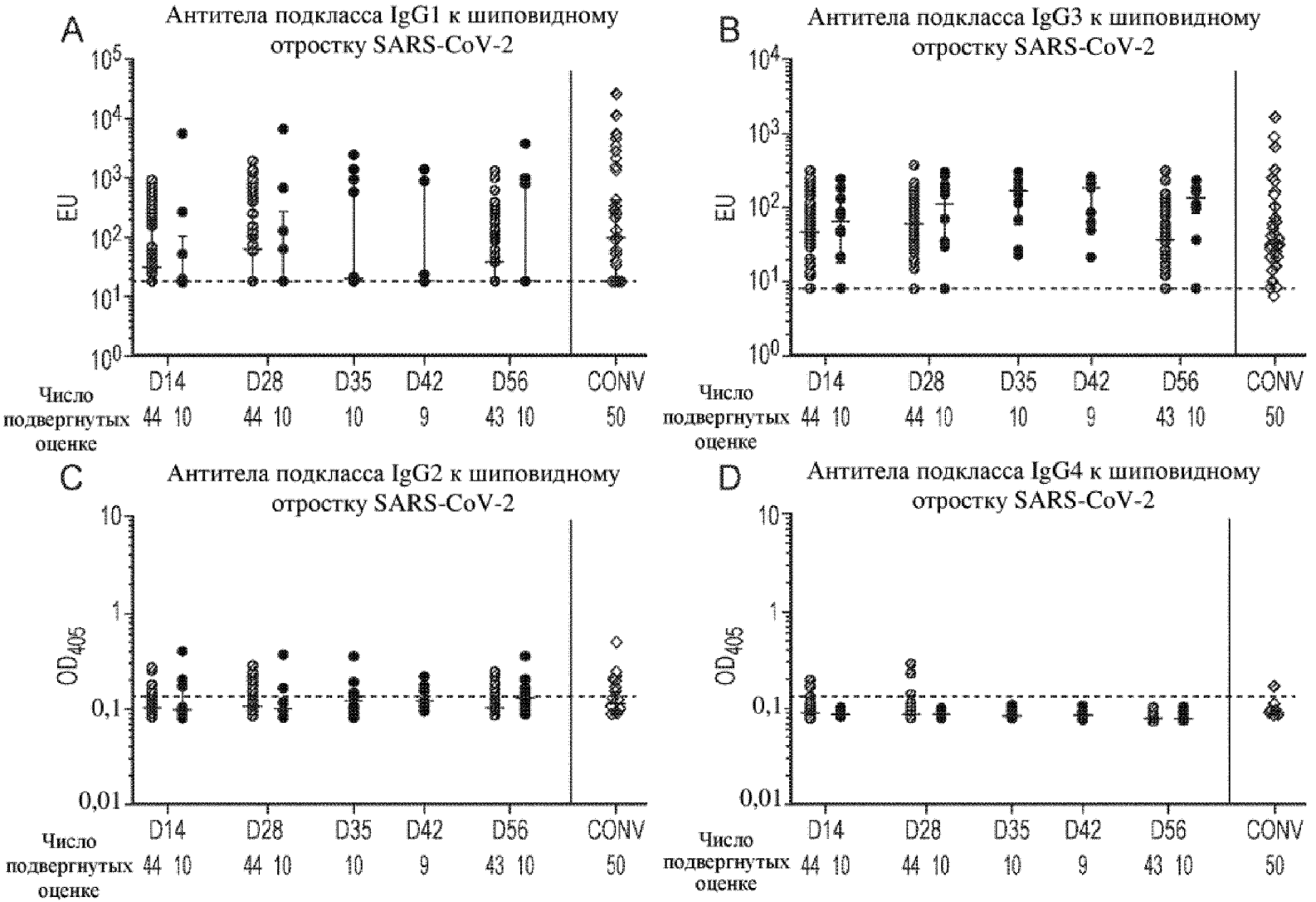
ФИГ. 39 (продолжение)


A
Антитела класса IgG к шиповидному отростку SARS-CoV-2
EU
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^{-1}
D0
D7
D14
D28
D35
D42
D56
CONV
Число подвергнутых оценке
44 44 10
44 44 10
44 44 10
44 44 10
10
9
44 43 10
50
B
Антитела класса IgM к шиповидному отростку SARS-CoV-2
EU
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
D0
D7
D14
D28
D35
D42
D56
CONV
Число подвергнутых оценке
44 44 10
44 44 10
44 44 10
44 44 10
10
9
44 43 10
50

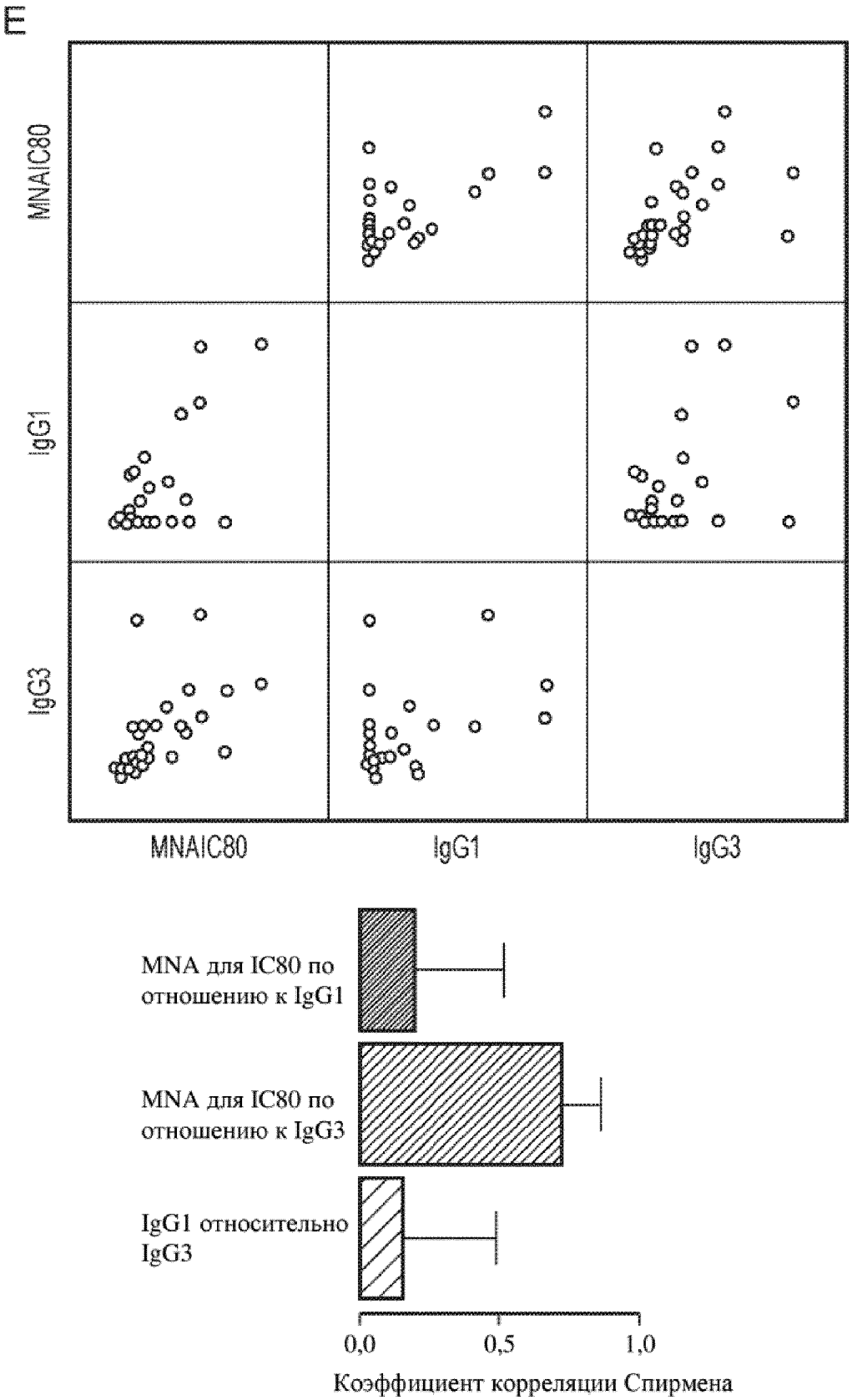
ФИГ. 40



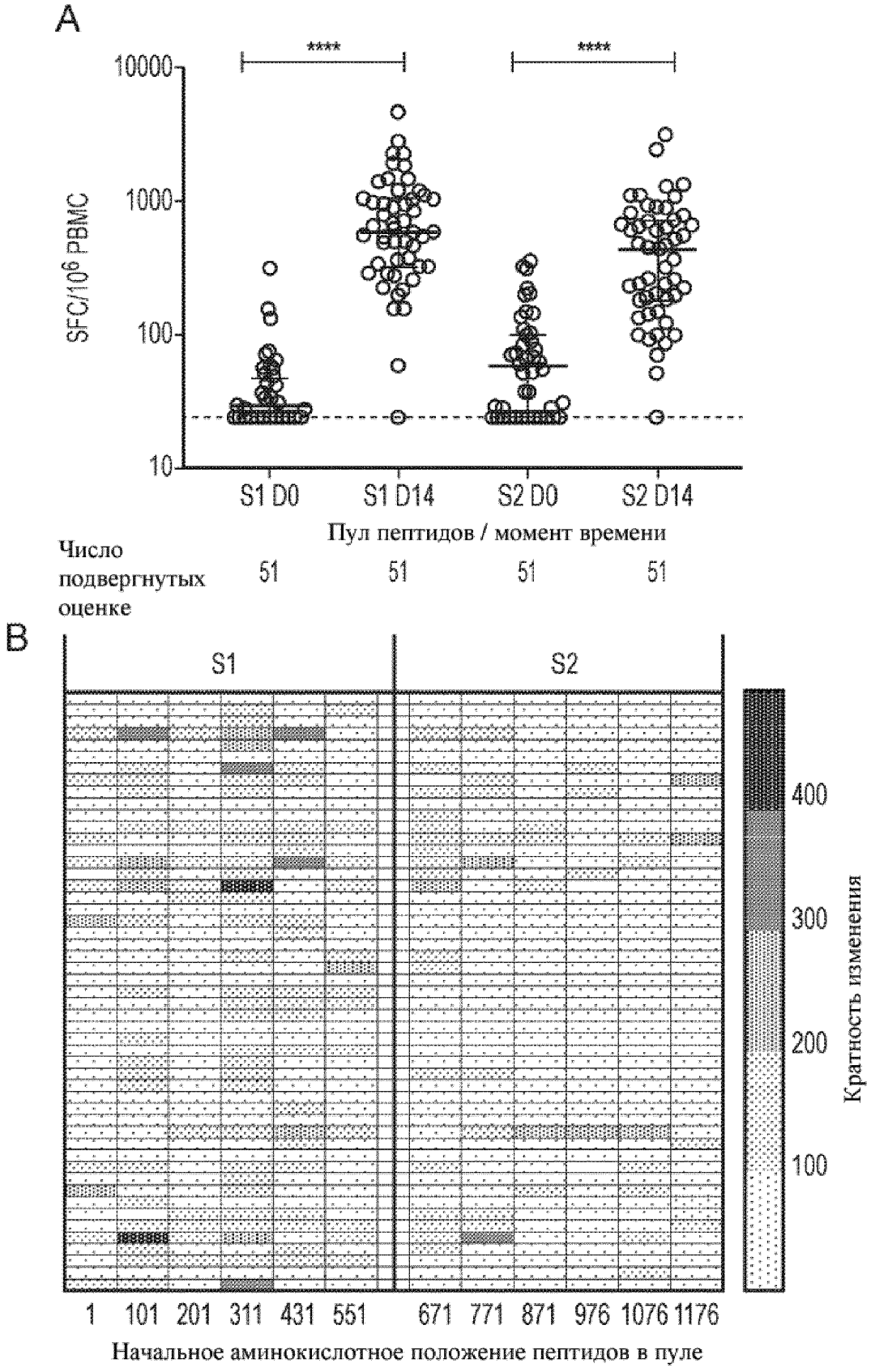
ФИГ. 40 (продолжение)


A
Антитела подкласса IgG1 к шиповидному отростку SARS-CoV-2
EU
B
Антитела подкласса IgG3 к шиповидному отростку SARS-CoV-2
EU
C
Антитела подкласса IgG2 к шиповидному отростку SARS-CoV-2
OD405
D
Антитела подкласса IgG4 к шиповидному отростку SARS-CoV-2
OD405
D14 D28 D35 D42 D56 CONV
Число подвергнутых оценке
44 10 44 10 10 9 43 10 50

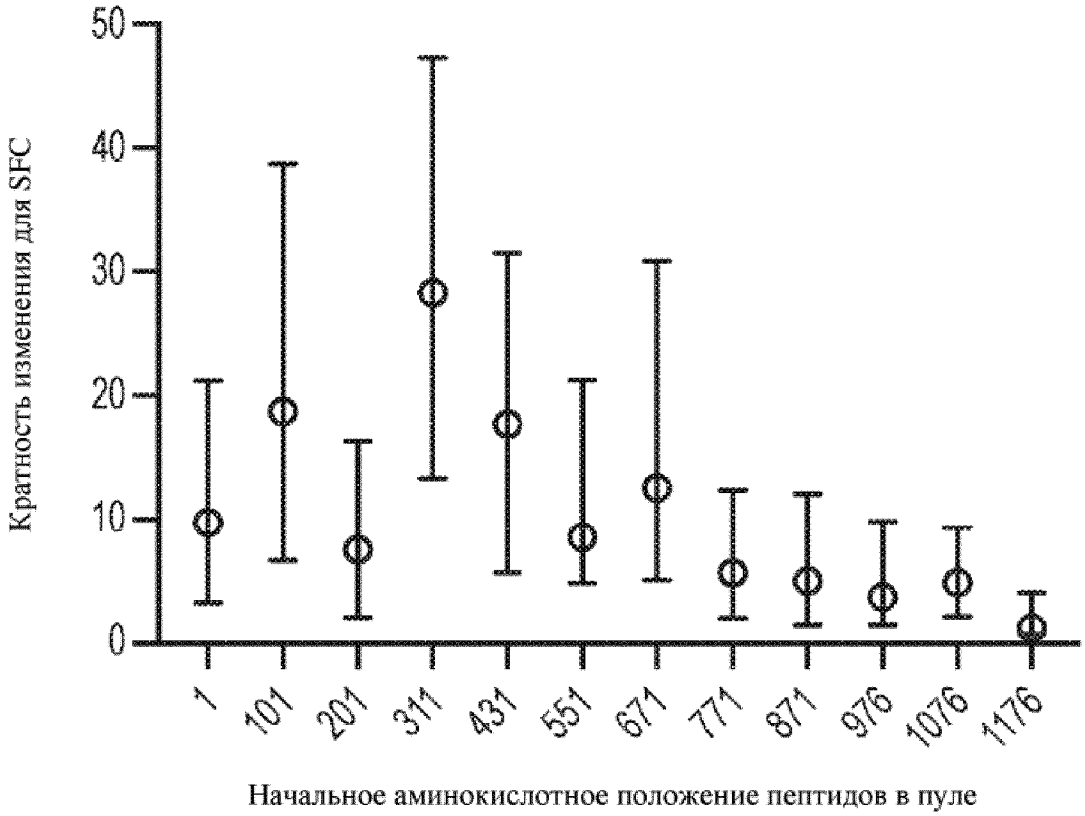
ФИГ. 41



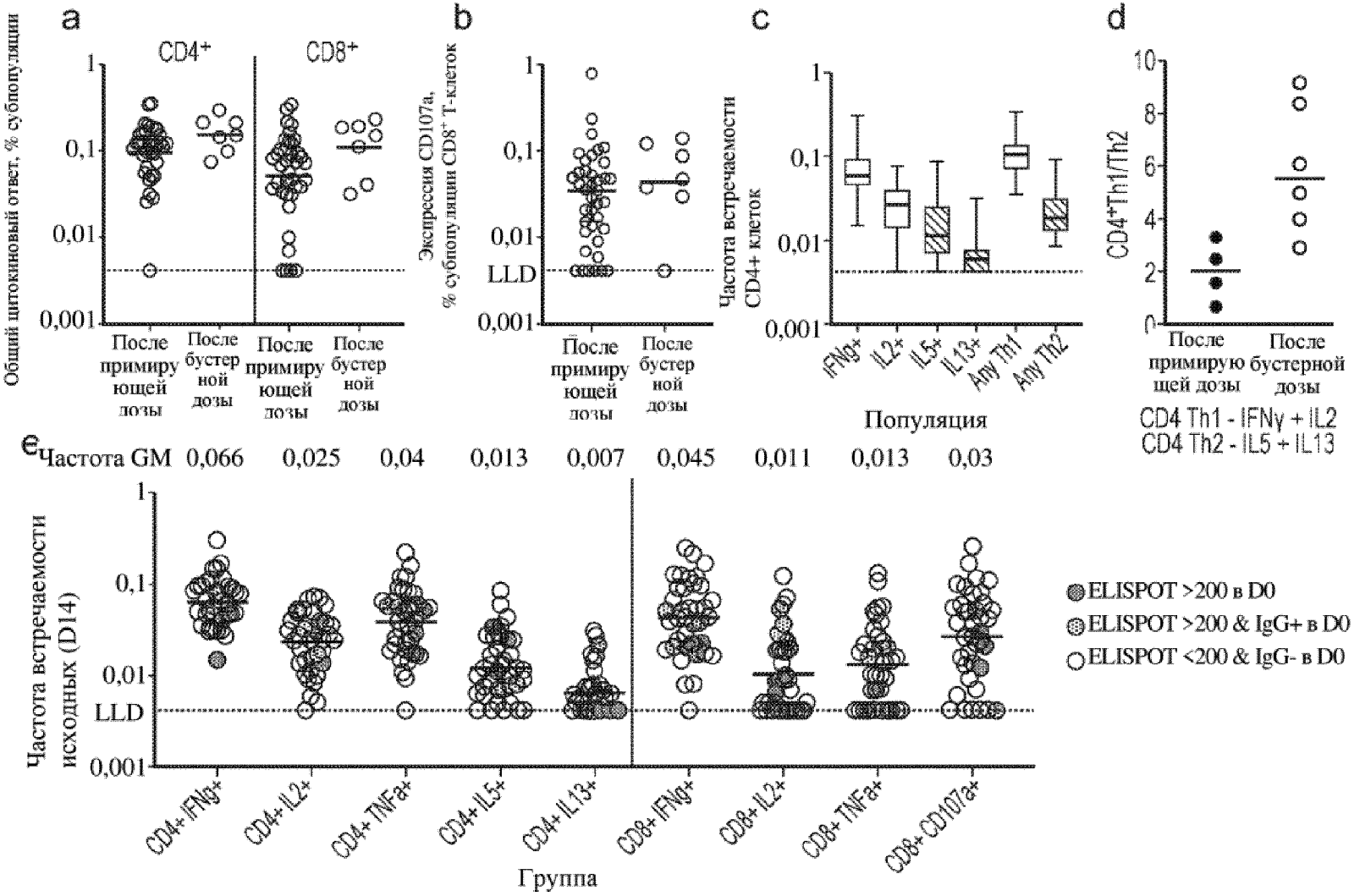
ФИГ. 41 (продолжение)


A
****
****
10000
1000
100
10
SFC/10^6 PBMC
S1 D0
S1 D14
S2 D0
S2 D14
Пул пептидов / момент времени
Число подвергнутых оценке
51
51
51
51
B
S1
S2
400
300
200
100
Кратность изменения
1
101
201
311
431
551
671
771
871
976
1076
1176
Начальное аминокислотное положение пептидов в пуле

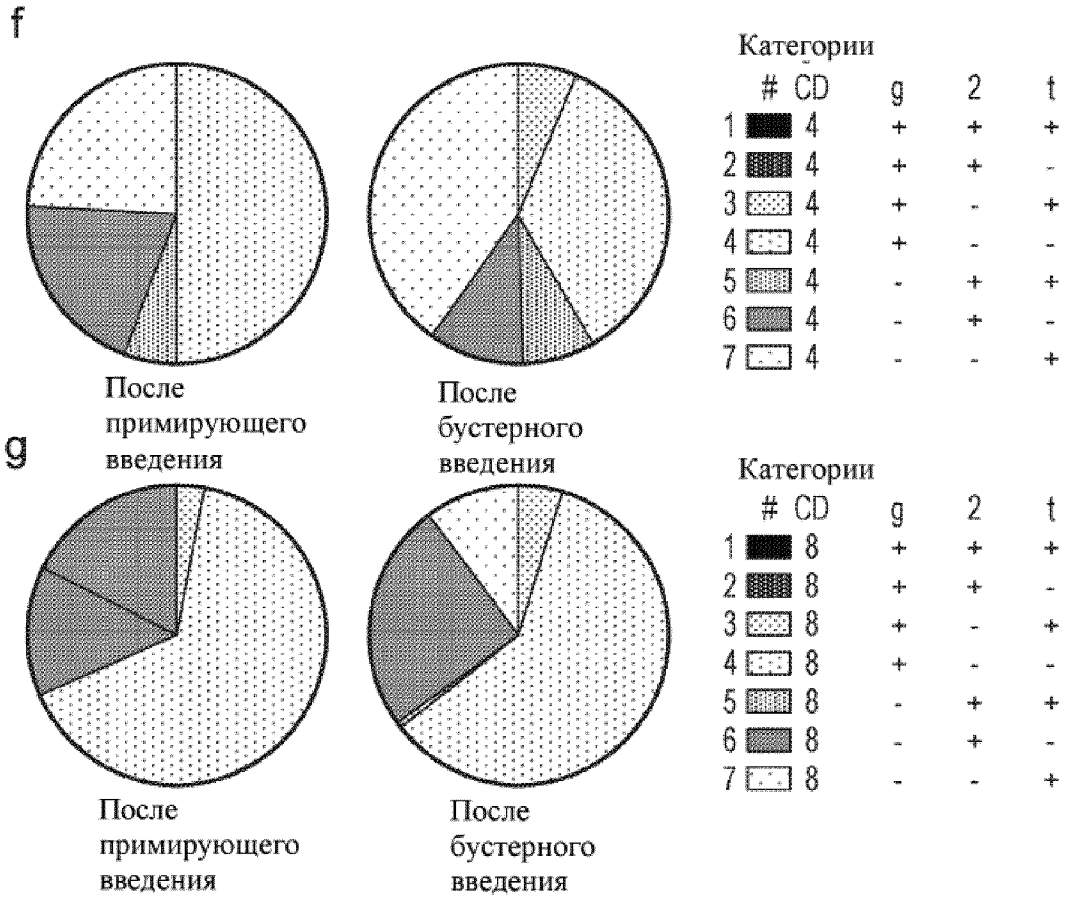
ФИГ. 42


Кратность изменения для SFC
50
40
30
20
10
0
1
101
201
311
431
551
671
771
871
976
1076
1176
Начальное аминокислотное положение пептидов в пуле

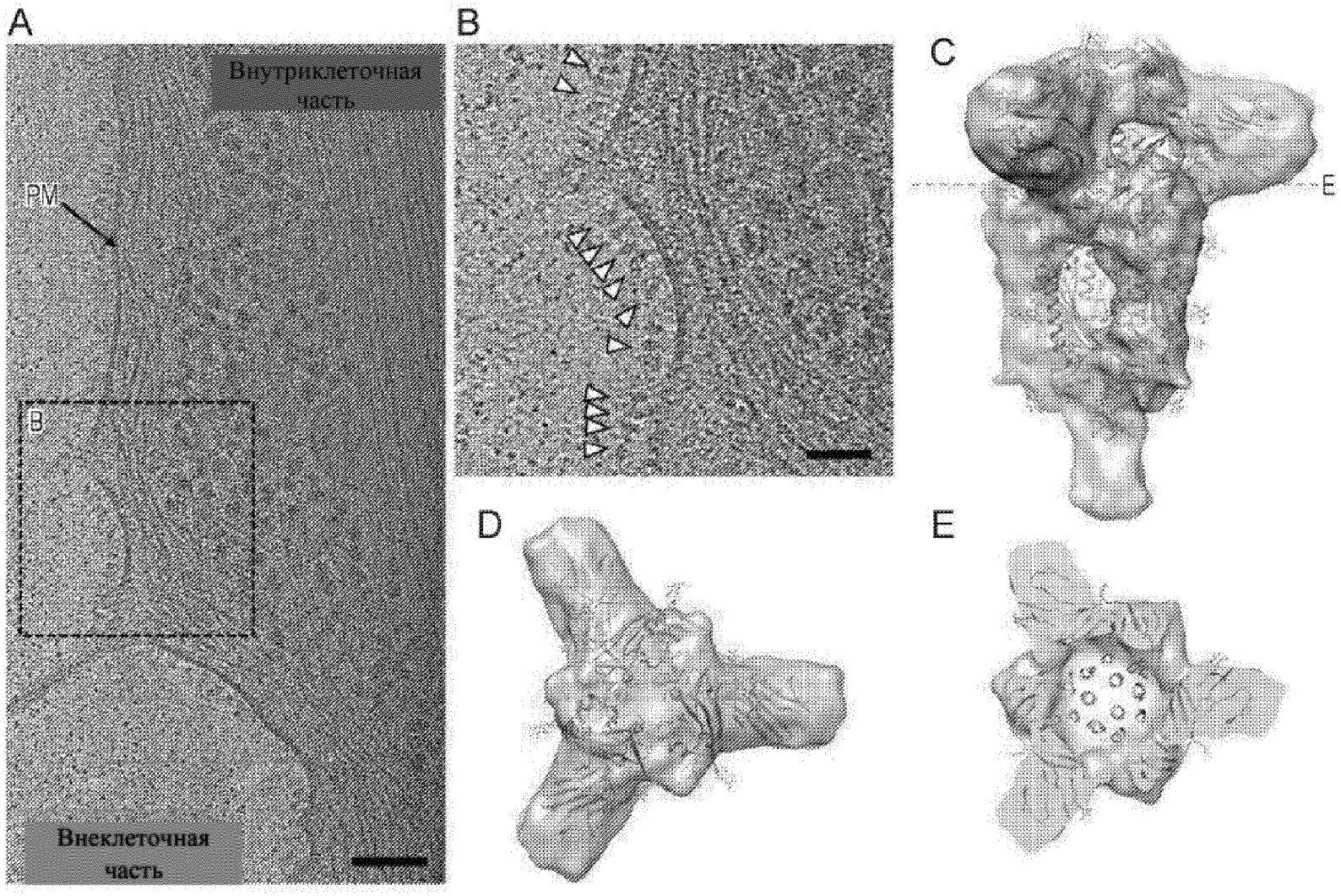
ФИГ. 43


a
CD4+
CD8+
Общий цитокиновый ответ, % субпопуляции
1
0,1
0,01
0,001
После примиру ющей дозы
После бустер ной дозы
После примиру ющей дозы
После бустер ной дозы
b
Экспрессия CD107a, % субпопуляции CD8+ Т-клеток
LLD
c
Частота встречаемости CD4+ клеток
IFNg+
IL2+
IL5+
IL13+
Any Th1
Any Th2
Популяция
d
CD4+Th1/Th2
10
8
6
4
2
0
После примирую щей дозы
После бустерной дозы
CD4 Th1 - IFNγ + IL2
CD4 Th2 - IL5 + IL13
e
Частота GM 0,066 0,025 0,04 0,013 0,007 0,045 0,011 0,013 0,03
Частота встречаемости исходных (D14)
CD4+ IFNg+
CD4+ IL2+
CD4+ TNFa+
CD4+ IL5+
CD4+ IL13+
CD8+ IFNg+
CD8+ IL2+
CD8+ TNFa+
CD8+ CD107a+
Группа
ELISPOT >200 в D0
ELISPOT >200 & IgG+ в D0
ELISPOT <200 & IgG- в D0

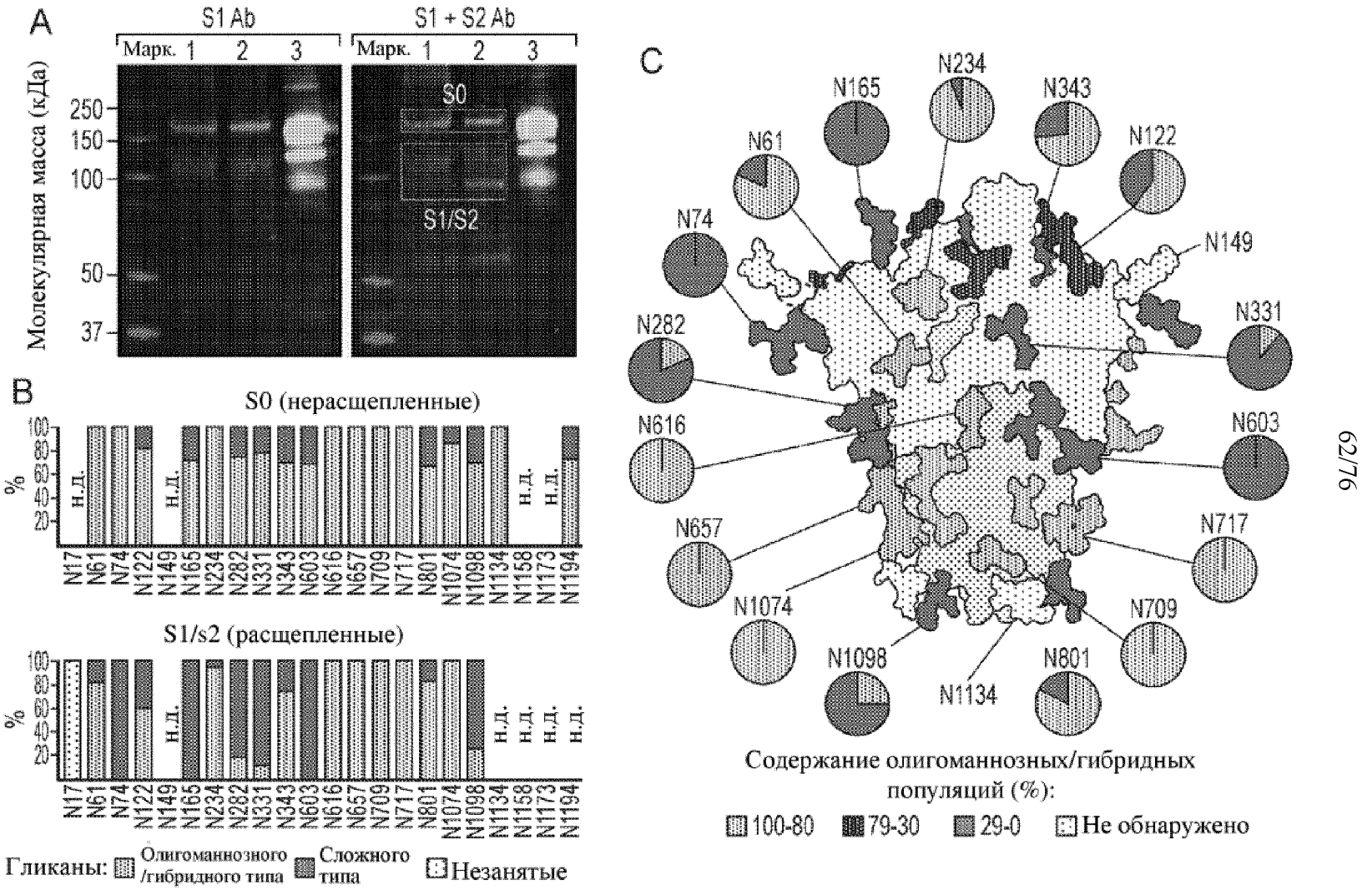
ФИГ. 44



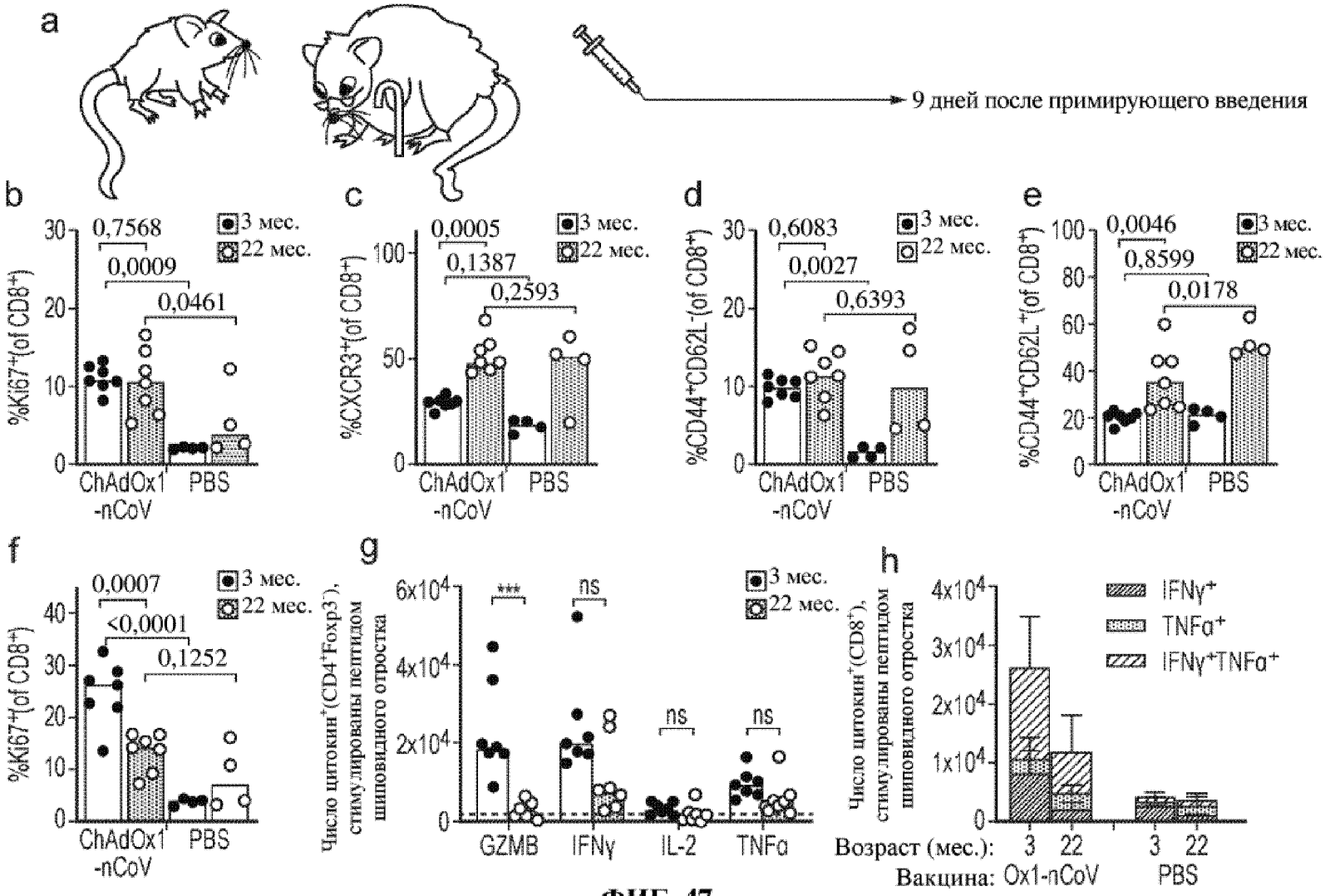
ФИГ. 44 (продолжение)



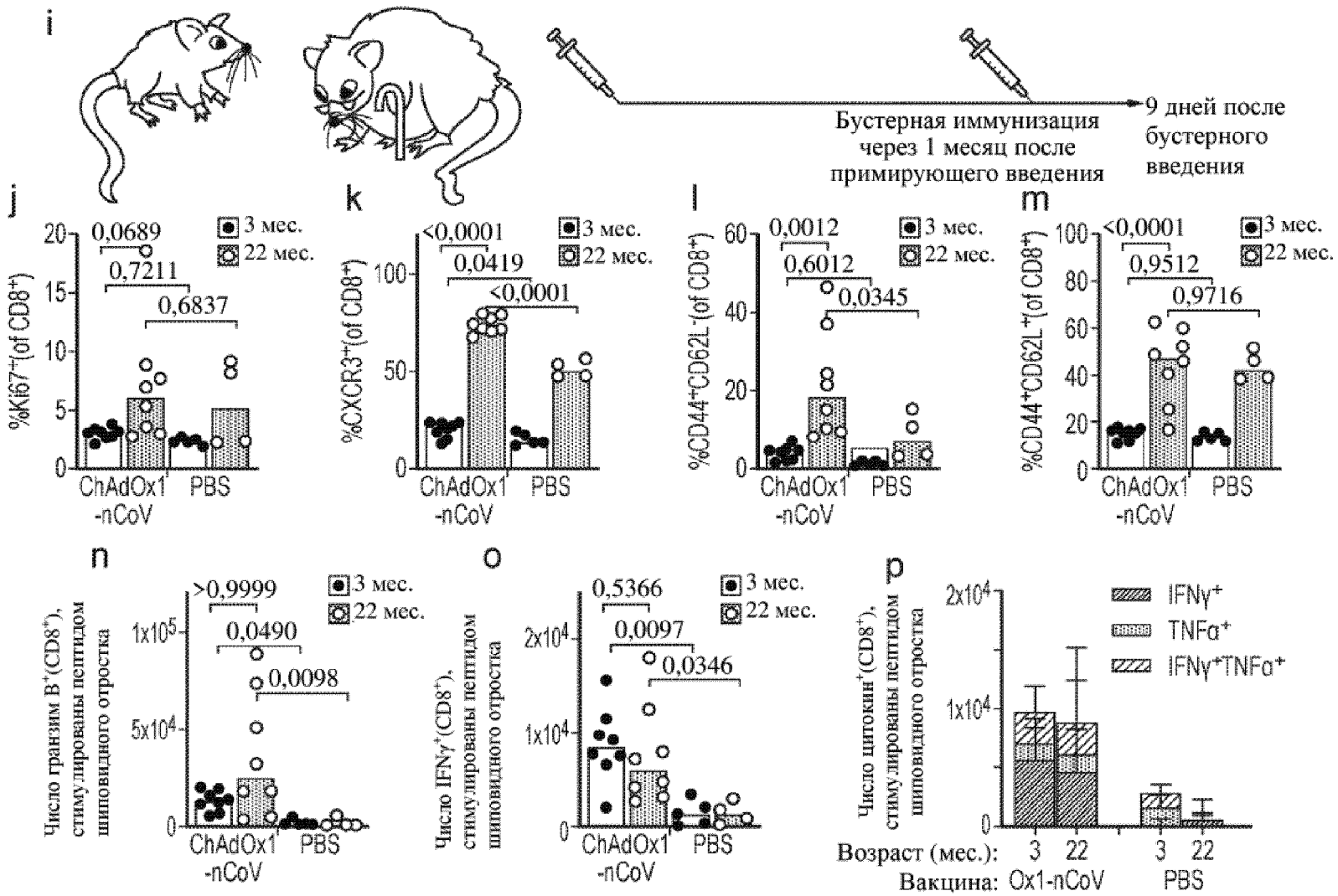
ФИГ. 45


A
S1 Ab
S1 + S2 Ab
Марк. 1 2 3
Марк. 1 2 3
Молекулярная масса (кДа)
250
150
100
50
37
S0
S1/S2
B
S0 (нерасщепленные)
%
н.д.
N17 N61 N74 N122 N149 N165 N234 N282 N331 N343 N603 N616 N657 N709 N717 N801 N1074 N1098 N1134 N1158 N1173 N1194
S1/s2 (расщепленные)
Гликаны: Олигоманнозного /гибридного типа Сложного типа Незанятые
C
N234
N165
N343
N61
N122
N74
N149
N331
N282
N616
N603
N657
N717
N1074
N709
N1098
N801
N1134
Содержание олигоманнозных/гибридных популяций (%):
100-80 79-30 29-0 Не обнаружено

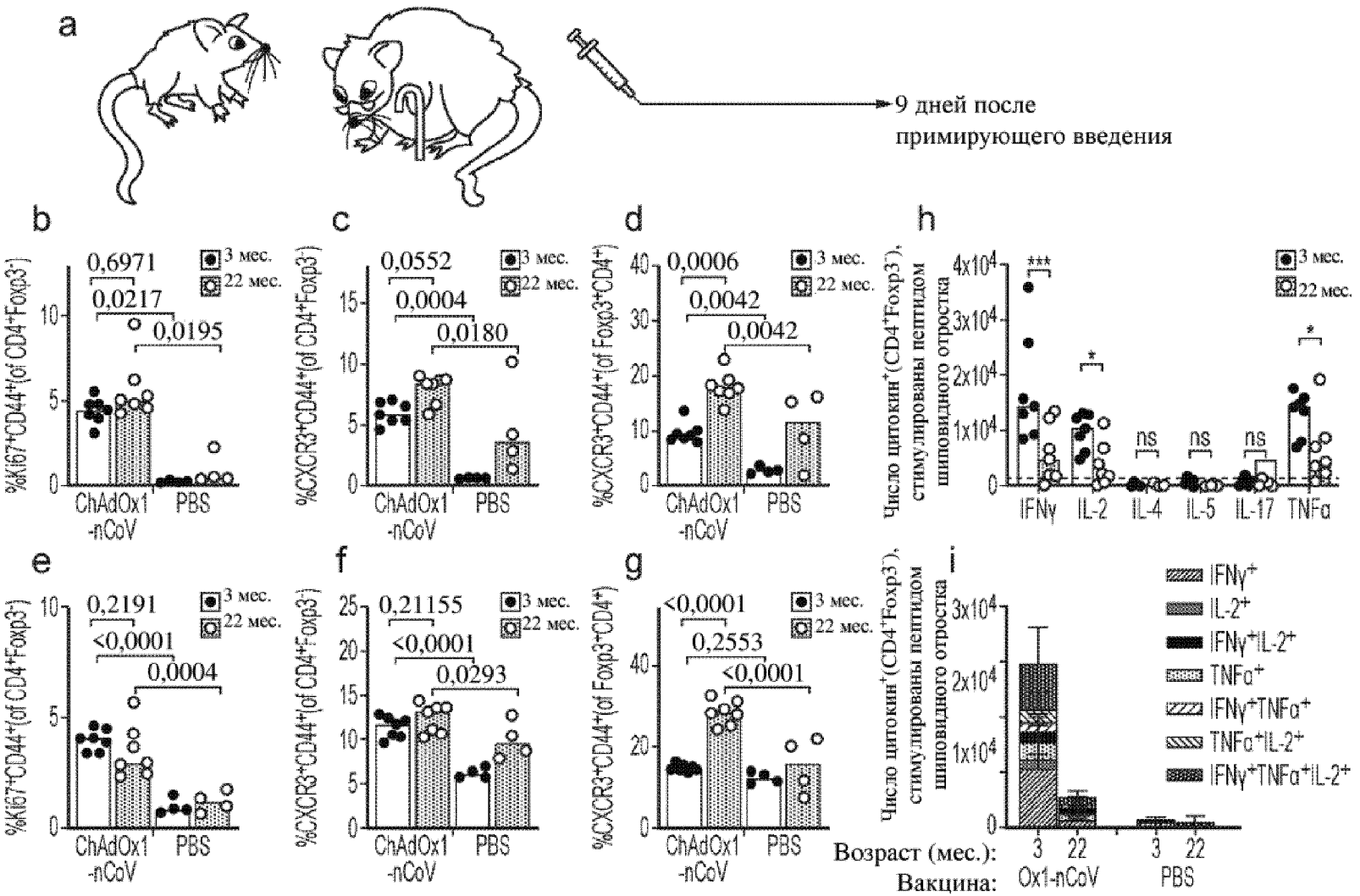
ФИГ. 46


a
9 дней после примирующего введения
b
%Ki67+(of CD8+)
0,7568
0,0009
0,0461
3 мес.
22 мес.
ChAdOx1 -nCoV
PBS
c
%CXCR3+(of CD8+)
0,0005
0,1387
0,2593
d
%CD44+CD62L-(of CD8+)
0,6083
0,0027
0,6393
e
%CD44+CD62L+(of CD8+)
0,0046
0,8599
0,0178
f
%Ki67+(of CD8+)
0,0007
<0,0001
0,1252
g
Число цитокин+(CD4+Foxp3-), стимулированы пептидом шиповидного отростка
***
ns
GZMB
IFNγ
IL-2
TNFα
h
Число цитокин+(CD8+), стимулированы пептидом шиповидного отростка
IFNγ+
TNFα+
IFNγ+TNFα+
Возраст (мес.): 3 22 3 22
Вакцина: Ox1-nCoV PBS

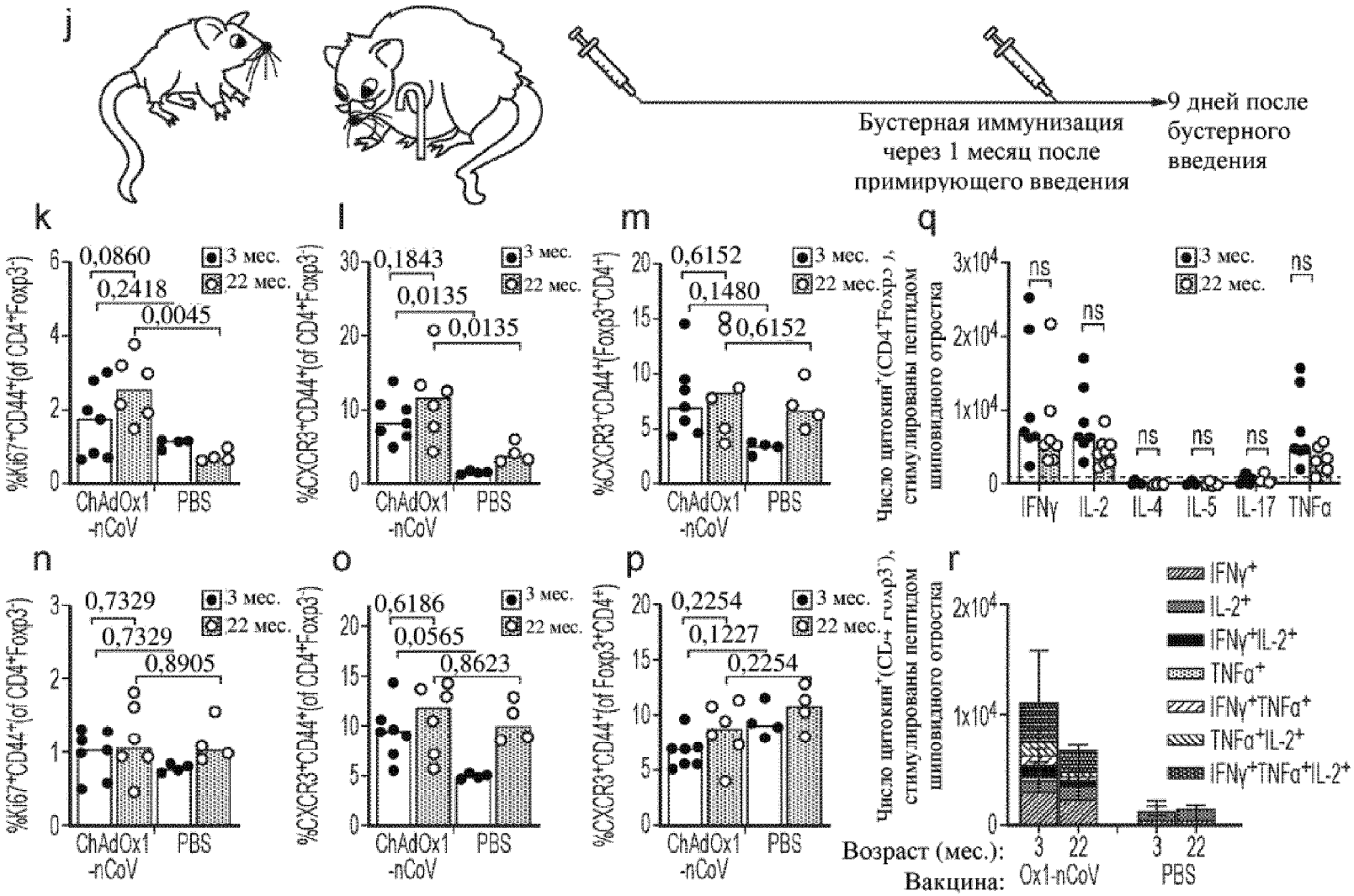
ФИГ. 47



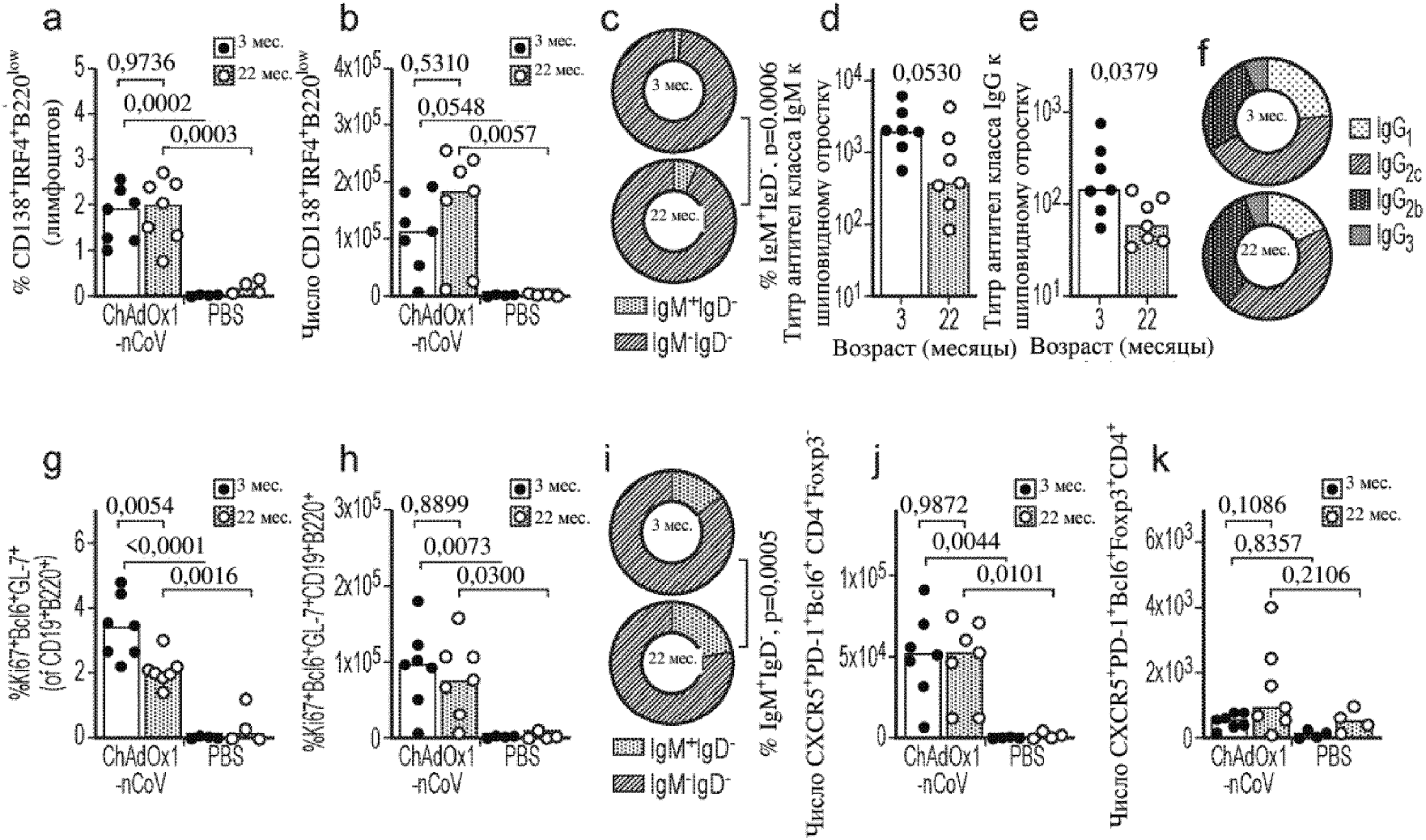
ФИГ. 47 (продолжение)


a
9 дней после
примирующего введения
b
%Ki67+CD44+(of CD4+Foxp3-)
0,6971
0,0217
0,0195
3 мес.
22 мес.
ChAdOx1 -nCoV
PBS
c
%CXCR3+CD44+(of CD4+Foxp3-)
0,0552
0,0004
0,0180
d
%CXCR3+CD44+(of Foxp3+CD4+)
0,0006
0,0042
0,0042
h
Число цитокин+(CD4+Foxp3-), стимулированы пептидом шиповидного отростка
***
*
ns
IFNγ
IL-2
IL-4
IL-5
IL-17
TNFα
e
%Ki67+CD44+(of CD4+Foxp3-)
0,2191
<0,0001
0,0004
f
%CXCR3+CD44+(of CD4+Foxp3-)
0,21155
<0,0001
0,0293
g
%CXCR3+CD44+(of Foxp3+CD4+)
<0,0001
0,2553
<0,0001
i
Число цитокин+(CD4+Foxp3-), стимулированы пептидом шиповидного отростка
IFNγ+
IL-2+
IFNγ+IL-2+
TNFα+
IFNγ+TNFα+
TNFα+IL-2+
IFNγ+TNFα+IL-2+
Возраст (мес.):
Вакцина:
Ox1-nCoV
PBS

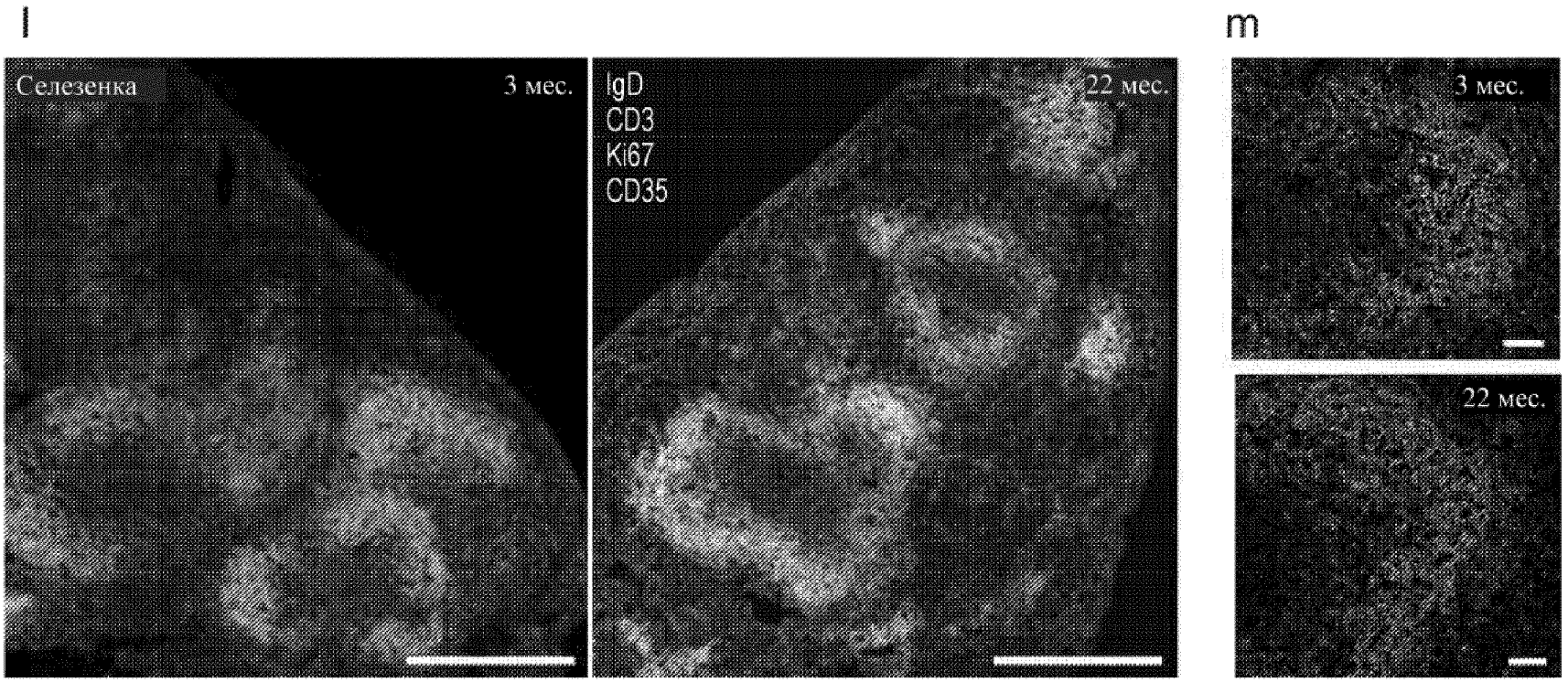
ФИГ. 48



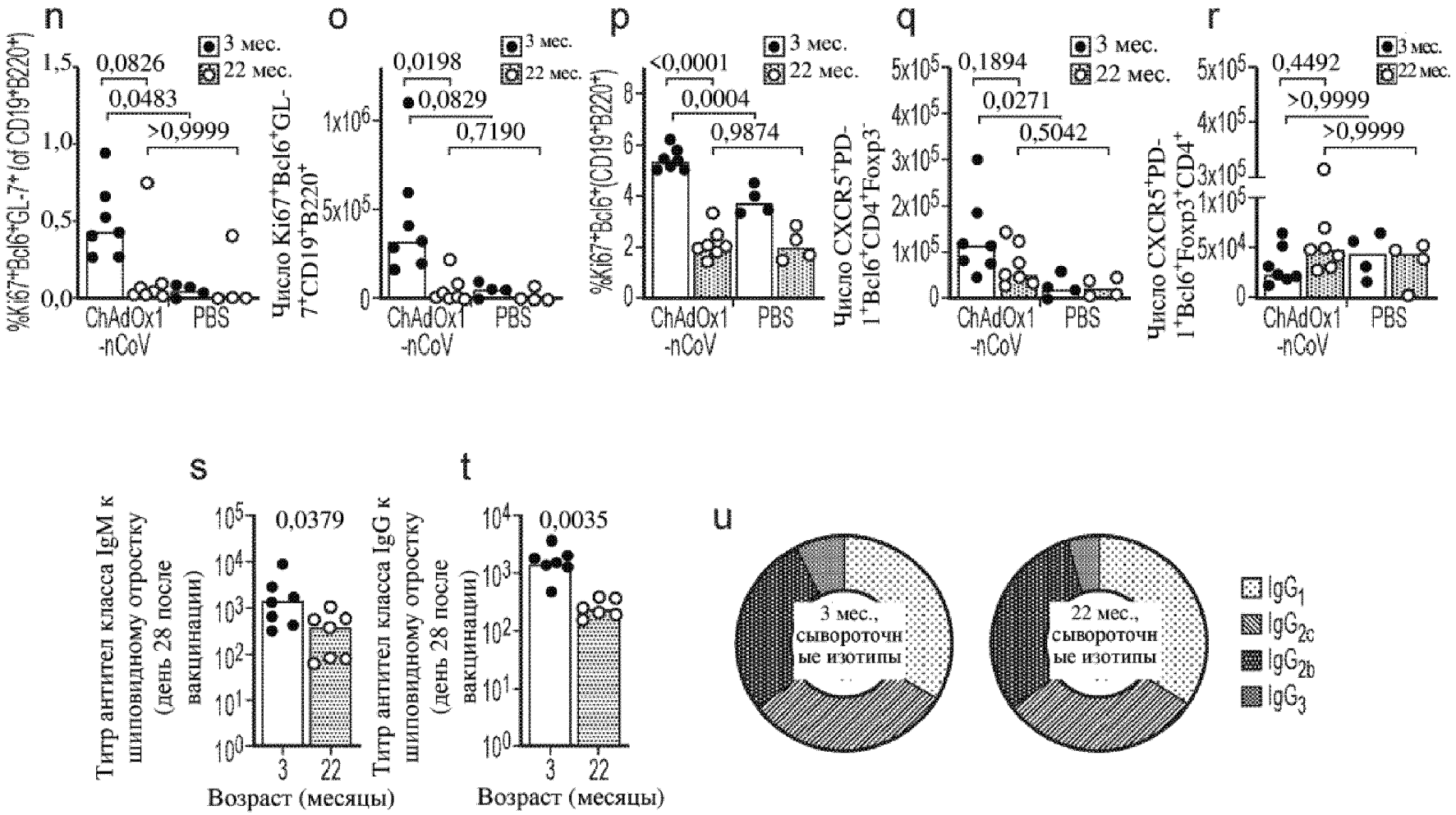
ФИГ. 48 (продолжение)


a
% CD138+IRF4+B220low (лимфоцитов)
0,9736
0,0002
0,0003
3 мес.
22 мес.
ChAdOx1 -nCoV
PBS
b
Число CD138+IRF4+B220low
0,5310
0,0548
0,0057
c
3 мес.
22 мес.
IgM+IgD-
IgM-IgD-
% IgM+IgD-, p=0,0006
d
Титр антител класса IgM к шиповидному отростку
0,0530
Возраст (месяцы)
e
Титр антител класса IgG к шиповидному отростку
0,0379
f
IgG1
IgG2c
IgG2b
IgG3
g
%Ki67+Bcl6+GL-7+ (от CD19+B220+)
0,0054
<0,0001
0,0016
h
%Ki67+Bcl6+GL-7+CD19+B220+
0,8899
0,0073
0,0300
i
% IgM+IgD-, p=0,0005
j
Число CXCR5+PD-1+Bcl6+ CD4+Foxp3-
0,9872
0,0044
0,0101
k
Число CXCR5+PD-1+Bcl6+Foxp3+CD4+
0,1086
0,8357
0,2106

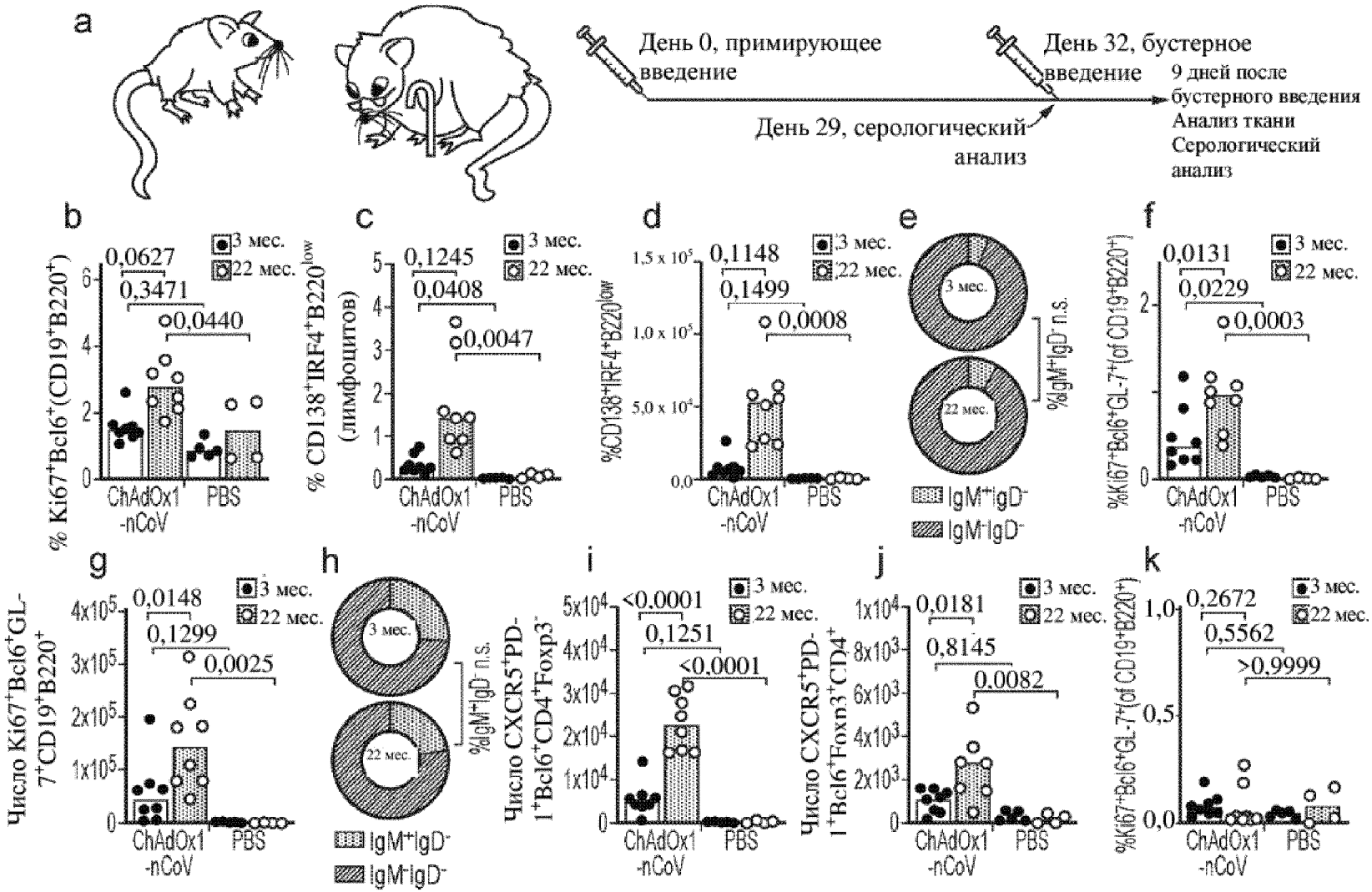
ФИГ. 49



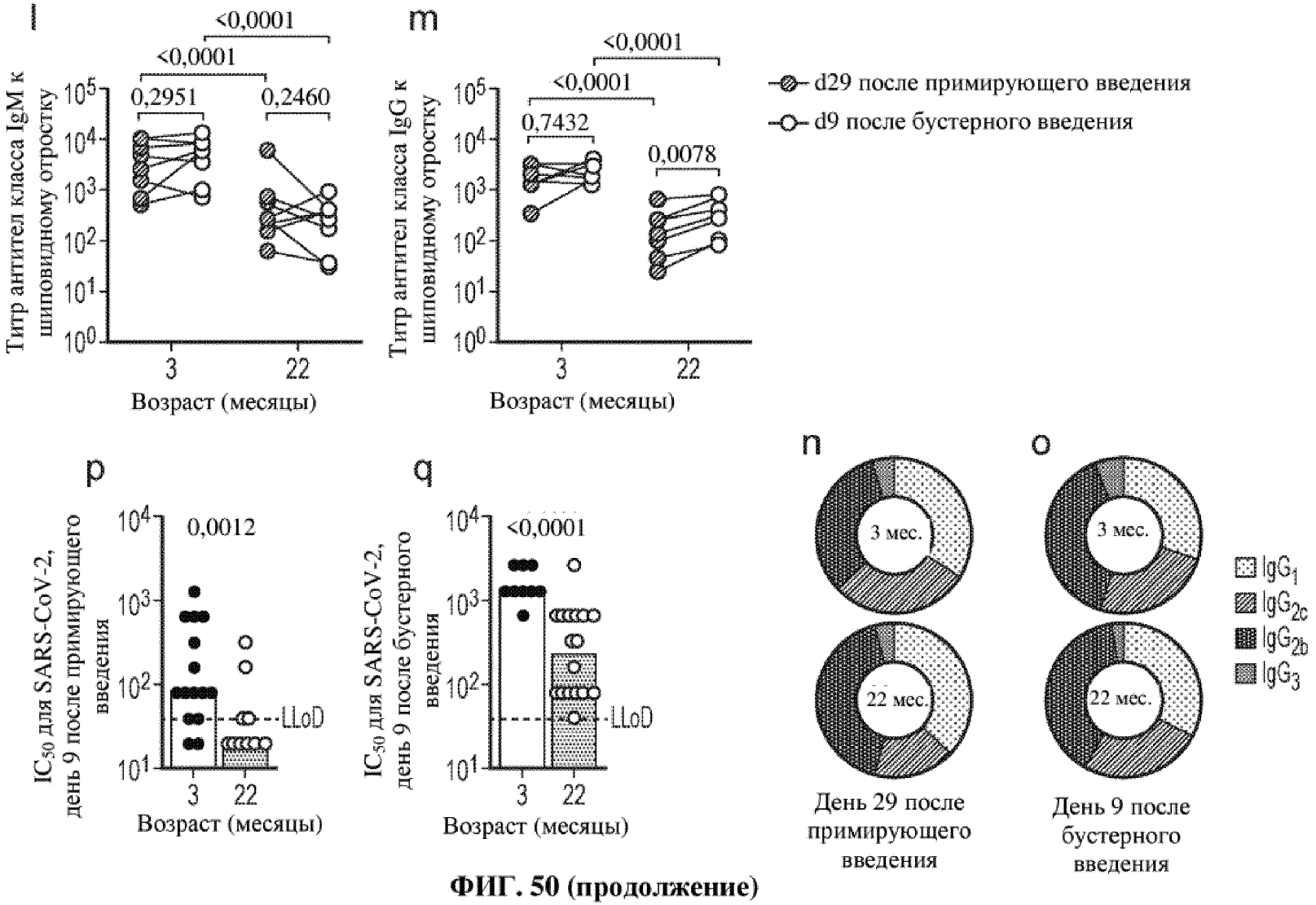
ФИГ. 49 (продолжение)



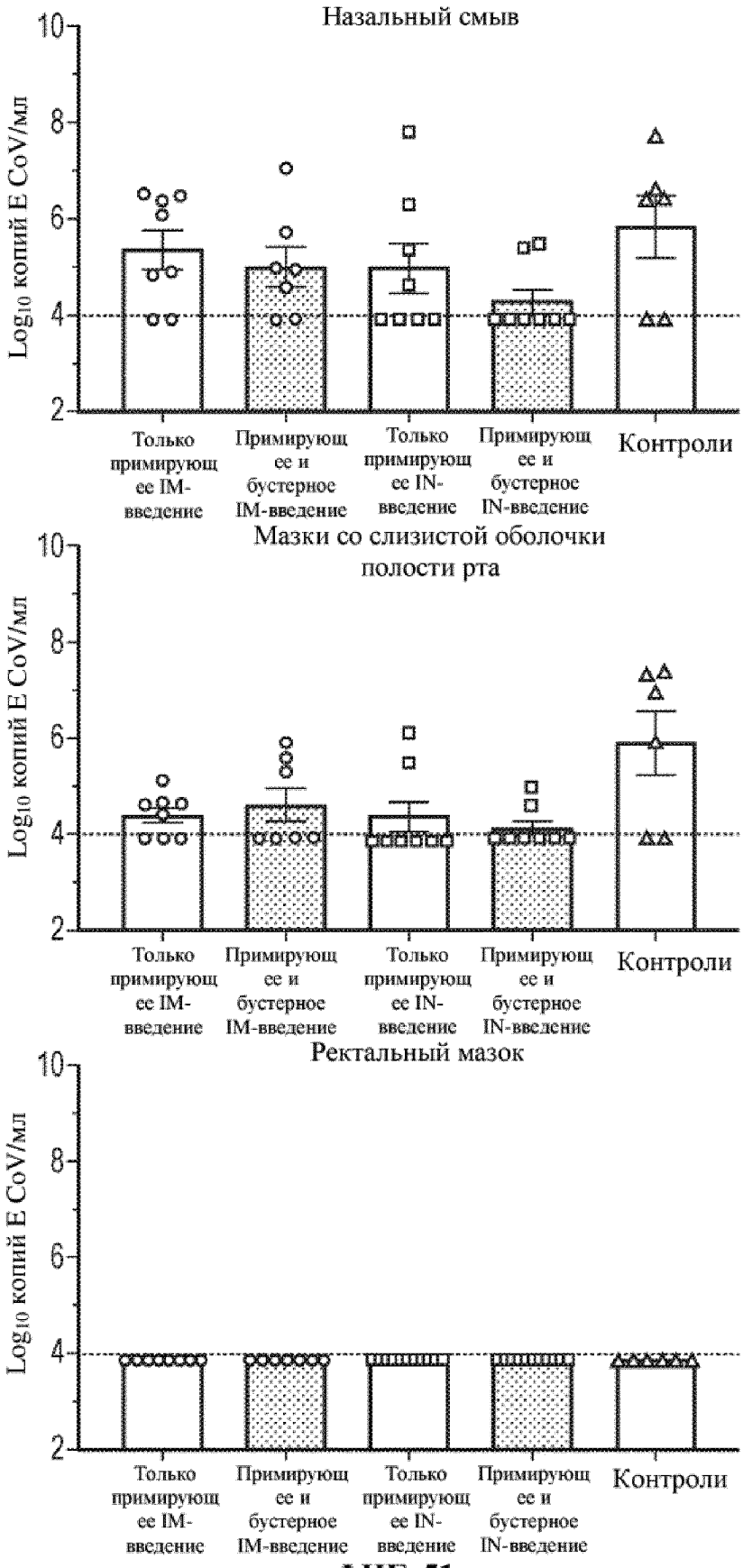
ФИГ. 49 (продолжение)


a
День 0, примирующее введение
День 32, бустерное введение
9 дней после бустерного введения
Анализ ткани
Серологический анализ
День 29, серологический анализ
b
% Ki67+Bcl6+(CD19+B220+)
0,0627
0,3471
0,0440
3 мес.
22 мес.
ChAdOx1 -nCoV
PBS
c
% CD138+IRF4+B220low (лимфоцитов)
0,1245
0,0408
0,0047
d
%CD138+IRF4+B220low
1,5 x 10^5
1,0 x 10^5
5,0 x 10^4
0,0
0,1148
0,1499
0,0008
e
3 мес.
22 мес.
%IgM+IgD- n.s.
IgM+IgD-
IgM-IgD-
f
%Ki67+Bcl6+GL-7+(of CD19+B220+)
0,0131
0,0229
0,0003
g
Число Ki67+Bcl6+GL-7+CD19+B220+
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
0,0148
0,1299
0,0025
h
3 мес.
22 мес.
%IgM+IgD- n.s.
IgM+IgD-
IgM-IgD-
i
Число CXCR5+PD-1+Bcl6+CD4+Foxp3-
5x10^4
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
0
<0,0001
0,1251
<0,0001
j
Число CXCR5+PD-1+Bcl6+Foxn3+CD4+
1x10^4
8x10^3
6x10^3
4x10^3
2x10^3
0
0,0181
0,8145
0,0082
k
%Ki67+Bcl6+GL-7+(of CD19+B220+)
1,0
0,5
0,0
0,2672
0,5562
>0,9999

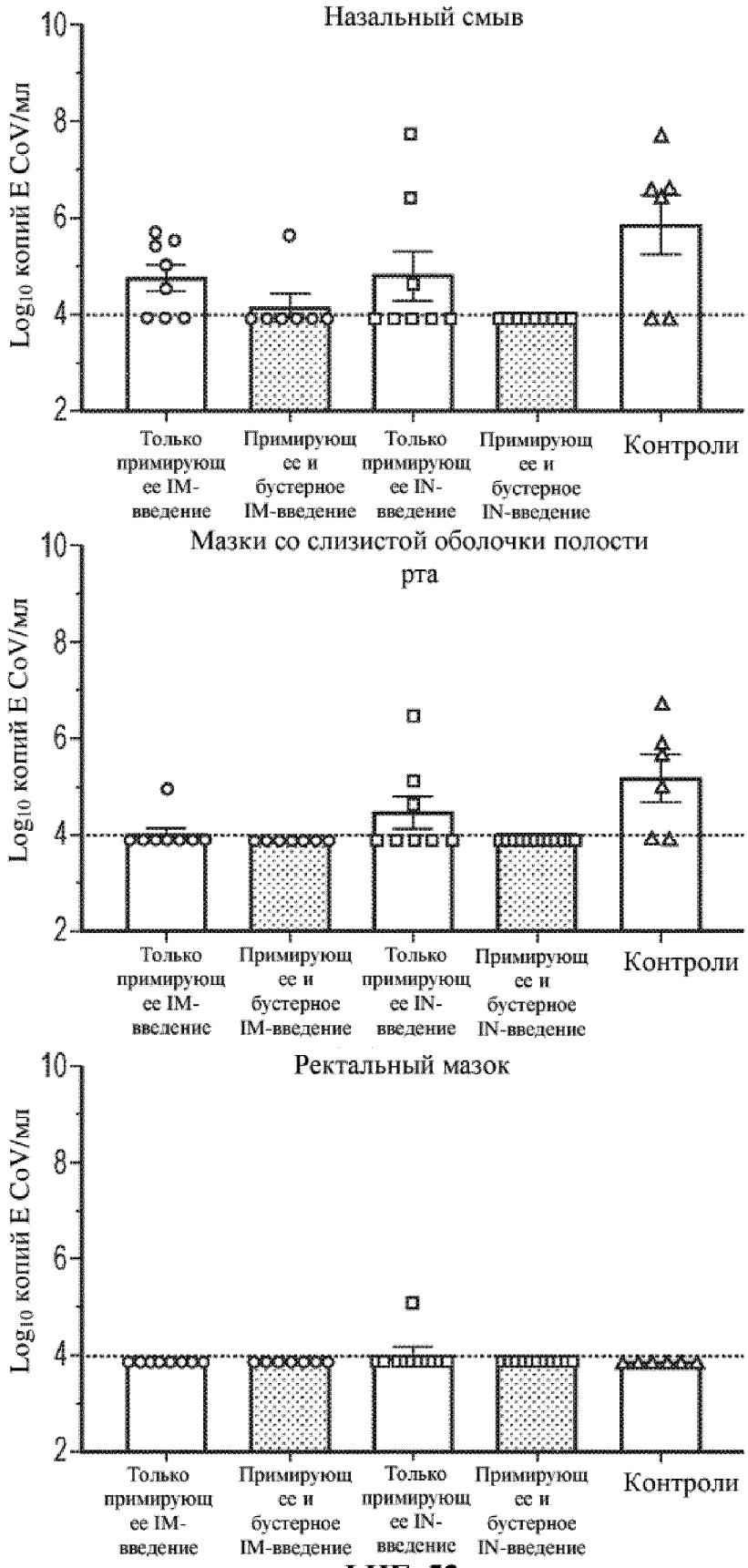
ФИГ. 50



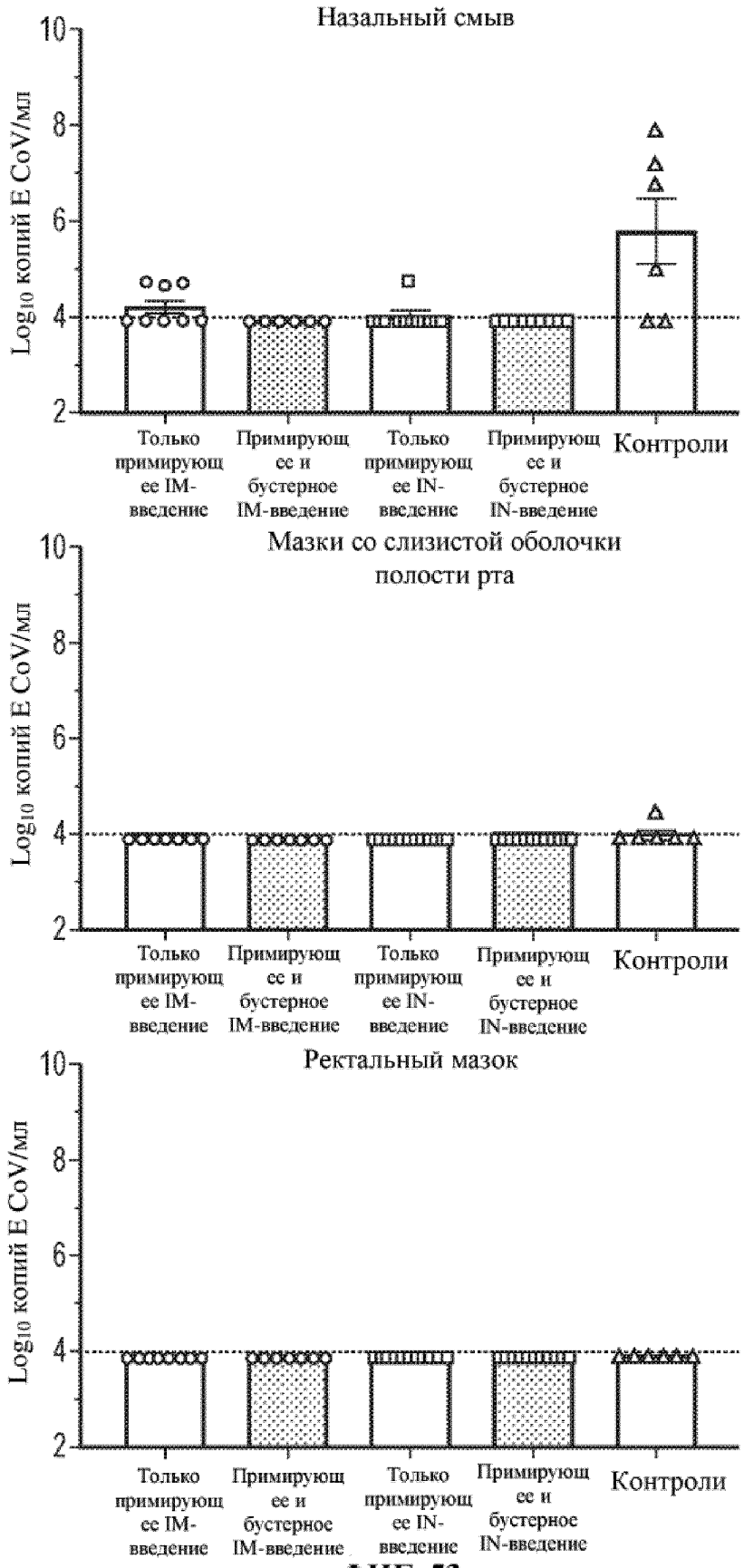
ФИГ. 50 (продолжение)


Назальный смыв
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующее IM-введение
Примирующее и бустерное IM-введение
Только примирующее IN-введение
Примирующее и бустерное IN-введение
Контроли
Мазки со слизистой оболочки полости рта
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующее IM-введение
Примирующее и бустерное IM-введение
Только примирующее IN-введение
Примирующее и бустерное IN-введение
Контроли
Ректальный мазок
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующее IM-введение
Примирующее и бустерное IM-введение
Только примирующее IN-введение
Примирующее и бустерное IN-введение
Контроли

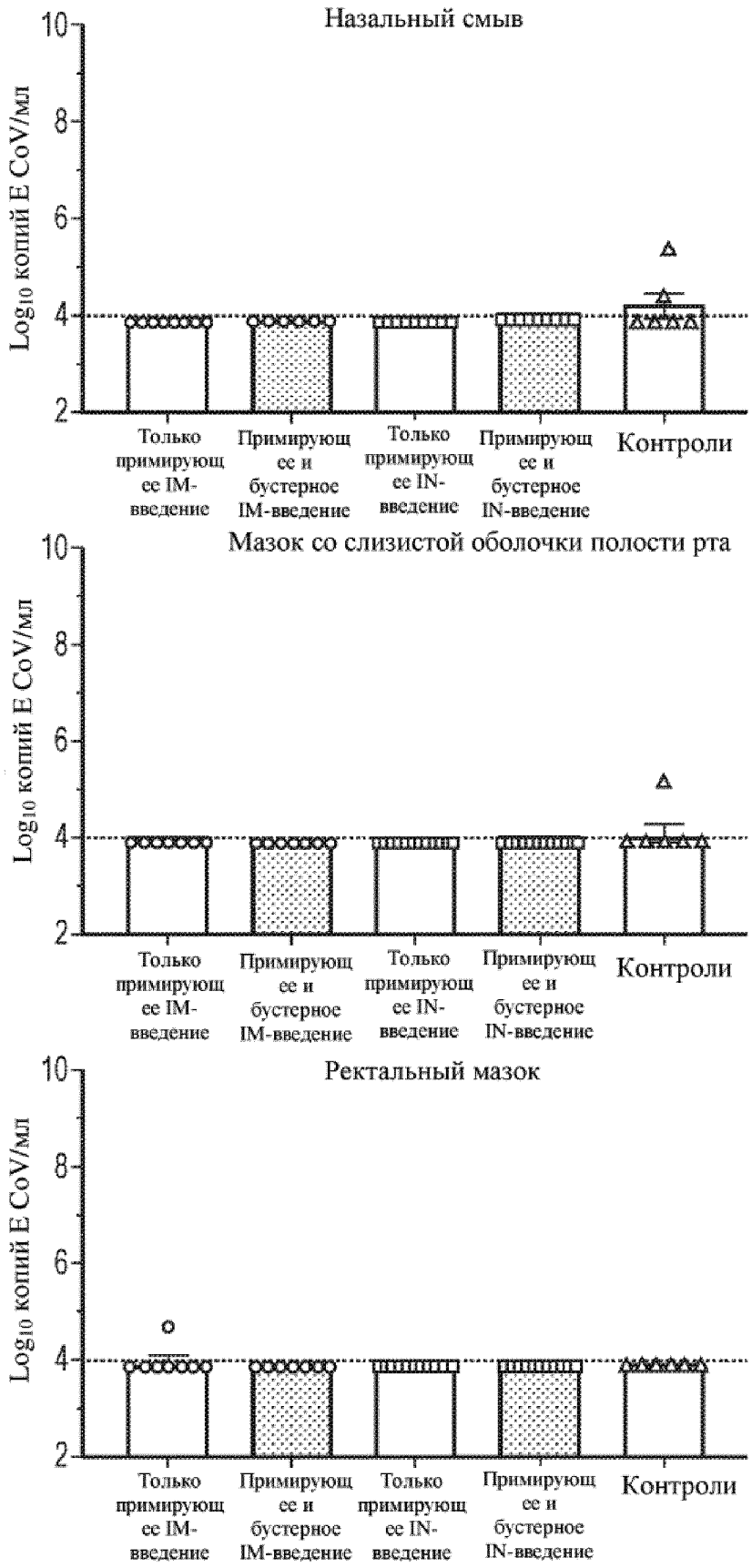
ФИГ. 51


Назальный смыв
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующ ее IM-введение
Примирующ ее и бустерное IM-введение
Только примирующ ее IN-введение
Примирующ ее и бустерное IN-введение
Контроли
Мазки со слизистой оболочки полости рта
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующ ее IM-введение
Примирующ ее и бустерное IM-введение
Только примирующ ее IN-введение
Примирующ ее и бустерное IN-введение
Контроли
Ректальный мазок
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующ ее IM-введение
Примирующ ее и бустерное IM-введение
Только примирующ ее IN-введение
Примирующ ее и бустерное IN-введение
Контроли

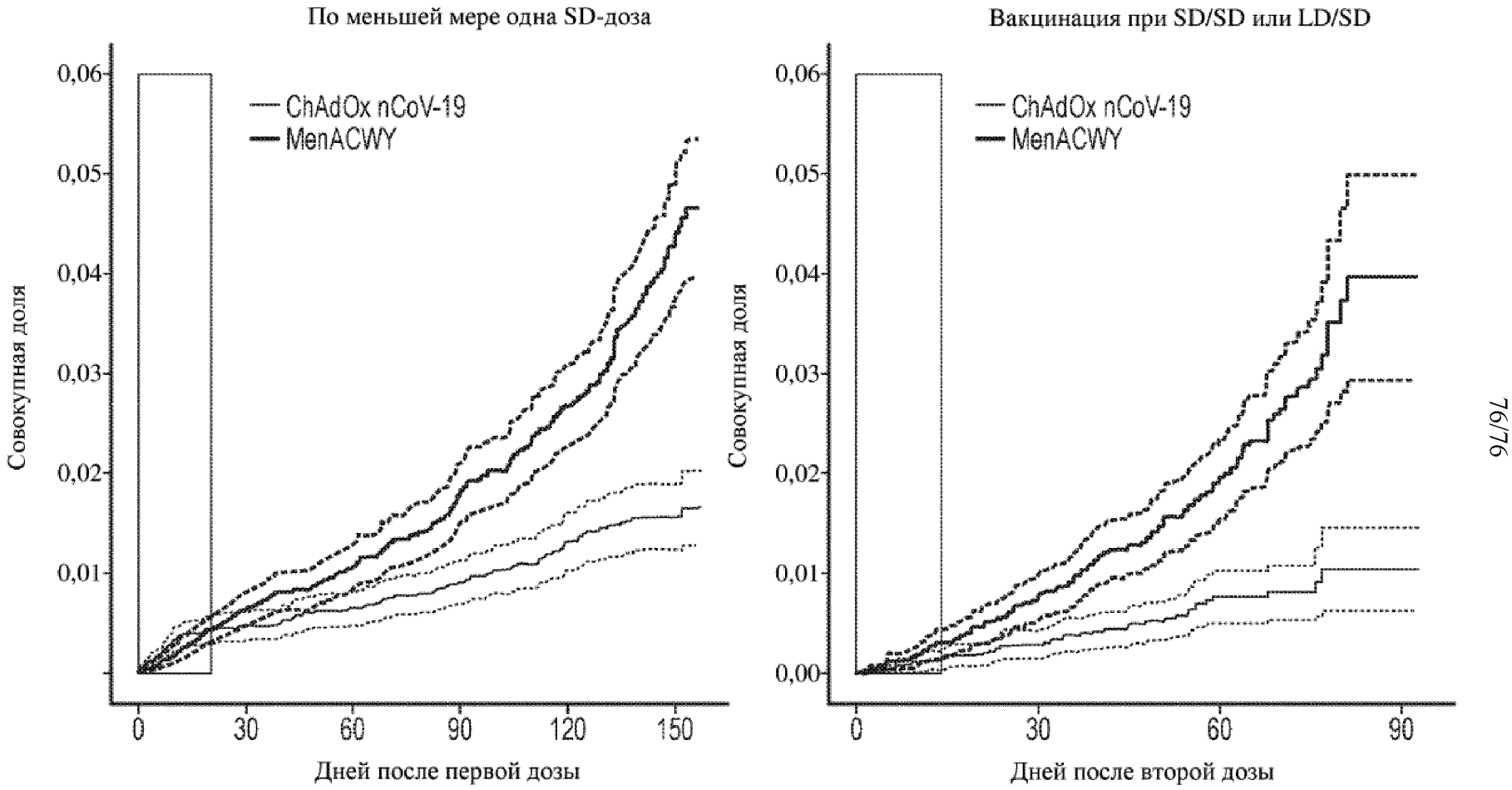
ФИГ. 52


Назальный смыв
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующ ее IM-введение
Примирующ ее и бустерное IM-введение
Только примирующ ее IN-введение
Примирующ ее и бустерное IN-введение
Контроли
Мазки со слизистой оболочки полости рта
Log10 копий E CoV/мл
Только примирующ ее IM-введение
Примирующ ее и бустерное IM-введение
Только примирующ ее IN-введение
Примирующ ее и бустерное IN-введение
Контроли
Ректальный мазок
Log10 копий E CoV/мл
Только примирующ ее IM-введение
Примирующ ее и бустерное IM-введение
Только примирующ ее IN-введение
Примирующ ее и бустерное IN-введение
Контроли

ФИГ. 53


Назальный смыв
Log10 копий E CoV/мл
10
8
6
4
2
Только примирующее IM-введение
Примирующее и бустерное IM-введение
Только примирующее IN-введение
Примирующее и бустерное IN-введение
Контроли
Мазок со слизистой оболочки полости рта
Log10 копий E CoV/мл
Только примирующее IM-введение
Примирующее и бустерное IM-введение
Только примирующее IN-введение
Примирующее и бустерное IN-введение
Контроли
Ректальный мазок
Log10 копий E CoV/мл
Только примирующее IM-введение
Примирующее и бустерное IM-введение
Только примирующее IN-введение
Примирующее и бустерное IN-введение
Контроли

ФИГ. 54


По меньшей мере одна SD-доза
Совокупная доля
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
ChAdOx nCoV-19
MenACWY
0
30
60
90
120
150
Дней после первой дозы
Вакцинация при SD/SD или LD/SD
Совокупная доля
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
ChAdOx nCoV-19
MenACWY
0
30
60
90
Дней после второй дозы

ФИГ. 55