

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292196** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.11.11

(51) Int. Cl. *A61K 39/215* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.27

(54) **ДЕОПТИМИЗИРОВАННЫЙ SARS-CoV-2 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/966,750; 63/048,942; 63/079,337;
63/079,853

(71) Заявитель:
**КОДАДЖЕНИКС ИНК. (US);
СЕРУМ ИНСТИТЮТ ОФ ИНДИЯ
ПРАЙВЕТ ЛИМИТЕД (IN)**

(32) 2020.01.28; 2020.07.07; 2020.09.16;
2020.09.17

(33) US

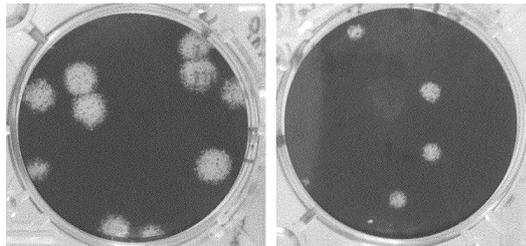
(72) Изобретатель:
**Мюллер Штеффен, Коулман Джон
Роберт, Ван Ин, Ян Чэнь (US)**

(86) PCT/US2021/015246

(87) WO 2021/154828 2021.08.05

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении описаны модифицированные коронавирусы SARS-CoV-2. Эти вирусы были перекодированы, например деоптимизированы по кодонам или деоптимизированы по отклонению в частоте использования кодонов, и они пригодны для снижения вероятности развития или степени тяжести коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, предотвращения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, вызова иммунного ответа или лечения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.



A1

202292196

202292196

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575088EA/032

ДЕОПТИМИЗИРОВАННЫЙ SARS-CoV-2 И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Эта заявка включает притязание на приоритет в соответствии с 35 U.S.C. §119(e) к предварительной заявке на патент США № 62/966750, поданной 28 января 2020 г., № 63/048942, поданной 7 июля 2020 г., № 63/079337, поданной 16 сентября 2020 г., и № 63/079853, поданной 17 сентября 2020 г., которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к модифицированным коронавирусам SARS-CoV-2, композициям для вызова иммунного ответа и вакцинам для обеспечения защитного иммунитета, предотвращения и лечения.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Все публикации в данном документе включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки. Следующее описание включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Это не допущение того, что какая-либо информация, представленная в данном документе, является предшествующим уровнем техники или имеет отношение к заявленному в настоящее время изобретению, или что любая публикация, на которую прямо или косвенно ссылаются, является предшествующим уровнем техники.

[0004] Вспышка нового коронавируса была выявлена в середине декабря 2019 года в городе Ухань в центральном Китае. Был идентифицирован новый штамм коронавируса, ранее обозначавшийся как 2019-nCoV (а также ранее известный как Уханьский коронавирус), теперь обозначаемый как SARS-CoV-2. Смертельный коронавирус был объявлен ВОЗ пандемией. Кризис общественного здравоохранения, связанный с этим вирусом, быстро перерос от унесшего жизни десятков людей и заразившего более тысячи человек на конец января 2020 года до унесшего жизни более 900 000 человек и заразившего более 28 миллионов человек на начало сентября 2020 г., а также привел к гибели более 2 миллионов человек и заражению более 100 миллионов человек по состоянию на последнюю неделю января 2021 года. Вирусы SARS-CoV-2 особенно опасны для пожилых людей и людей с сопутствующими заболеваниями, такими как хроническая болезнь почек, хроническая обструктивная болезнь легких, ослабленный иммунитет в результате трансплантации паренхиматозных органов, ожирение, серьезные сердечные заболевания, серповидно-клеточная анемия и сахарный диабет 2 типа. Соответственно, крайне необходимы профилактические и терапевтические процедуры.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Следующие варианты осуществления и их аспекты описаны и проиллюстрированы в сочетании с композициями и способами, которые предназначены для примера и иллюстрации, не ограничивая объем.

[0006] Различные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают полинуклеотид, кодирующий один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2: причем полинуклеотид перекодирован по сравнению с исходным полинуклеотидом коронавируса SARS-CoV-2, и при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, остается неизменной, или при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, содержит до 20 аминокислотных замен, добавлений или делеций.

[0007] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 может представлять собой SARS-CoV-2 дикого типа. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 может представлять собой природный изолят SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 может представлять собой вашингтонский изолят коронавируса SARS-CoV-2, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты с регистрационным номером GenBank MH985325.1. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 может представлять собой изолят коронавируса SARS-CoV-2 BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019 (SEQ ID NO:1). В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 может представлять собой вариант SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 может представлять собой вариант SARS-CoV-2, выбранный из группы, состоящей из британского варианта, южноафриканского варианта и бразильского варианта.

[0008] В различных вариантах осуществления полинуклеотид может быть перекодирован путем уменьшения отклонения в частоте использования кодонов (CPB - англ.: codon-pair bias) или уменьшения предпочтения кодонов по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления полинуклеотид может быть перекодирован путем увеличения количества динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления каждый из одного или нескольких перекодированных вирусных белков или каждый из одного или нескольких его перекодированных фрагментов может иметь отклонение в частоте использования кодонов менее -0,05, менее -0,1, менее -0,2, менее -0,3 или менее -0,4. В различных вариантах осуществления полинуклеотид может быть деоптимизирован по CPB по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления полинуклеотид может быть деоптимизирован по кодонам по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

[0009] В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ может быть основан на часто используемых кодонах или СРВ у людей. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ может быть основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ может быть основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ может быть основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2 дикого типа.

[0010] В различных вариантах осуществления перекодированная нуклеотидная последовательность может быть выбрана из РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP), фрагмента RdRP, шиповидного белка, фрагмента шиповидного белка и их комбинаций.

[0011] В различных вариантах осуществления полинуклеотид может содержать по меньшей мере одну деоптимизированную область СРВ, которая может быть выбрана из п.о. 11294-12709, п.о. 14641-15903, п.о. 21656-22306, п.о. 22505-23905 и п.о. 24110-25381 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

[0012] В различных вариантах осуществления полинуклеотид может содержать перекодированный шиповидный белок или фрагмент шиповидного белка, в котором может быть удален сайт расщепления фурином.

[0013] В различных вариантах осуществления полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:4, нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:7. В различных вариантах осуществления полинуклеотид может дополнительно содержать один или несколько последовательных аденинов на 3'-конце.

[0014] В различных вариантах осуществления полинуклеотид может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3.

[0015] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают бактериальную искусственную хромосому (ВАС), содержащую любой из перекодированных полинуклеотидов по настоящему изобретению.

[0016] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают вектор, содержащий любой из перекодированных полинуклеотидов по настоящему изобретению.

[0017] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают клетку, содержащую любой из перекодированных полинуклеотидов по настоящему изобретению, любой из ВАС по настоящему изобретению или любой из векторов по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления клетка может представлять собой клетку Vero или клетку почки детеныша хомячка (ВНК).

[0018] Различные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к полипептиду, кодируемому любым из перекодируемых полинуклеотидов по настоящему изобретению.

[0019] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечиваются модифицированным коронавирусом SARS-CoV-2, содержащий любой из перекодированных полинуклеотидов по настоящему изобретению.

[0020] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный коронавирус SARS-CoV-2, содержащий любой из полипептидов по настоящему изобретению, кодируемый любым из перекодируемых полинуклеотидов по настоящему изобретению.

[0021] В различных вариантах осуществления экспрессия одного или нескольких вирусных белков в любом из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению может быть снижена по сравнению с исходным коронавирусом SARS-CoV-2.

[0022] В различных вариантах осуществления снижение экспрессии одного или нескольких его вирусных белков может быть уменьшено в результате перекодирования области, выбранной из RdRP, шиповидного белка и их комбинаций.

[0023] В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 может содержать полинуклеотид, имеющий SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и один или несколько последовательных аденинов на 3'-конце.

[0024] В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 может содержать полипептид, кодируемый полинуклеотидом, имеющим SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и один или несколько последовательных аденинов на 3'-конце.

[0025] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают композицию вакцины для индукции защитного иммунного ответа у субъекта, содержащую: любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления композиция вакцины может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0026] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают иммунную композицию для вызова защитного иммунного ответа у субъекта, содержащую: любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления иммунная композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0027] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту дозы: любого из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению,

или любой из композиций вакцины по настоящему изобретению, или любой из иммунных композиций по настоящему изобретению.

[0028] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту примиряющей дозы любого из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или любой из композиций вакцины по настоящему изобретению, или любой из иммунных композиций по настоящему изобретению; и введение субъекту одной или нескольких бустерных доз любого из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или любой из композиций вакцины по настоящему изобретению, или любой из иммунных композиций по настоящему изобретению.

[0029] В различных вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

[0030] В различных вариантах осуществления доза может представлять собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу. В различных вариантах осуществления доза может составлять около 10^4 - 10^6 БОЕ, или примиряющая доза может составлять около 10^4 - 10^6 БОЕ, а одна или несколько бустерных доз могут составлять около 10^4 - 10^6 БОЕ.

[0031] В различных вариантах осуществления введение может осуществляться интраназальным путем. В различных вариантах осуществления введение можно осуществлять посредством назальных капель. В различных вариантах осуществления введение может осуществляться посредством назального спрея.

[0032] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композицию вакцины по настоящему изобретению или иммунную композицию по настоящему изобретению для применения для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19.

[0033] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композицию вакцины по настоящему изобретению или иммунную композицию по настоящему изобретению для применения для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19, при этом применение включает примиряющую дозу модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию в виде вакцины по настоящему изобретению, или иммунную композицию по настоящему изобретению и одну или несколько бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию вакцины по настоящему изобретению, или иммунной композиции по настоящему изобретению.

[0034] Различные варианты осуществления настоящего изобретения включают применение модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композиции вакцины по настоящему изобретению, или иммунной композиции по

настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19.

[0035] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают применение модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композиции вакцины по настоящему изобретению или иммунной композиции по настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19, при этом производство включает примирующую дозу модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию вакцины по настоящему изобретению, или иммунную композицию по настоящему изобретению и одну или несколько бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию в виде вакцины по настоящему изобретению, или иммунной композиции по настоящему изобретению.

[0036] Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2, обсуждаемых в данном документе. Композиция вакцины по настоящему изобретению представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе композиций в виде вакцины. Иммунная композиция по настоящему изобретению представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе иммунных композиций. В различных вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

[0037] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способ получения модифицированного коронавируса SARS-CoV-2, включающий: получение нуклеотидной последовательности, кодирующей один или несколько белков исходного коронавируса SARS-CoV-2 или один или несколько его фрагментов; перекодирование нуклеотидной последовательности для уменьшения экспрессии одного или нескольких белков или одного или нескольких их фрагментов; и замену нуклеиновой кислоты, имеющей перекодированную нуклеотидную последовательность, в геноме исходного коронавируса SARS-CoV-2 с получением модифицированного генома коронавируса SARS-CoV-2, при этом экспрессия перекодированной нуклеотидной последовательности снижена по сравнению с исходным вирусом.

[0038] В различных вариантах осуществления последовательность исходного коронавируса SARS-CoV-2 может представлять собой вирусную нуклеиновую кислоту дикого типа (wt) или природный изолят.

[0039] В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению.

[0040] Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидными из следующего подробного описания, взятого в сочетании с прилагаемыми чертежами, которые иллюстрируют в качестве примера различные признаки вариантов осуществления изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0041] Примерные варианты осуществления проиллюстрированы на фигурах, на которые даны ссылки. Предполагается, что варианты осуществления и чертежи, раскрытые в данном документе, следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничительные.

[0042] На фиг. 1 показан пример стратегии ослабления и синтеза CoV: клонирование ВАС/трансфекция ДНК в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0043] На фиг. 2 показан пример стратегии ослабления и синтеза CoV: лигирование *in vitro*/трансфекция РНК в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0044] На фиг. 3 изображен фенотип бляшек штаммов SARS-CoV-2 дикого типа (слева) и CDX-005 (справа) на клетках Vero E6. CDX-005 образует бляшки меньшего размера и вырастает до 40% более низких титров на клетках Vero E6 по сравнению с вирусом дикого типа.

[0045] На фиг. 4 показаны изменения массы тела после введения доз SARS-COV-2 и CDX-005 дикого типа у сирийских золотых хомячков.

[0046] На фиг. 5 изображен рост WA1 дикого типа и CDX-005 в клетках Vero. Клетки Vero инфицировали 0,01 MOI WA1 дикого типа или CDX-005 и культивировали в течение до 96 часов при 33°C или 37°C. Собирали супернатанты для выделения вируса. Титры определяли анализами образования бляшек и представляли в виде логарифма БОЕ/мл культуральной среды.

[0047] На фиг. 6a-6d изображено ослабление CDX-005 *in vivo* у хомячков. Хомячков инокулировали 5×10^4 или 5×10^3 БОЕ/мл WA1 *дикого типа*, 5×10^4 БОЕ/мл CDX-005. Вирусную РНК измеряли с помощью количественной ПЦР на 2-й и 4-й дни PI в 6a) обонятельной луковице, 6b) головном мозге и 6c) легких. (N=3/группа; столбцы=SEM). 6d) Инфекционную вирусную нагрузку в ткани левого легкого инокулированных хомячков оценивали с помощью анализа TCID₅₀ и выражали как log₁₀ TCID₅₀/мл. Различия между группами, получавшими CDX-005 и WA1 *дикого типа*, были значительными (N=3/группа; P<0,001; столбцы=SEM). Горизонтальные линии указывают LOD.

[0048] На фиг. 7a-7c изображено ослабление CDX-005 *in vivo* у хомячков. Хомячков инокулировали 5×10^4 или 5×10^3 БОЕ/мл WA1 дикого типа, или 5×10^4 БОЕ/мл CDX-005. 7a) Вес хомячков измеряли ежедневно в течение девяти дней. Изменения веса значительно различались между группами, получавшими CDX-005 и WA1 дикого типа (N=10-40/группа для CDX-005 и WA1 дикого типа 5×10^4 ; N=3-12/группа WA1 *дикого типа* 5×10^3 ; P<0,001; столбцы= SEM). 7b и 7c) Окрашенные гематоксилином и эозином срезы легких исследовали в дни 2, 4 и 6 PI и оценивали на предмет клеточной инфильтрации. (N=3/группа)

[0049] На фиг. 8a-8d показана эффективность у хомячков. 8a) ИФА Spike-S1 проводили с контрольной сывороткой хомячков, не подвергавшихся лечению, или с

сывороткой, полученной от хомячков на 16-й день после инокуляции WA1 дикого типа или 5×10^4 БОЕ COVI-VAC (CDX-005). IgG Spike-S1 у хомячков, инокулированных COVI-VAC (CDX-005), также измеряли на 18-й день (через два дня после заражения WA1). Конечные титры IgG показаны как логарифм разведения, которое в 5 раз превышало фон. (N=3/группа; столбцы=SEM) 8b) Титры нейтрализации уменьшения бляшек (PRNT) против SARS-CoV-2 WA1 были протестированы в сыворотке хомячков через 16 дней после инокуляции 5×10^4 или 5×10^3 БОЕ WA1 дикого типа или 5×10^4 БОЕ COVI-VAC (CDX-005). PRNT является обратной величиной последнего разведения сыворотки, которое уменьшило количество бляшек на 50, 80 или 90 процентов по сравнению с лунками, содержащими сыворотку хомячков, не получавших лечение. (N=3/группа; столбцы=SD); 8c) Вакцинированных CDX-005 хомячков на 16-й день после вакцинации и не подвергавшихся лечению животных заражали 5×10^4 БОЕ SARS-CoV-2 *дикого типа*. Легкие собирали на 2-й день после заражения, и вирусную нагрузку измеряли с помощью количественной ПЦР и выражали как \log_{10} геномов количественной ПЦР/мл ткани. (N=3/группа; столбцы=SD). 8d) Хомячков вакцинировали носителем, 5×10^4 БОЕ WA1 *дикого типа* или 5×10^4 COVI-VAC (CDX-005) и заражали 5×10^4 БОЕ/мл WA1 *дикого типа* интраназально через 27 дней после инокуляции. Вес регистрировали в день заражения и ежедневно в течение 4 дней после этого. (N=5-6 дней 0-2, N=3 дня 3-4, столбцы=SEM). Результаты а) и б) получены в двух отдельных исследованиях на хомячках.

[0050] На фиг. 9 показано ослабление у африканских зеленых обезьян. Промывную жидкость трахеи собирали у обезьян на 4-й и 6-й день после инокуляции 10^6 БОЕ WA1 *дикого типа* или CDX-005. Промывную жидкость подвергали количественной ПЦР в реальном времени для обнаружения вируса. N=3/группа (день 4) или N=2/группа (день 6).

[0051] На фиг. 10 показана интраназальная доза 10^6 SARS-COV2 против CDX-005 *дикого типа* у африканских зеленых обезьян.

[0052] На фиг. 11 показаны титры неочищенной массы CDX-005, собранной из клеток Vero. Клетки Vero WHO "10-87" инокулировали $1,8 \times 10^4$ БОЕ CDX-005 ($\sim 0,01$ MOI), затем выращивали в течение 48 часов. Вирус собирали с использованием различных показанных схем.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0053] Все ссылки, цитируемые в данном документе, полностью включены в качестве ссылки, как если бы они были полностью изложены. Если не указано иное, употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области техники, к которой имеет отношение настоящее изобретение. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., Revised, J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); и Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012) предоставляют

специалисту в данной области общее руководство по многим терминам, используемым в настоящей заявке.

[0054] Специалист в данной области распознает множество способов и материалов, подобных или эквивалентных описанным в данном документе, которые могут быть использованы в практике настоящего изобретения. Действительно, настоящее изобретение никоим образом не ограничивается описанными способами и материалами. Для целей настоящего изобретения следующие термины определены ниже.

[0055] Используемый в данном документе термин «около», когда он используется в связи с цифровым обозначением, на которое делается ссылка, означает числовое значение, на которое делается ссылка, плюс или минус до 5% этого числового обозначения, на которое делается ссылка, если иное конкретно не предусмотрено в данном документе. Например, фраза «около 50%» охватывает диапазон от 45% до 55%. В различных вариантах осуществления термин «около» при использовании в связи с цифровым обозначением, на которое делается ссылка, может означать цифровое указание, на которое делается ссылка, плюс или минус до 4%, 3%, 2%, 1% или 0,5% от этого числового обозначения, на которое делается ссылка, *если* это конкретно предусмотрено формулой изобретения.

[0056] Используемый в данном документе термин «исходный вирус» относится к эталонному вирусу, с которым сравнивают перекодированную нуклеотидную последовательность на предмет кодирования такой же или подобной аминокислотной последовательности.

[0057] Используемые в данном документе термины «уханьский коронавирус» и «SARS-CoV-2» и «2019-nCoV» являются взаимозаменяемыми и относятся к коронавирусу, который имеет последовательность дикого типа, последовательность природного изолята или мутантные формы последовательности дикого типа или последовательности природного изолята, которая вызывает COVID-19. Мутантные формы возникают естественным путем в ходе циклов репликации вируса или в результате генной инженерии.

[0058] «Вариант SARS-CoV-2», используемый в данном документе, относится к мутантной форме SARS-CoV-2, которая развилась естественным образом в ходе циклов репликации вируса, когда он реплицируется и/или передается между хозяевами, такими как люди. Примеры вариантов SARS-CoV-2 включают, помимо прочего, британский вариант (также известный как 20I/501Y.V1, VOC 202012/01 или B.1.1.7), южноафриканский вариант (также известный как 20H/501Y.V2 или B.1.351) и бразильский вариант (также известный как P.1).

[0059] «Природный изолят», используемый в данном документе в отношении SARS-CoV-2, относится к вирусу, такому как SARS-CoV-2, который был выделен от хозяина (например, человека, летучей мыши, кошки, свиньи или любого другого хозяина) или природного резервуара. Последовательность природного изолята может быть идентичной или иметь мутации, возникшие естественным образом в ходе циклов

репликации вируса, когда он реплицируется и/или передается между хозяевами, например, людьми.

[0060] Используемый в данном документе термин «изолят уханьского коронавируса» относится к изоляту дикого типа SARS-CoV-2, который имеет идентификатор доступа: EPI_ISL_402119, представленный 10 января 2020 г. и также упоминаемый как BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019, SEQ ID NO:1, который включен в данный документ посредством ссылки, как если бы он был полностью изложен.

[0061] Термин «вашингтонский изолят коронавируса» в данном контексте относится к изоляту SARS-CoV-2 дикого типа, который имеет регистрационный номер в GenBank MN985325.1 от 5 июля 2020 г., который включен в данный документ посредством ссылки, как если бы он был полностью изложен.

[0062] Используемые в данном документе термины «часто используемые кодоны» или «предпочтение кодонов» относятся к различиям в частоте появления синонимичных кодонов в кодирующей ДНК для конкретных видов, например, человека, коронавируса или SARS-CoV-2.

[0063] «Смещение кодоновой пары», используемое в данном документе, относится к синонимичным парам кодонов, которые используются более или менее часто, чем статистически предсказано, у конкретного вида, например, человека, коронавируса или SARS-CoV-2.

[0064] Используемый в данном документе термин «субъект» означает любое животное или искусственно модифицированное животное. Животные включают, но не ограничиваются ими, людей, приматов, отличных от людей, коров, лошадей, овец, свиней, собак, кошек, кроликов, хорьков, грызунов, таких как мыши, крысы и морские свинки, летучих мышей, змей и птиц. Искусственно модифицированные животные включают, но не ограничиваются ими, мышей SCID с иммунной системой человека. В предпочтительном варианте осуществления субъектом является человек.

[0065] «Вирусный хозяин» означает любое животное или искусственно модифицированное животное, которое может инфицировать вирус. Животные включают, но не ограничиваются ими, людей, приматов, отличных от людей, коров, лошадей, овец, свиней, собак, кошек, кроликов, хорьков, грызунов, таких как мыши, крысы и морские свинки, и птиц. Искусственно модифицированные животные включают, но не ограничиваются ими, мышей SCID с иммунной системой человека. В различных вариантах осуществления вирусный хозяин представляет собой млекопитающее. В различных вариантах осуществления вирусный хозяин представляет собой примата. В различных вариантах осуществления вирусный хозяин представляет собой человека. Варианты осуществления птиц представляют собой виды домашней птицы, включая, но не ограничиваясь ими, кур, индеек, уток и гусей.

[0066] "Профилактически эффективная доза" представляет собой любое количество вакцины или вирусной композиции, которое при введении субъекту, склонному к вирусной инфекции или склонному к поражению вирус-ассоциированным заболеванием,

вызывает у субъекта иммунный ответ, который защищает субъекта от заражения вирусом или поражения заболеванием. «Защита» субъекта означает либо снижение вероятности заражения субъекта вирусом, либо уменьшение вероятности возникновения у субъекта расстройства по меньшей мере в два раза, предпочтительно по меньшей мере в десять раз, в 25 раз, в 50 раз или в 100 раз. Например, если вероятность заражения субъекта вирусом составляет 1%, то двукратное снижение вероятности заражения субъекта вирусом приведет к тому, что у субъекта будет вероятность заражения вирусом 0,5%.

[0067] Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективная доза» представляет собой любое количество вакцины или вирусной композиции, которое при введении субъекту, страдающему заболеванием, против которого эффективна вакцина, индуцирует у субъекта иммунный ответ, вызывающий у субъекта уменьшение, ремиссию или рецидив расстройства и/или его симптомов. В предпочтительных вариантах осуществления предотвращается рецидив заболевания и/или его симптомов. В других предпочтительных вариантах осуществления субъект излечивается от расстройства и/или его симптомов.

[0068] Определенные варианты осуществления любого из настоящих способов иммунизации и лечения дополнительно включают введение субъекту по меньшей мере одного адъюванта. «Адъювант» означает любой агент, подходящий для усиления иммуногенности антигена и усиления иммунного ответа у субъекта. Специалистам в данной области техники хорошо известны многочисленные адъюванты, в том числе адъюванты в виде частиц, подходящие для использования с вакцинами как на основе белков, так и на основе нуклеиновых кислот, а также способы комбинирования адъювантов с антигенами. Подходящие адъюванты для вакцин на основе нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, Quil A, имиквимод, резиквимод и интерлейкин-12, поставляемые в форме очищенного белка или нуклеиновой кислоты. Адъюванты, подходящие для использования с белковой иммунизацией, включают, но не ограничиваются ими, квасцы, неполный адъювант Фрейнда (FIA), сапонин, Quil A и QS-21.

[0069] В данном документе описаны вирусы SARS-CoV-2, гены которых были перекодированы, например, деоптимизированы по кодонам или деоптимизированы по смещению кодоновой пары. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2; однако последовательности нуклеотидов были перекодированы. Перекодирование нуклеотидной последовательности в соответствии с настоящим изобретением приводит к снижению экспрессии белка, его ослаблению или тому и другому. Эти перекодированные вирусы SARS-CoV-2 можно использовать в качестве вакцин и, в частности, для использования в качестве живых ослабленных вакцин.

[0070] Мы создали синтетическую высокоослабленную живую вакцину-кандидат, COVI-VAC (также называемую CDX-005; например, SEQ ID NO: 4)) из SARS-CoV-2

дикого типа. Без связывания какой-либо конкретной теорией, мы полагаем, что наиболее вероятным механизмом ослабления является замедленная трансляция из-за ошибок трансляции, ведущих к неправильной укладке белков, изменения вторичной структуры РНК или измененные регуляторные сигналы все они могут способствовать снижению производства белка. Каким бы ни был механизм, ослабленный вирус COVI-VAC представляет каждый вирусный антиген в его форме *дикого типа*, обеспечивая возможность широкого иммунного ответа и сохраняя эффективность даже в случае генетического дрейфа в целевом штамме. Ожидается, что COVI-VAC будет обладать высокой устойчивостью к реверсии патогенности, поскольку сотни молчащих (синонимичных) мутаций вносят вклад в фенотип. Наши тесты на реверсию показывают, что вакцина стабильна, что подтверждается объемным секвенированием вируса позднего пассажа и оценкой потенциальных изменений в сайте расщепления фурином.

[0071] Наши исследования на хомячках показывают, что COVI-VAC безопасна для этих животных. Она сильно ослаблена, вызывая более низкую общую вирусную нагрузку в легких и обонятельных луковицах и полностью устраняя ее в головном мозге, а также вызывая более низкую живую вирусную нагрузку в легких у животных, привитых COVI-VAC, чем у животных, привитых WA1 *дикого типа*. В отличие от вируса *дикого типа*, COVI-VAC не вызвала потери веса или значительной патологии легких у инокулированных хомячков.

[0072] Исследования на хомячках также показывают, что COVI-VAC эффективно защищает от SARS CoV-2. Оценка титров антител показывает, что она так же эффективна, как вирус *дикого типа*, в индукции сывороточного IgG и нейтрализации антител. Она защищает от заражения *диким типом*; прививка COVI-VAC приводит к снижению титра вируса в легких и полной защите от вируса в головном мозге. Хомячки, привитые COVI-VAC, также не демонстрируют потери веса, наблюдаемой у животных, привитых носителем. Кроме того, нет никаких признаков усиления болезни.

[0073] В совокупности наши данные показывают, что COVI-VAC является частью важного нового класса живых ослабленных вакцин, которые в настоящее время разрабатываются для использования на животных и людях. Она представляет все вирусные антигены, сходные с их нативной аминокислотной последовательностью, может вводиться интраназально, безопасна и эффективна на моделях мелких животных при однократном введении, устойчива к реверсии и может быть выращена до высоких титров при допустимой температуре. В настоящее время проводятся клинические испытания для проверки ее безопасности и эффективности на людях.

[0074] Для конструирования деоптимизированных CDX-005 (например, SEQ ID NO:4) и CDX-007 (например, SEQ ID NO:7) живых ослабленных вакцин-кандидатов сначала геном донорского вируса WA1 *дикого типа* анализировали *in silico* на 19 перекрывающихся фрагментах. Каждый фрагмент имеет примерно 200 п.н. последовательности, перекрывающейся с каждым соседним фрагментом. F1-F19 получали из кДНК РНК вируса WA1 *дикого типа* с помощью ОТ-ПЦР. Последовательность

фрагментов была подтверждена секвенированием по Сенгеру. Затем мы заменили фрагмент 16 вируса WA1 дикого типа на фрагмент 16, который имел деоптимизированную последовательность гена шиповидного белка для создания генома кДНК CDX-005. Точно так же мы заменили фрагмент 14 вируса WA1 дикого типа на фрагмент 14, который имел деоптимизированную последовательность гена шиповидного белка для создания генома кДНК CDX-007.

[0075] В различных вариантах осуществления молекулярный разбор исходного вируса-мишени на небольшие фрагменты, каждый из которых имеет от 50 до 300 п.н., перекрывается с помощью ОТ-ПЦР, и замена любого из этих фрагментов представляет собой процесс, который можно использовать для конструирования генома кДНК или фрагмента генома любого вируса, деоптимизированного по кодонам или кодоновой паре. Затем этот геном кДНК с деоптимизированной кассетой можно использовать для восстановления деоптимизированного вируса с помощью обратной генетики.

[0076] Для CDX-005 и CDX-007 мы выявили одно заметное различие в последовательности нашего донорского вируса WA1 (пассаж клеток Vero 6) по сравнению с опубликованной последовательностью WA1 (пассаж клеток Vero 4). Во время двух дополнительных пассажей вируса WA1 на клетках Vero E6 в Codagenix вируса WA1, полученного от BEI Resources, в гене шиповидного белка произошла делеция 36 нуклеотидов (положение генома 23594-23629). Делеция охватывает 12 аминокислот TNSPRRARSVAS (SEQ ID NO:8), которые включают сайт расщепления многоосновным фурином. Сайт расщепления фурином в шиповидном белке SARS-CoV2 был предложен в качестве потенциальной движущей силы высокопатогенного фенотипа SARS-CoV2 у человека-хозяина. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, мы считаем, что отсутствие расщепления фурином способствует росту вируса SARS-CoV-2 *in vitro* в клетках Vero, и что делеция развилась во время пассирования в культуре клеток Vero. Мы также считаем, что отсутствие сайта расщепления фурином может способствовать ослаблению у человека-хозяина вируса SARS-CoV-2, несущего такую мутацию. Поэтому мы решили включить делецию сайта расщепления фурином, которая была получена в наших вакцинах-кандидатах CDX-005 и CDX-007. Делеция сайта расщепления фурином расположена во фрагменте сборки F15.

[0077] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на вышеизложенном и на дополнительной информации, описанной в данном документе.

[0078] В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и его исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией(-ями), заменой(-ами) до около 20 аминокислотных делеций, замен или добавлений. Однако нуклеотидные последовательности были перекодированы, что приводит к снижению экспрессии белка, его ослаблению или тому и другому. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делециями, заменами или

добавлениями до 10 аминокислот; однако нуклеотидные последовательности были перекодированы, что приводит к снижению экспрессии белка, ослаблению или тому и другому. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией, заменой или добавлением 1-5 аминокислот. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией, заменой или добавлением 6-10 аминокислот. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией, заменой или добавлением 11-15 аминокислот. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией, заменой или добавлением 16-20 аминокислот. Однако снова нуклеотидные последовательности были перекодированы, что приводит к снижению экспрессии белка, его ослаблению или тому и другому. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делециями, заменами или добавлениями до 12 аминокислот; однако нуклеотидные последовательности были перекодированы, что приводит к снижению экспрессии белка, ослаблению или тому и другому. В различных вариантах осуществления аминокислотная делеция, замена или добавление являются результатом делеции(й), замены (замен) или добавления(-й) нуклеиновой кислоты перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности исходного вируса SARS-CoV-2.

[0079] В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией 12 аминокислот. В различных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией 1-5 аминокислот, или делецией 6-10 аминокислот, или делецией 11-15 аминокислот, или делецией 16-20 аминокислот. В различных вариантах осуществления делеция аминокислотной кислоты находится в шиповидном белке, что устраняет сайт расщепления фурином. В различных конкретных вариантах осуществления вирусные белки вирусов SARS-CoV-2 по настоящему изобретению имеют те же аминокислотные последовательности, что и исходный вирус SARS-CoV-2, но с делецией из 12 аминокислот, которая приводит к устранению сайта расщепления фурином на шиповидном белке. В различных вариантах осуществления аминокислотная делеция, замена или добавление являются результатом делеции(й), замены (замен) или

добавления(-й) нуклеиновой кислоты перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности исходного вируса SARS-CoV-2.

[0080] В различных вариантах осуществления перекодируется нуклеиновая кислота, кодирующая белок РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP) вируса SARS-CoV-2. В других вариантах осуществления перекодируется нуклеиновая кислота, кодирующая шиповидный белок (также известный как ген S) вируса SARS-CoV-2. В других вариантах осуществления перекодируются как RdRP, так и шиповидные белки вируса SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления перекодированный шиповидный белок содержит делецию нуклеотидов, которая устраняет сайт расщепления фурином; например, последовательность из 36 нуклеотидов, имеющая SEQ ID NO:5.

[0081] Перекодирование последовательностей, кодирующих RdRP и/или шиповидный белок, ослабленных вирусов по изобретению, было выполнено или может быть выполнено специалистом в данной области техники в свете раскрытия, обсуждаемого в данном документе. В соответствии с различными вариантами осуществления изобретения нуклеотидные замены встраиваются во множество мест в последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, при этом замены вводят в геном множество синонимичных кодонов. В определенных вариантах осуществления замены синонимичных кодонов изменяют смещение кодонов, смещение кодоновой пары, плотность нечастых кодонов или редко встречающихся кодоновых пар, вторичную структуру РНК, содержание динуклеотидов CG и/или TA (или UA), содержание C+G, сайты сдвига рамки трансляции, сайты прекращения трансляции, наличие или отсутствие последовательностей распознавания микроРНК или любой их комбинации в геноме. Замены кодонов могут быть сконструированы в нескольких местах, распределенных по кодирующей последовательности RdRP и/или шиповидного белка, или в нескольких местах, ограниченных частью кодирующей последовательности RdRP и/или шиповидного белка. Из-за большого количества вовлеченных дефектов (т.е. нуклеотидных замен) изобретение позволяет получать стабильно ослабленные вирусы и живые вакцины.

[0082] Как дополнительно обсуждается ниже, в некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая вирус, перекодируется путем замены одного или нескольких кодонов синонимичными кодонами, которые реже используются у хозяина коронавируса SARS-CoV-2 (например, у людей, змей, летучих мышей). В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая вирус, перекодируется путем замены одного или нескольких кодонов синонимичными кодонами, реже используемыми в коронавирусе; например, коронавирус SARS-CoV-2. В определенных вариантах осуществления количество кодонов, замещенных синонимичными кодонами, составляет по меньшей мере 5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 кодонов заменены синонимичными кодонами, реже используемыми в хозяине. В определенных вариантах осуществления модифицированная

последовательность содержит по меньшей мере 20 кодонов, замененных синонимичными кодонами, которые используются реже. В определенных вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит по меньшей мере 50 кодонов, замененных синонимичными кодонами, которые используются реже. В определенных вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит по меньшей мере 100 кодонов, замененных синонимичными кодонами, которые используются реже. В определенных вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит по меньшей мере 250 кодонов, замененных синонимичными кодонами, которые используются реже. В определенных вариантах осуществления модифицированная последовательность содержит по меньшей мере 500 кодонов, замененных синонимичными кодонами, которые используются реже.

[0083] Например, для перекодированного шиповидного белка число кодонов, замещенных синонимичными кодонами, реже используемыми в организме хозяина, составляет по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 кодонов.

[0084] Например, для перекодированного белка RdRP число кодонов, замещенных синонимичными кодонами, реже используемыми в организме хозяина, составляет по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 или 300 кодонов.

[0085] В некоторых вариантах осуществления замена синонимичных кодонов осуществляется теми, которые менее распространены в вирусном хозяине; например, человеку. Другие примеры вирусных хозяев включают, но не ограничиваются ими, указанные выше. В некоторых вариантах осуществления замена синонимичных кодонов осуществляется теми, которые менее распространены в самом вирусе; например, коронавирусе SARS-CoV-2.

[0086] В вариантах осуществления, в которых модифицированная последовательность содержит увеличенное количество динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с соответствующей последовательностью исходного вируса, увеличение составляет около 15-55 динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с соответствующей последовательностью. В различных вариантах осуществления увеличение составляет около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 55 динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с соответствующей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления увеличенное количество динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с соответствующей последовательностью составляет около 10-75, 15-25, 25-50 или 50-75 динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с соответствующей последовательностью.

[0087] В некоторых вариантах осуществления кодоновые пары вируса перекодируются для уменьшения (т.е. снижения значения) отклонения в частоте использования кодонов. В определенных вариантах осуществления отклонения в частоте использования кодонов снижается путем идентификации кодоновой пары в последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, имеющей показатель кодоновой пары, который можно уменьшить, и уменьшения смещения кодоновой пары

путем замены кодоновой пары кодоновой парой, которая имеет более низкий показатель кодоновой пары. В некоторых вариантах осуществления эта замена кодоновой пары принимает форму перегруппировки существующих кодонов последовательности. В некоторых таких вариантах осуществления подмножество кодоновых пар заменяется путем перегруппировки подмножества синонимичных кодонов. В других вариантах осуществления кодоновые пары заменяют путем максимального количества перегруппированных синонимичных кодонов. Следует отметить, что, хотя перегруппировка кодонов приводит к отклонению в частоте использования кодонов, которое уменьшается (становится более отрицательным) для последовательности, кодирующей вирус, в целом, а перегруппировка приводит к снижению CPS во многих местах, может сопровождаться повышением CPS в других местах, но в среднем показатели кодоновых пар и, следовательно, CPB модифицированной последовательности снижаются. В некоторых вариантах осуществления перекодирование кодонов или кодоновых пар может учитывать изменение содержания G+C в последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок. В определенных вариантах осуществления перекодирование кодонов или кодоновых пар может учитывать изменение частоты динуклеотидов CG и/или TA в последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок.

[0088] В определенных вариантах осуществления перекодированная последовательность, кодирующая RdRP и/или шиповидный белок, имеет смещение кодоновой пары менее -0,1, или менее -0,2, или менее -0,3, или менее -0,4. В некоторых вариантах осуществления перекодированная последовательность, кодирующая RdRP и/или шиповидный белок, имеет смещение кодоновой пары менее -0,05, или менее -0,06, или менее -0,07, или менее -0,08, или менее -0,09, или менее -0,1, или менее -0,11, или менее -0,12, или менее -0,13, или менее -0,14, или менее -0,15, или менее -0,16, или менее -0,17, или менее -0,18, или менее -0,19, или менее -0,2, или менее -0,25, или менее -0,3, или менее -0,35, или менее -0,4, или менее -0,45, или менее -0,5.

[0089] В определенных вариантах осуществления смещение кодоновой пары перекодированной последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, уменьшено по меньшей мере на 0,1, или по меньшей мере на 0,2, или по меньшей мере на 0,3, или по меньшей мере на 0,4 по сравнению с исходной последовательностью, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, из которой он получен (например, исходная последовательность RdRP, кодирующая RdRP и/или шиповидный белок, последовательность RdRP дикого типа и/или последовательность, кодирующая шиповидный белок). В определенных вариантах осуществления перегруппировка синонимичных кодонов последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, обеспечивает снижение отклонения в частоте использования кодонов по меньшей мере на 0,1, или по меньшей мере на 0,2, или по меньшей мере на 0,3, или по меньшей мере на 0,4 по сравнению с исходной последовательностью, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, из которой он получен. В определенных вариантах осуществления

смещение кодоновой пары перекодированной последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, уменьшено по меньшей мере на 0,05, или по меньшей мере на 0,06, или по меньшей мере на 0,07, или по меньшей мере на 0,08, или по меньшей мере на 0,09, или по меньшей мере на 0,1, или по меньшей мере на 0,11, или по меньшей мере на 0,12, или по меньшей мере на 0,13, или по меньшей мере на 0,14, или по меньшей мере на 0,15, или по меньшей мере на 0,16, или по меньшей мере на 0,17, или по меньшей мере на 0,18, или по меньшей мере на 0,19, или по меньшей мере на 0,2, или по меньшей мере на 0,25, или по меньшей мере на 0,3, или по меньшей мере на 0,35, или по меньшей мере на 0,4, или по меньшей мере на 0,45, или по меньшей мере на 0,5 по сравнению с соответствующей последовательностью исходного вируса. В определенных вариантах осуществления вычисление должно выполняться при сравнении соответствующей последовательности; например, соответствующую последовательность вируса дикого типа (например, последовательность, кодирующую RdRP и/или шиповидный белок, на вирусе дикого типа).

[0090] Обычно такие замены и изменения снижают экспрессию кодируемых вирусных белков без изменения аминокислотной последовательности кодируемого белка. В определенных вариантах осуществления изобретение также включает изменения в последовательности, кодирующей RdRP и/или шиповидный белок, которые приводят к замене несинонимичных кодонов и заменам аминокислот в кодируемом белке, которые могут быть или не быть консервативными. В некоторых вариантах осуществления эти замены и изменения дополнительно включают замены или изменения, которые приводят к делециям, добавлениям, заменам аминокислот. Например, шиповидный белок может быть перекодирован с делецией в 36 нуклеотидов, что приводит к элиминации сайта расщепления фурином.

[0091] Большинство аминокислот кодируются более чем одним кодоном. См. генетический код в таблице 1. Например, аланин кодируется GCU, GCC, GCA и GCG. Три аминокислоты (Leu, Ser и Arg) кодируются шестью разными кодонами, тогда как только Trp и Met имеют уникальные кодоны. «Синонимичные» кодоны - это кодоны, кодирующие одну и ту же аминокислоту. Таким образом, например, CUU, CUC, CUA, CUG, UUA и UUG являются синонимичными кодонами, кодирующими Leu. Синонимичные кодоны не используются с одинаковой частотой. В общем, наиболее часто используемые кодоны в конкретном организме - это те, для которых много родственной тРНК, и использование этих кодонов увеличивает скорость и/или точность трансляции белка. И наоборот, тРНК для редко используемых кодонов обнаруживаются на относительно низком уровне, и считается, что использование редких кодонов снижает скорость и/или точность трансляции.

Таблица 1. Генетический код

	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U

	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

^a Первый нуклеотид в каждом кодоне, кодирующем определенную аминокислоту, показан в крайнем левом столбце; второй нуклеотид показан в верхнем ряду; и третий нуклеотид показан в самом правом столбце.

Смещение кодона

[0092] Используемый в данном документе термин «редкий» кодон представляет собой один из по меньшей мере двух синонимичных кодонов, кодирующих конкретную аминокислоту, которая присутствует в мРНК со значительно более низкой частотой, чем наиболее часто используемый кодон для этой аминокислоты. Таким образом, редкий кодон может встречаться примерно в 2 раза реже, чем наиболее часто используемый кодон. Предпочтительно редкий кодон присутствует по меньшей мере в 3 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз реже, чем частота наиболее часто используемого кодона для аминокислоты. И наоборот, «частый» кодон - это один из по меньшей мере двух синонимичных кодонов, кодирующих конкретную аминокислоту, которая присутствует в мРНК со значительно более высокой частотой, чем наименее часто используемый кодон для этой аминокислоты. Часто встречающийся кодон может присутствовать примерно в 2 раза, предпочтительно по меньшей мере в 3 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 5 раз чаще, чем наименее часто используемый кодон для аминокислоты. Например, человеческие гены используют лейциновый кодон CTG в 40% случаев, но используют синонимичный СТА только в 7% случаев (см. таблицу 2). Таким образом, CTG является частым кодоном, тогда как СТА является редким кодоном. Примерно в соответствии с этими частотами использования в геноме имеется 6 копий гена тРНК, распознающего CTG, тогда как имеется только 2 копии гена тРНК, распознающего

СТА. Точно так же человеческие гены используют частые кодоны ТСТ и ТСС для серина в 18% и 22% случаев соответственно, а редкий кодон ТСГ только в 5% случаев. ТСТ и ТСС читаются посредством прецессии одной и той же тРНК, которая имеет 10 копий своего гена в геноме, тогда как ТСГ читается тРНК только с 4 копиями. Хорошо известно, что те мРНК, которые очень активно транслируются, сильно склонны использовать только наиболее часто встречающиеся кодоны. Сюда входят гены рибосомных белков и гликолитических ферментов. С другой стороны, мРНК относительно немногочисленных белков могут использовать редкие кодоны.

Таблица 2. Использование кодонов у *Homo sapiens* (source: www.kazusa.or.jp/codon/)

Аминокислота	Кодон	Номер	/1000	Фракция	Аминокислота	Кодон	Номер	/1000	Фракция
Gly	GGG	636457.00	16,45	0,25	Trp	TGG	510256.00	13,19	1,00
Gly	GGA	637120.00	16,47	0,25	Конец	TGA	59528.00	1,54	0,47
Gly	GGT	416131.00	10,76	0,16	Cys	TGT	407020.00	10,52	0,45
Gly	GGC	862557.00	22,29	0,34	Cys	TGC	487907.00	12,61	0,55
Glu	GAG	1532589.00	39,61	0,58	Конец	TAG	30104.00	0,78	0,24
Glu	GAA	1116000.00	28,84	0,42	Конец	TAA	38222.00	0,99	0,30
Asp	GAT	842504.00	21,78	0,46	Tyr	TAT	470083.00	12,15	0,44
Asp	GAC	973377.00	25,16	0,54	Tyr	TAC	592163.00	15,30	0,56
Val	GTG	1091853.00	28,22	0,46	Leu	TTG	498920.00	12,89	0,13
Val	GTA	273515.00	7,07	0,12	Leu	TTA	294684.00	7,62	0,08
Val	GTT	426252.00	11,02	0,18	Phe	TTT	676381.00	17,48	0,46
Val	GTC	562086.00	14,53	0,24	Phe	TTC	789374.00	20,40	0,54
Ala	GCG	286975.00	7,42	0,11	Ser	TCG	171428.00	4,43	0,05
Ala	GCA	614754.00	15,89	0,23	Ser	TCA	471469.00	12,19	0,15
Ala	GCT	715079.00	18,48	0,27	Ser	TCT	585967.00	15,14	0,19
Ala	GCC	1079491.00	27,90	0,40	Ser	TCC	684663.00	17,70	0,22
Arg	AGG	461676.00	11,93	0,21	Arg	CGG	443753.00	11,47	0,20
Arg	AGA	466435.00	12,06	0,21	Arg	CGA	239573.00	6,19	0,11
Ser	AGT	469641.00	12,14	0,15	Arg	CGT	176691.00	4,57	0,08
Ser	AGC	753597.00	19,48	0,24	Arg	CGC	405748.00	10,49	0,18
Lys	AAG	1236148.00	31,95	0,57	Gln	CAG	1323614.00	34,21	0,74
Lys	AAA	940312.00	24,30	0,43	Gln	CAA	473648.00	12,24	0,26
Asn	AAT	653566.00	16,89	0,47	His	CAT	419726.00	10,85	0,42

Asn	AAC	739007.00	19,10	0,53	His	CAC	583620.00	15,08	0,58
Met	ATG	853648.00	22,06	1,00	Leu	CTG	1539118.0 0	39,78	0,40
Ile	ATA	288118.00	7,45	0,17	Leu	CTA	276799.00	7,15	0,07
Ile	ATT	615699.00	15,91	0,36	Leu	CTT	508151.00	13,13	0,13
Ile	ATC	808306.00	20,89	0,47	Leu	CTC	759527.00	19,63	0,20
Thr	ACG	234532.00	6,06	0,11	Pro	CCG	268884.00	6,95	0,11
Thr	ACA	580580.00	15,01	0,28	Pro	CCA	653281.00	16,88	0,28
Thr	ACT	506277.00	13,09	0,25	Pro	CCT	676401.00	17,48	0,29
Thr	ACC	732313.00	18,93	0,36	Pro	CCC	767793.00	19,84	0,32

[0093] Склонность генов с высокой экспрессией использовать частые кодоны называется «смещением кодонов». Ген рибосомного белка может использовать только от 20 до 25 наиболее часто встречающихся кодонов из 61 и иметь большое смещение кодонов (смещение кодонов близко к 1), в то время как низко экспрессируемый ген может использовать все 61 кодон и иметь небольшое смещение кодона или его отсутствие (смещение кодона близко к 0). Считается, что часто используемые кодоны - это кодоны, в которых экспрессируется большее количество родственной тРНК, и что использование этих кодонов позволяет трансляции происходить быстрее или точнее, или и то, и другое.

Смещение кодоновой пары

[0094] Кроме того, данный организм отдает предпочтение ближайшему кодону, соседствующему с данным кодоном А, что относится к смещению в использовании кодоновой пары. Изменение смещения кодоновой пары без изменения существующих кодонов может влиять на скорость синтеза белка и производства белка.

[0095] Смещение кодоновой пары можно проиллюстрировать, рассмотрев пару аминокислот Ala-Glu, которая может кодироваться 8 различными кодоновыми парами. Если никакие другие факторы, кроме частоты каждого отдельного кодона (как показано в таблице 2), не отвечают за частоту кодоновой пары, ожидаемая частота каждого из 8 кодирований может быть рассчитана путем умножения частот двух соответствующих кодонов. Например, по этому расчету ожидается, что кодоновая пара GCA-GAA будет встречаться с частотой 0,097 из всех кодирующих пар Ala-Glu ($0,23 \times 0,42$; на основе частот в таблице 2). Чтобы связать ожидаемую (гипотетическую) частоту каждой кодоновой пары с фактически наблюдаемой частотой в геноме человека, была использована база данных Consensus CDS (CCDS) последовательно аннотированных кодирующих областей человека, содержащая в общей сложности 14795 генов человека. Этот набор генов является наиболее полным представлением кодирующих последовательностей человека. Используя этот набор генов, частоты использования кодонов были пересчитаны путем деления количества вхождений кодона на количество всех синонимичных кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту. Как и ожидалось, частоты тесно коррелировали

с ранее опубликованными, такими как приведенные в таблице 2. Незначительные колебания частоты, возможно, связаны с эффектом избыточной выборки в данных, предоставленных базой данных использования кодонов в Исследовательском институте ДНК Казуса (www.kazusa.or.jp/codon/codon.html), где в расчеты были включены 84949 кодирующих последовательностей человека (намного больше, чем реальное число человеческих генов). Рассчитанные таким образом частоты кодонов затем использовались для расчета ожидаемых частот кодоновых пар путем сначала умножения частот двух соответствующих кодонов друг на друга (см. таблицу 3 ожидаемая частота), а затем умножения этого результата на наблюдаемую частоту (во всем наборе данных CCDS), с которым встречается пара аминокислот, кодируемая рассматриваемой кодоновой парой. В примере кодоновой пары GCA-GAA этот второй расчет дает ожидаемую частоту 0,098 (по сравнению с 0,097 в первом расчете с использованием набора данных Казуса). Наконец, фактическая частота кодоновой пары, наблюдаемая в наборе из 14795 генов человека, была определена путем подсчета общего числа случаев встречаемости каждой кодоновой пары в наборе и деления его на количество всех синонимичных кодирующих пар в наборе, кодирующем одну и ту же пару аминокислот (таблица 3; наблюдаемая частота). Частота и наблюдаемые/ожидаемые значения для полного набора из 3721 (61^2) кодоновых пар на основе набора из 14795 генов человека представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели кодоновых пар на примере пары аминокислот Ala-Glu

Пара аминокислот pair	Кодоновая пара	Ожидаемая частота	Наблюдаемая частота	Соотношение наблюдаемой частоты/ожидаемой частоты
AE	GCAGAA	0,098	0,163	1,65
AE	GCAGAG	0,132	0,198	1,51
AE	GCCGAA	0,171	0,031	0,18
AE	GCCGAG	0,229	0,142	0,62
AE	GCGGAA	0,046	0,027	0,57
AE	GCGGAG	0,062	0,089	1,44
AE	GCTGAA	0,112	0,145	1,29
AE	GCTGAG	0,150	0,206	1,37
Всего		1,000	1,000	

[0096] Если отношение наблюдаемой частоты к ожидаемой частоте кодоновой пары больше единицы, говорят, что кодоновая пара представлена чрезмерно. Если отношение меньше единицы, говорят, что она недостаточно представлено. В примере кодоновая пара GCA-GAA представлена в 1,65 раза больше, а кодирующая пара GCC-GAA представлена более чем в 5 раз меньше.

[0097] Многие другие кодоновые пары показывают очень сильное смещение; некоторые пары представлены недостаточно, в то время как другие пары представлены чрезмерно. Например, кодоновые пары GCCGAA (AlaGlu) и GATCTG (AspLeu) представлены в три-шесть раз меньше (предпочтительнее использовать пары GCAGAG и GACCTG соответственно), в то время как кодоновые пары GCCAAG (AlaLys) и AATGAA (AsnGlu) представлены примерно в два раза больше. Стоит отметить, что смещение кодоновой пары не имеет ничего общего ни с частотой пар аминокислот, ни с частотой отдельных кодонов. Например, представленная недостаточно пара GATCTG (AspLeu) использует наиболее часто встречающийся кодон Leu (CTG).

[0098] Как более подробно обсуждается ниже, смещение кодоновой пары учитывает показатель для каждой кодоновой пары в кодирующей последовательности, усредненный по всей длине кодирующей последовательности. В соответствии с изобретением смещение кодоновой пары определяется с помощью

$$CPB = \sum_{i=1}^k \frac{CPS_i}{K-1}$$

[0099] Соответственно, аналогичное смещение кодоновой пары для кодирующей последовательности может быть получено, например, за счет минимизации показателей кодоновой пары по подпоследовательности или умеренно уменьшенных показателей кодоновых пар по всей длине кодирующей последовательности.

Расчет смещения кодоновой пары

[00100] Каждая отдельная кодоновая пара из 3721 возможных кодоновых пар, не содержащих «STOP» (например, GTT-GCT), несет назначенный «показатель кодоновой пары» или «CPS», конкретный для данного «обучающего набора» генов. CPS данной кодоновой пары определяется как логарифмическое отношение наблюдаемого количества случаев встречаемости к количеству, которое можно было бы ожидать в этом наборе генов (в данном примере в геноме человека). Определение фактического количества случаев встречаемости конкретной кодоновой пары (или, другими словами, вероятности того, что конкретная пара аминокислот кодируется конкретной кодоновой парой) - это просто вопрос подсчета фактического количества случаев встречаемости кодоновой пары в конкретном наборе кодирующих последовательностей. Однако определение ожидаемого количества требует дополнительных вычислений. Ожидаемое число рассчитывается таким образом, чтобы оно не зависело как от частоты аминокислот, так и от смещения кодонов, аналогично Гутману и Хэтфилду. То есть ожидаемая частота рассчитывается на основе относительной доли количества раз, когда аминокислота кодируется конкретным кодоном. Положительное значение CPS означает, что данная кодоновая пара статистически чрезмерно представлена, а отрицательное значение CPS указывает на то, что пара статистически представлена недостаточно в геноме человека.

[00101] Для выполнения этих расчетов в контексте человека использовалась самая последняя база данных Consensus CDS (CCDS) последовательно аннотированных

кодирующих областей человека, содержащая в общей сложности 14795 генов. Этот набор данных предоставил кодон и кодоновую пару и, следовательно, частоты аминокислот и пар аминокислот в масштабе генома.

[00102] Парадигма Federov et al. (2002), была использована для дальнейшего усовершенствования подхода Гутмана и Хетфилда (1989). Это позволило рассчитать ожидаемую частоту данной кодоновой пары независимо от частоты кодонов и неслучайных ассоциаций соседних кодонов, кодирующих конкретную пару аминокислот. Подробные уравнения, используемые для расчета CPB, раскрыты в WO 2008/121992 и WO 2011/044561, которые включены в качестве ссылки.

$$S(P_{ij}) = \ln \left(\frac{N_o(P_{ij})}{N_e(P_{ij})} \right) = \ln \left(\frac{N_o(P_{ij})}{F(C_i)F(C_j)N_o(X_{ij})} \right)$$

[00103] В расчетах P_{ij} представляет собой кодоновую пару, встречающуюся с частотой $N_o(P_{ij})$ в ее синонимической группе. C_i и C_j - это два кодона, составляющие P_{ij} , встречающиеся с частотами $F(C_i)$ и $F(C_j)$ в их синонимичных группах соответственно. Точнее, $F(C_i)$ - это частота кодирования соответствующей аминокислоты X_i кодоном C_i во всех кодирующих областях, и $F(C_i) = N_o(C_i)/N_o(X_i)$, где $N_o(C_i)$ и $N_o(X_i)$ - наблюдаемое количество случаев встречаемости кодона C_i и аминокислоты X_i соответственно. Соответственно вычисляется $F(C_j)$. Кроме того, $N_o(X_{ij})$ представляет собой количество случаев встречаемости пары аминокислот X_{ij} во всех кодирующих областях. Показатель смещения кодоновой пары $S(P_{ij})$ для P_{ij} рассчитывали как логарифмическое отношение количества случаев встречаемости наблюдаемой частоты $N_o(P_{ij})$ к ожидаемой частоте $N_e(P_{ij})$.

[00104] Используя приведенную выше формулу, затем определяли, являются ли отдельные кодоновые пары в отдельных кодирующих последовательностях избыточными или недостаточными по сравнению с соответствующими геномными значениями $N_e(P_{ij})$, которые были рассчитаны с использованием всего набора данных CCDS человека. Этот расчет привел к положительным значениям показателя $S(P_{ij})$ для чрезмерно представленных и отрицательным значениям для недостаточно представленных кодоновых пар в областях кодирования человека.

[00105] «Комбинированное» смещение кодоновой пары отдельной кодирующей последовательности рассчитывали путем усреднения показателей всех кодоновых пар в соответствии со следующей формулой:

$$S(P_{ij}) = \sum_{l=1}^k \frac{S(P_{ij})l}{k-1}$$

[00106] Таким образом, смещение кодоновой пары для всей кодирующей области рассчитывается путем сложения всех показателей отдельных кодоновых пар, составляющих область, и деления этой суммы на длину кодирующей последовательности.

Расчет отклонения в частоте использования кодонов, реализация алгоритма для изменения отклонения в частоте использования кодонов.

[00107] Алгоритм был разработан для количественной оценки смещения кодоновой пары. Каждой возможной отдельной кодоновой паре был присвоен «показатель кодоновой пары» или «CPS». CPS определяется как натуральный логарифм отношения наблюдаемого к ожидаемому количеству случаев встречаемости каждой кодоновой пары во всех кодирующих областях человека, где люди представляют собой хозяина вируса вакцины, подлежащего перекодированию.

$$CPS = \ln \left(\frac{F(AB)_o}{\frac{F(A) \times F(B)}{F(X) \times F(Y)} \times F(XY)} \right)$$

[00108] Хотя расчет наблюдаемых случаев встречаемости конкретной кодоновой пары прост (фактическое количество в наборе генов), ожидаемое количество случаев встречаемости кодоновой пары требует дополнительных вычислений. Мы рассчитали, что это ожидаемое количество не зависит как от частоты аминокислот, так и от смещения кодонов, подобно Гутману и Хетфилду. То есть ожидаемая частота рассчитывается на основе относительной доли количества раз, когда аминокислота кодируется конкретным кодоном. Положительное значение CPS означает, что данная кодоновая пара статистически чрезмерно представлена, а отрицательное значение CPS указывает на то, что пара статистически представлена недостаточно в геноме человека.

[00109] Используя эти рассчитанные CPS, любую кодирующую область можно затем оценить как использующую чрезмерно или недостаточно представленные кодоновые пары, взяв среднее значение показателей кодоновых пар, таким образом обеспечивая смещение кодоновых пар (CPB) для всего гена.

$$CPB = \sum_{i=1}^k \frac{CPS_i}{k-1}$$

[00110] CPB был рассчитан для всех аннотированных генов человека с использованием показанных и нанесенных на график уравнений. Каждая точка на графике соответствует CPB одного человеческого гена. Пик распределения имеет положительное смещение кодоновой пары, равное 0,07, что является средним показателем для всех аннотированных генов человека. Кроме того, очень мало генов с отрицательным смещением кодоновой пары. Уравнения, установленные для определения и расчета CPB, затем использовались для управления этим смещением.

Алгоритм уменьшения отклонения в частоте использования кодонов.

[00111] Перекодирование последовательностей, кодирующих белок, может быть выполнено с помощью компьютера или без него, с использованием, например, градиентного спуска, или имитации отжига, или другой процедуры минимизации. Пример процедуры, которая перегруппирует кодоны, присутствующие в исходной последовательности, может быть представлен следующими этапами:

- 1) Получение последовательности вирусного генома дикого типа.
- 2) Выбор последовательностей, кодирующих белок, для ослабленной конструкции.

3) Блокировка известных или предполагаемых сегментов ДНК с некодирующими функциями.

4) Выбор желаемого распределения кодонов для оставшихся аминокислот в переработанных белках.

5) Выполнение случайного перемешивания по меньшей мере двух синонимичных разблокированных позиций кодона и расчет количества кодоновых пар.

6) Дальнейшее уменьшение (или увеличение) количества кодоновых пар, необязательно с использованием моделируемой процедуры отжига.

7) Проверка полученной конструкции на наличие чрезмерной вторичной структуры и нежелательного сайта рестрикции:

если да-> перейти к этапу (5) или исправить конструкцию, заменив проблемные области последовательностями дикого типа и перейти к этапу (8).

8) Синтез последовательности ДНК, соответствующей конструкции вируса.

9) Создание вирусной конструкции и оценка вирусного фенотипа:

если слишком ослаблена, получение конструкции субклона и переход к 9;

если ослабление недостаточное, переход к 2.

[00112] Ослабление вирусов путем уменьшения смещения кодоновой пара раскрыто в WO 2008/121992 и WO 2011/044561, которые включены в качестве ссылки, как если бы они были изложены полностью.

[00113] Способы получения полноразмерной последовательности генома SARS-CoV-2 или последовательностей с деоптимизированными кодоновыми парами, встроенных в последовательность генома SARS-CoV-2 дикого типа (или его мутантные формы последовательности дикого типа, которая вызывает COVID-19), могут включать: например, конструирование инфекционного клона кДНК с использованием вектора ВАС, с использованием стратегии ПЦР с удлинением перекрытия или стратегии слияния на основе длинной ПЦР.

Перекодированные полинуклеотиды

[00114] Различные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают полинуклеотид, кодирующий один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2: причем полинуклеотид перекодирован по сравнению с исходным полинуклеотидом коронавируса SARS-CoV-2, и при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, остается такой же. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемая полинуклеотидом, остается неизменной перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности вируса исходного SARS-CoV-2.

[00115] Различные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают полинуклеотид, кодирующий один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2: причем полинуклеотид перекодирован по сравнению с исходным полинуклеотидом коронавируса SARS-CoV-2, и при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, содержит до 20 аминокислотных замен, добавлений или делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемая полинуклеотидом, содержит до 20 аминокислотных замен, добавлений или делеций перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности вируса исходного SARS-CoV-2.

[00116] Различные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают полинуклеотид, кодирующий один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2: причем полинуклеотид перекодирован по сравнению с исходным полинуклеотидом коронавируса SARS-CoV-2, и при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, содержит до 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемая полинуклеотидом, содержит до 10 аминокислотных замен, добавлений или делеций перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности вируса исходного SARS-CoV-2.

[00117] Различные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают полинуклеотид, кодирующий один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2: причем полинуклеотид перекодирован по сравнению с исходным полинуклеотидом коронавируса SARS-CoV-2, и при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, содержит до 12 аминокислотных замен, добавлений или делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемая полинуклеотидом, содержит до 12 аминокислотных замен, добавлений или делеций перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности вируса исходного SARS-CoV-2.

[00118] В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность включает до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных замен, добавлений или делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность включает 1-5, 6-10, 11-15 или 16-20 аминокислотных замен, добавлений или делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная делеция, замена или добавление являются результатом делеции(й), замены (замен) или добавления(-й) нуклеиновой кислоты перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности исходного вируса SARS-CoV-2.

[00119] В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность содержит 12 аминокислотных делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность содержит 1-5, 6-10, 11-15 или 16-20 аминокислотных делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотные замены, добавления или делеции могут быть обусловлены одной или несколькими точечными мутациями в перекодированной последовательности. В различных вариантах осуществления аминокислотная делеция, замена или добавление являются результатом делеции(й), замены (замен) или добавления(-й) нуклеиновой кислоты перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности исходного вируса SARS-CoV-2.

[00120] Таким образом, в различных вариантах осуществления для этих перекодированных полинуклеотидов (с делецией(-ми), заменой(-ми) или добавлением(-ми) нуклеиновой кислоты или без них) перекодированный полинуклеотид может иметь различную длину полиА-хвоста; например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 или 54 последовательных аденина на 3'-конце; или, например, 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30, 31-36, 37-42, 43-48 или 49-54 последовательных аденина на 3'-конце; или, например, 9-37, 12-34, 15-33, 18-30 или 21-27 последовательных аденинов на 3'-конце; или, например, 19-25 последовательных аденинов на 3'-конце.

[00121] В различных вариантах осуществления полинуклеотид перекодирован путем уменьшения отклонения в частоте использования кодонов (СРВ) или уменьшения предпочтения кодонов по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

[00122] В различных вариантах осуществления полинуклеотид перекодирован путем увеличения количества динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

[00123] В различных вариантах осуществления каждый из одного или нескольких перекодированных вирусных белков или каждый из одного или нескольких его перекодированных фрагментов имеет отклонение в частоте использования кодонов менее -0,05, менее -0,1, менее -0,2, менее -0,3 или менее -0,4.

[00124] В определенных вариантах осуществления перекодированный вирусный

белок представляет собой RdRP и/или шиповидный белок, и каждый из перекодированных вирусных белков или их фрагментов имеет смещение кодоновой пары менее -0,05, или менее -0,06, или менее -0,07, или менее -0,08, или менее -0,09, или менее -0,1, или менее -0,11, или менее -0,12, или менее -0,13, или менее -0,14, или менее -0,15, или менее -0,16, или менее -0,17, или менее -0,18, или менее -0,19, или менее -0,2, или менее -0,25, или менее -0,3, или менее -0,35, или менее -0,4, или менее -0,45, или менее -0,5.

[00125] В определенных вариантах осуществления перекодированный вирусный белок представляет собой RdRP и/или шиповидный белок, и каждый из перекодированных вирусных белков или его фрагментов уменьшен по меньшей мере на 0,05, или по меньшей мере на 0,06, или по меньшей мере на 0,07, или по меньшей мере на 0,08, или по меньшей мере на 0,09, или по меньшей мере на 0,1, или по меньшей мере на 0,11, или по меньшей мере на 0,12, или по меньшей мере на 0,13, или по меньшей мере на 0,14, или по меньшей мере на 0,15, или по меньшей мере на 0,16, или по меньшей мере на 0,17, или по меньшей мере на 0,18, или по меньшей мере на 0,19, или по меньшей мере на 0,2, или по меньшей мере на 0,25, или по меньшей мере на 0,3, или по меньшей мере на 0,35, или по меньшей мере на 0,4, или по меньшей мере на 0,45, или по меньшей мере на 0,5 по сравнению с соответствующей последовательностью исходной последовательности. В определенных вариантах осуществления вычисление выполняется при сравнении соответствующей последовательности с исходной последовательностью; например, соответствующую последовательность вируса дикого типа.

[00126] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой коронавирус SARS-CoV-2 дикого типа. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой природный изолят коронавируса SARS-CoV-2.

[00127] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой изолят дикого типа коронавируса SARS-CoV-2 BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вашингтонский изолят коронавируса SARS-CoV-2 дикого типа (GenBank: MN985325.1), в данном документе в качестве ссылки, как если бы он был изложен во всей своей полноте.

[00128] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой мутантную форму последовательности коронавируса дикого типа SARS-CoV-2.

[00129] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вариант SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления вариант SARS-CoV-2 представляет собой британский вариант, южноафриканский вариант или бразильский вариант.

[00130] Примеры британского варианта включают, но не ограничиваются ими, номера доступа GenBank MW462650 (SARS-CoV-2/human/USA/MN-MDH-2252/2020),

MW463056 (SARS-CoV-2/human/USA/FL-BPHL-2270/2020) и MW440433 (SARS-CoV-2/human/USA/NY-Wadsworth-291673-01/2020), все по состоянию на 19 января 2021 г., все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей их полноте. Дополнительные примеры британского варианта включают, но не ограничиваются ими, GISAID ID №№ EPI_ISL_778842 (hCoV-19/USA/TX-CDC-9KXP-8438/2020; 2020-12-28), EPI_ISL_802609 (hCoV-19/USA/CA-CDC-STM-050/2020; 2020-12-28), EPI_ISL_802647 (hCoV-19/USA/FL-CDC-STM-043/2020; 2020-12-26), EPI_ISL_832014 (hCoV-19/USA/UT-UPHL-2101178518/2020; 2020-12-31), EPI_ISL_850618 (hCoV-19/USA/IN-CDC-STM-183/2020; 2020-12-31) и EPI_ISL_850960 (hCoV-19/USA/FL-CDC-STM-A100002/2021; 2021-01-04), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00131] Примеры южноафриканского варианта включают, но не ограничиваются ними, GISAID ID №№ EPI_ISL_766709 (hCoV-19/Sweden/20-13194/2020; 2020-12-24), EPI_ISL_768828 (hCoV-19/France/PAC-NRC2933/2020; 2020-12-22), EPI_ISL_770441 (hCoV-19/England/205280030/2020; 2020-12-24) и EPI_ISL_819798 (hCoV-19/England/OXON-F440A7/2020; 2020-12-18), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00132] Примеры бразильского варианта включают, но не ограничиваются ними: GISAID ID №№ EPI_ISL_677212 (hCoV-19/USA/VA-DCLS-2187/2020; 2020-11-12), EPI_ISL_723494 (hCoV-19/USA/VA-DCLS-2191/2020; 2020-11-12), EPI_ISL_845768 (hCoV-19/USA/GA-ENC-458R/2021; 2021-01-05), EPI_ISL_848196 (hCoV-19/Canada/LTRI-1192/2020; 2020-12-24) и EPI_ISL_848197 (hCoV-19/Canada/LTRI-1258/2020; 2020-12-24), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00133] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой предварительно модифицированную вирусную нуклеиновую кислоту или ранее ослабленную вирусную нуклеиновую кислоту.

[00134] В различных вариантах осуществления полинуклеотид деоптимизирован по СРВ по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления полинуклеотид деоптимизирован по кодонам по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

[00135] В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ у людей. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления деоптимизированный

по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2 дикого типа.

[00136] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит перекодированную нуклеотидную последовательность, выбранную из РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP), фрагмента RdRP, шиповидного белка, фрагмента шиповидного белка и их комбинаций. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит делецию нуклеотидов, которая приводит к делеции аминокислот в шиповидном белке, что устраняет сайт расщепления фурином. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что устранение сайта расщепления фурином будет одним из факторов безопасности композиции в виде вакцины и/или иммунной композиции.

[00137] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере одну деоптимизированную область СРВ, которая выбрана из п.о. 11294-12709, п.о. 14641-15903, п.о. 21656-22306, п.о. 22505-23905 и п.о. 24110-25381 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

[00138] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO:3 (Wuhan-CoV_101K). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 (например, без хвоста полиА). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 или 54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30, 31-36, 37-42, 43-48 или 49-54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 9-37, 12-34, 15-33, 18-30 или 21-27 последовательных аденинов на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 19-25 последовательных аденинов на 3'-конце.

[00139] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO:4. SEQ ID NO:4 представляет собой деоптимизированную последовательность по сравнению с последовательностью WA-1 дикого типа (GenBank: MN985325.1 включен в данный документ посредством ссылки, как если бы он был полностью изложен) (например, CDX-005). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 (например, без хвоста полиА). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 или 54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30, 31-36, 37-42, 43-48 или 49-54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных

вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 9-37, 12-34, 15-33, 18-30 или 21-27 последовательных аденинов на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 19-25 последовательных аденинов на 3'-конце.

[00140] В различных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует SEQ ID NO:6 (перекодированный шиповидный белок).

Векторы, клетки, полипептиды

[00141] Различные варианты осуществления обеспечивают бактериальную искусственную хромосому (BAC), содержащую полинуклеотид по настоящему изобретению. Полинуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой перекодированные полипептиды, как обсуждается в данном документе.

[00142] В различных вариантах осуществления предложен вектор, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению. Полинуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой перекодированные полипептиды, как обсуждается в данном документе.

[00143] Клетка, содержащая вектор по настоящему изобретению. Векторы являются такими, как описано в данном документе.

[00144] В различных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку Vero, клетку HeLa, клетку почки детеныша хомячка (ВНК), клетку MA104, клетку 293T, клетку BSR-T7, клетку MRC-5, клетку CHO или клетку PER.C6. В конкретных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку Vero или клетку почки детеныша хомячка (ВНК).

[00145] Различные варианты осуществления относятся к полипептиду, кодируемому полинуклеотидом по настоящему изобретению. Полинуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой перекодированные полипептиды, как обсуждается в данном документе. Полипептид обладает свойствами, отличными от свойств полипептида, кодируемого вирусом SARS-CoV-2 дикого типа, или полипептида, кодируемого вариантом SARS-CoV-2. Например, полипептид, кодируемый перекодированными полинуклеотидами и деоптимизированными полинуклеотидами, как обсуждается в данном документе, может оказывать ослабляющее действие на вирус.

Модифицированные вирусы

[00146] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный коронавирус SARS-CoV-2, содержащий полипептид, кодируемый полинуклеотидом по настоящему изобретению. Полинуклеотиды по настоящему изобретению представляют собой перекодированные полипептиды, как обсуждается в данном документе.

[00147] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный коронавирус SARS-CoV-2, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению. Полинуклеотиды по настоящему

изобретению представляют собой любой из обсуждаемых в данном документе перекодированных полипептидов.

[00148] В различных вариантах осуществления экспрессия одного или нескольких его вирусных белков снижена по сравнению с исходным коронавирусом SARS-CoV-2.

[00149] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой коронавирус SARS-CoV-2 дикого типа. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой природный изолят коронавируса SARS-CoV-2.

[00150] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой изолят дикого типа коронавируса SARS-CoV-2 BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вашингтонский изолят коронавируса SARS-CoV-2 дикого типа (GenBank: MN985325.1), в данном документе в качестве ссылки, как если бы он был изложен во всей своей полноте.

[00151] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой мутантную форму последовательности коронавируса дикого типа SARS-CoV-2.

[00152] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вариант SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления вариант SARS-CoV-2 представляет собой британский вариант, южноафриканский вариант или бразильский вариант.

[00153] Примеры британского варианта включают, но не ограничиваются ними, номера доступа GenBank MW462650 (SARS-CoV-2/human/USA/MN-MDH-2252/2020), MW463056 (SARS-CoV-2/human/USA/FL-BPHL-2270/2020) и MW440433 (SARS-CoV-2/human/USA/NY-Wadsworth-291673-01/2020), все по состоянию на 19 января 2021 г., все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей их полноте. Дополнительные примеры британского варианта включают, но не ограничиваются ими, GISAID ID №№ EPI_ISL_778842 (hCoV-19/USA/TX-CDC-9KXP-8438/2020; 2020-12-28), EPI_ISL_802609 (hCoV-19/USA/CA-CDC-STM-050/2020; 2020-12-28), EPI_ISL_802647 (hCoV-19/USA/FL-CDC-STM-043/2020; 2020-12-26), EPI_ISL_832014 (hCoV-19/USA/UT-UPHL-2101178518/2020; 2020-12-31), EPI_ISL_850618 (hCoV-19/USA/IN-CDC-STM-183/2020; 2020-12-31) и EPI_ISL_850960 (hCoV-19/USA/FL-CDC-STM-A100002/2021; 2021-01-04), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00154] Примеры южноафриканского варианта включают, но не ограничиваются ними, GISAID ID №№ EPI_ISL_766709 (hCoV-19/Sweden/20-13194/2020; 2020-12-24), EPI_ISL_768828 (hCoV-19/France/PAC-NRC2933/2020; 2020-12-22), EPI_ISL_770441 (hCoV-19/England/205280030/2020; 2020-12-24) и EPI_ISL_819798 (hCoV-19/England/OXON-F440A7/2020; 2020-12-18), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все

они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00155] Примеры бразильского варианта включают, но не ограничиваются ними: GISAID ID №№ EPI_ISL_677212 (hCoV-19/USA/VA-DCLS-2187/2020; 2020-11-12), EPI_ISL_723494 (hCoV-19/USA/VA-DCLS-2191/2020; 2020-11-12), EPI_ISL_845768 (hCoV-19/USA/GA-ENC-458R/2021; 2021-01-05), EPI_ISL_848196 (hCoV-19/Canada/LTRI-1192/2020; 2020-12-24) и EPI_ISL_848197 (hCoV-19/Canada/LTRI-1258/2020; 2020-12-24), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00156] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой предварительно модифицированную вирусную нуклеиновую кислоту или ранее ослабленную вирусную нуклеиновую кислоту.

[00157] В различных вариантах осуществления снижение экспрессии одного или нескольких его вирусных белков уменьшено в результате перекодирования области, выбранной из белка RdRP, шиповидного белка и их комбинаций.

[00158] В различных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2: причем полинуклеотид перекодирован по сравнению с исходным полинуклеотидом коронавируса SARS-CoV-2, и при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, остается такой же.

[00159] В различных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2: причем полинуклеотид перекодирован по сравнению с исходным полинуклеотидом коронавируса SARS-CoV-2, и при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемых полинуклеотидом, содержит до 15 аминокислотных замен, добавлений или делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность включает до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, добавлений или делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность содержит 12 аминокислотных делеций. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность содержит 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 или 13-15 аминокислотных делеций. Аминокислотные замены, добавления или делеции могут быть обусловлены одной или несколькими точечными мутациями в перекодированной последовательности. В различных вариантах осуществления аминокислотная делеция, замена или добавление являются результатом делеции(й), замены (замен) или добавления(-й) нуклеиновой кислоты перед полиА-хвостом последовательности нуклеиновой кислоты последовательности исходного вируса SARS-CoV-2.

[00160] В различных вариантах осуществления полинуклеотид перекодирован путем уменьшения отклонения в частоте использования кодонов (СРВ) или уменьшения предпочтения кодонов по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

[00161] В различных вариантах осуществления полинуклеотид перекодирован путем увеличения количества динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

[00162] В различных вариантах осуществления каждый из одного или нескольких перекодированных вирусных белков или каждый из одного или нескольких его перекодированных фрагментов имеет отклонение в частоте использования кодонов менее -0,05, менее -0,1, менее -0,2, менее -0,3 или менее -0,4.

[00163] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой коронавирус SARS-CoV-2 дикого типа. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой природный изолят коронавируса SARS-CoV-2.

[00164] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой изолят дикого типа коронавируса SARS-CoV-2 BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вашингтонский изолят коронавируса SARS-CoV-2 дикого типа (GenBank: MN985325.1), в данном документе в качестве ссылки, как если бы он был изложен во всей своей полноте.

[00165] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой мутантную форму последовательности коронавируса дикого типа SARS-CoV-2.

[00166] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вариант SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления вариант SARS-CoV-2 представляет собой британский вариант, южноафриканский вариант или бразильский вариант.

[00167] Примеры британского варианта включают, но не ограничиваются ими, номера доступа GenBank MW462650 (SARS-CoV-2/human/USA/MN-MDH-2252/2020), MW463056 (SARS-CoV-2/human/USA/FL-BPHL-2270/2020) и MW440433 (SARS-CoV-2/human/USA/NY-Wadsworth-291673-01/2020), все по состоянию на 19 января 2021 г., все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей их полноте. Дополнительные примеры британского варианта включают, но не ограничиваются ими, GISAID ID №№ EPI_ISL_778842 (hCoV-19/USA/TX-CDC-9KXP-8438/2020; 2020-12-28), EPI_ISL_802609 (hCoV-19/USA/CA-CDC-STM-050/2020; 2020-12-28), EPI_ISL_802647 (hCoV-19/USA/FL-CDC-STM-043/2020; 2020-12-26), EPI_ISL_832014 (hCoV-19/USA/UT-UPHL-2101178518/2020; 2020-12-31), EPI_ISL_850618 (hCoV-19/USA/IN-CDC-STM-183/2020; 2020-12-31) и EPI_ISL_850960 (hCoV-19/USA/FL-CDC-STM-A100002/2021; 2021-01-04), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они

включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00168] Примеры южноафриканского варианта включают, но не ограничиваются ними, GISAID ID №№ EPI_ISL_766709 (hCoV-19/Sweden/20-13194/2020; 2020-12-24), EPI_ISL_768828 (hCoV-19/France/PAC-NRC2933/2020; 2020-12-22), EPI_ISL_770441 (hCoV-19/England/205280030/2020; 2020-12-24) и EPI_ISL_819798 (hCoV-19/England/OXON-F440A7/2020; 2020-12-18), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00169] Примеры бразильского варианта включают, но не ограничиваются ними: GISAID ID №№ EPI_ISL_677212 (hCoV-19/USA/VA-DCLS-2187/2020; 2020-11-12), EPI_ISL_723494 (hCoV-19/USA/VA-DCLS-2191/2020; 2020-11-12), EPI_ISL_845768 (hCoV-19/USA/GA-ENC-458R/2021; 2021-01-05), EPI_ISL_848196 (hCoV-19/Canada/LTRI-1192/2020; 2020-12-24) и EPI_ISL_848197 (hCoV-19/Canada/LTRI-1258/2020; 2020-12-24), все по состоянию на 20 января 2021 г., и все они включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены во всей своей полноте.

[00170] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой предварительно модифицированную вирусную нуклеиновую кислоту или ранее ослабленную вирусную нуклеиновую кислоту.

[00171] В различных вариантах осуществления полинуклеотид деоптимизирован по СРВ по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления полинуклеотид деоптимизирован по кодонам по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

[00172] В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ у людей. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2 дикого типа.

[00173] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит перекодированную нуклеотидную последовательность, выбранную из РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP), фрагмента RdRP, шиповидного белка, фрагмента шиповидного белка и их комбинаций. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит делецию нуклеотидов, которая приводит к делеции аминокислот в шиповидном белке, что устраняет сайт расщепления фурином. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что устранение сайта расщепления фурином будет

одним из факторов безопасности композиции в виде вакцины и/или иммунной композиции.

[00174] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит по меньшей мере одну деоптимизированную область СРВ, которая выбрана из п.о. 11294-12709, п.о. 14641-15903, п.о. 21656-22306, п.о. 22505-23905 и п.о. 24110-25381 SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

[00175] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO:3 (Wuhan-CoV_101K). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 (например, без хвоста полиА). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 или 54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30, 31-36, 37-42, 43-48 или 49-54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 9-37, 12-34, 15-33, 18-30 или 21-27 последовательных аденинов на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29877 SEQ ID NO:3 и 19-25 последовательных аденинов на 3'-конце.

[00176] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO:4. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 (например, без хвоста полиА). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 или 54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30, 31-36, 37-42, 43-48 или 49-54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 9-37, 12-34, 15-33, 18-30 или 21-27 последовательных аденинов на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и 19-25 последовательных аденинов на 3'-конце.

[00177] В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO:7. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:7 (например, без хвоста полиА). В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:7 и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 или 54 последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:7 и 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30, 31-36, 37-42, 43-48 или 49-54

последовательных аденина на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:7 и 9-37, 12-34, 15-33, 18-30 или 21-27 последовательных аденинов на 3'-конце. В различных вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:7 и 19-25 последовательных аденинов на 3'-конце.

[00178] В различных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует SEQ ID NO:6 (перекодированный шиповидный белок).

Иммунные композиции и/или композиции в виде вакцины

[00179] Различные варианты осуществления обеспечивают иммунную композицию для индукции защитного иммунного ответа у субъекта, содержащую: модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2, обсуждаемых в данном документе. В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению представляет собой живой ослабленный вирус. В некоторых вариантах осуществления иммунная композиция дополнительно содержит приемлемое вспомогательное вещество или носитель, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунная композиция дополнительно содержит стабилизатор, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунная композиция дополнительно содержит адъювант, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунная композиция дополнительно содержит сахарозу, глицин или и то, и другое. В различных вариантах осуществления иммунная композиция дополнительно содержит приблизительно сахарозу (5%) и приблизительно глицин (5%). В различных вариантах осуществления приемлемый носитель или вспомогательное вещество выбраны из группы, состоящей из сахара, аминокислоты, поверхностно-активного вещества и их комбинаций. В различных вариантах осуществления аминокислота присутствует в концентрации около 5% масс./об. Неограничивающие примеры подходящих аминокислот включают аргинин и гистидин. Неограничивающие примеры подходящих носителей включают желатин и человеческий сывороточный альбумин. Неограничивающие примеры подходящих поверхностно-активных веществ включают неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 80 в очень низкой концентрации 0,01-0,05%.

[00180] В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозах около 10^3 - 10^7 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозах около 10^4 - 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в

дозе около 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 10^7 БОЕ.

[00181] В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^7 БОЕ.

[00182] Различные варианты осуществления обеспечивают композицию вакцины для индукции иммунного ответа у субъекта, содержащую: модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2, обсуждаемых в данном документе. В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению представляет собой живой ослабленный вирус. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит приемлемый носитель или вспомогательное вещество, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунная композиция дополнительно содержит стабилизатор, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит адъювант, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит сахарозу, глицин или и то, и другое. В различных вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит сахарозу (5%) и глицин (5%). В различных вариантах осуществления приемлемый носитель или вспомогательное вещество выбраны из группы, состоящей из сахара, аминокислоты, поверхностно-активного вещества и их комбинаций. В различных вариантах осуществления аминокислота присутствует в концентрации около 5% масс./об. Неограничивающие примеры подходящих аминокислот включают аргинин и гистидин. Неограничивающие примеры подходящих носителей включают желатин и человеческий сывороточный альбумин. Неограничивающие примеры подходящих поверхностно-активных веществ включают неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 80 в очень низкой концентрации 0,01-0,05%.

[00183] В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозах около 10^3 - 10^7 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозах около 10^4 - 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в

дозе около 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^7 БОЕ.

[00184] В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^7 БОЕ.

[00185] Различные варианты осуществления обеспечивают композицию вакцины для индукции защитного иммунного ответа у субъекта, содержащую: модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2, обсуждаемых в данном документе. В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению представляет собой живой ослабленный вирус. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит приемлемый носитель или вспомогательное вещество, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит адъювант, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит сахарозу, глицин или и то, и другое. В различных вариантах осуществления композиция вакцины дополнительно содержит сахарозу (5%) и глицин (5%). В различных вариантах осуществления приемлемый носитель или вспомогательное вещество выбраны из группы, состоящей из сахара, аминокислоты, поверхностно-активного вещества и их комбинаций. В различных вариантах осуществления аминокислота присутствует в концентрации около 5% масс./об. Неограничивающие примеры подходящих аминокислот включают аргинин и гистидин. Неограничивающие примеры подходящих носителей включают желатин и человеческий сывороточный альбумин. Неограничивающие примеры подходящих поверхностно-активных веществ включают неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 80 в очень низкой концентрации 0,01-0,05%.

[00186] В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозах около 10^3 - 10^7 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозах около 10^4 - 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления композиция вакцины предусмотрена в дозе около 10^7 БОЕ.

[00187] В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления иммунная композиция предусмотрена в дозе около 5×10^7 БОЕ.

[00188] Следует понимать, что ослабленный вирус по изобретению, используемый для вызова иммунного ответа у субъекта (или защитного иммунного ответа) или для предотвращения или снижения вероятности заболевания субъекта вирус-ассоциированным заболеванием, может быть введен субъекту в виде композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, один или несколько из 0,01-0,1 М и предпочтительно 0,05 М фосфатного буфера, фосфатно-солевого буфера (PBS), DMEM, L-15, 10-25% раствора сахарозы в PBS, 10-25% раствора сахарозы в DMEM или 0,9% солевого раствора. Такие носители также включают водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, солевой раствор и буферные среды. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера и нелетучие масла. Внутривенные носители включают наполнители жидкости и питательных веществ, наполнители электролитов, такие как средства на основе декстрозы Рингера, и т.п. Твердые композиции могут содержать нетоксичные твердые носители, такие как, например, глюкоза, сахароза, маннит, сорбит, лактоза, крахмал, стеарат магния, целлюлоза или производные целлюлозы, карбонат натрия, желатин, рекомбинантный сывороточный альбумин человека, сывороточный альбумин человека и/или карбонат магния. Для введения в аэрозоле, например, для легочной и/или интраназальной доставки, агент или композиция предпочтительно составлены с нетоксичным поверхностно-активным веществом, например, сложными эфирами или неполными эфирами жирных кислот от C6 до C22 или природными глицеридами, и пропеллентом. Дополнительные носители, такие как лецитин, могут быть включены для облегчения интраназальной доставки. Фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества могут дополнительно содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные препараты, антиоксиданты и хелатирующие агенты, которые увеличивают срок хранения и/или эффективность активных ингредиентов. Настоящие композиции, как хорошо известно в данной области техники, могут быть

составлены таким образом, чтобы обеспечить быстрое, пролонгированное или отсроченное высвобождение активного ингредиента после введения субъекту.

[00189] В различных вариантах осуществления композиция вакцины или иммунная композиция составлена для доставки внутривенно или подоболочечно, подкожно, внутримышечно, внутрикожно или интраназально. В различных вариантах осуществления композиция вакцины или иммунная композиция составлена для интраназальной доставки. В различных вариантах осуществления композиция вакцины или иммунная композиция составлена для доставки в виде назальных капель или спрея для носа.

Способы применения композиций по настоящему изобретению.

[00190] Различные варианты осуществления обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту дозы иммунной композиции по настоящему изобретению. Иммунная композиция представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе иммунных композиций. В различных вариантах осуществления доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

[00191] В различных вариантах осуществления иммунную композицию вводят внутривенно или подоболочечно, подкожно, внутримышечно, внутрикожно или интраназально. В различных вариантах осуществления иммунную композицию вводят интраназально. В различных вариантах осуществления иммунную композицию вводят в виде назальных капель или назального спрея.

[00192] Различные варианты осуществления обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту дозы композиции вакцины по настоящему изобретению. Композиция вакцины представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе композиций вакцины. В различных вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ. В различных вариантах осуществления доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

[00193] В различных вариантах осуществления композицию вакцины вводят внутривенно или подоболочечно, подкожно, внутримышечно, внутрикожно или интраназально. В различных вариантах осуществления композицию вакцины вводят интраназально. В различных вариантах осуществления композицию вакцины вводят в виде назальных капель или назального спрея.

[00194] Различные варианты осуществления обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту дозы модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2, обсуждаемых в данном документе. В различных вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ. В различных вариантах осуществления доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

[00195] В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^3 - 10^7 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^4 - 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^7 БОЕ.

[00196] В различных вариантах осуществления доза составляет около 5×10^3 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 5×10^4 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 5×10^5 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 5×10^6 БОЕ. В различных вариантах осуществления доза составляет около 5×10^7 БОЕ.

[00197] В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 вводят внутривенно или подоболочечно, подкожно, внутримышечно, внутрикожно или интраназально. В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 вводят интраназально. В различных вариантах осуществления модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 вводят в виде назальных капель или назального спрея.

[00198] Различные варианты осуществления обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту примирующей дозы модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению; и введение субъекту одной или нескольких бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2, обсуждаемых в данном документе. В различных вариантах осуществления доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

[00199] В различных вариантах осуществления примирующую дозу и/или одну или несколько бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 вводят внутривенно или подоболочечно, подкожно, внутримышечно, внутрикожно или интраназально. В различных вариантах осуществления примирующая доза и/или одна или несколько бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 вводятся интраназально. В различных вариантах осуществления примирующую дозу и/или одну или несколько бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 вводят с помощью назальных капель или назального спрея.

[00200] Различные варианты осуществления обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту примирующей дозы иммунной композиции по настоящему изобретению; и введение субъекту одной или нескольких бустерных доз иммунной композиции по настоящему изобретению. Иммунная композиция представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе иммунных

композиций. В различных вариантах осуществления доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

[00201] В различных вариантах осуществления примирующую дозу и/или одну или несколько бустерных доз иммунной композиции вводят внутривенно или подоболочечно, подкожно, внутримышечно, внутрикожно или интраназально. В различных вариантах осуществления примирующая доза и/или одна или несколько бустерных доз иммунной композиции вводятся интраназально. В различных вариантах осуществления примирующую дозу и/или одну или несколько бустерных доз иммунной композиции вводят с помощью назальных капель или назального спрея.

[00202] Различные варианты осуществления обеспечивают способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий: введение субъекту примирующей дозы композиции вакцины по настоящему изобретению; и введение субъекту одной или нескольких бустерных доз композиции в виде вакцины по настоящему изобретению. Композиция вакцины представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе композиций вакцины. В различных вариантах осуществления доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

[00203] В различных вариантах осуществления примирующую дозу и/или одну или несколько бустерных доз композиции вакцины вводят внутривенно или подоболочечно, подкожно, внутримышечно, внутрикожно или интраназально. В различных вариантах осуществления примирующая доза и/или одна или несколько бустерных доз композиции вакцины вводятся интраназально. В различных вариантах осуществления примирующую дозу и/или одну или несколько бустерных доз композиции вакцины вводят с помощью назальных капель или назального спрея.

[00204] Время между первичной и стимулирующей дозами может варьироваться, например, в зависимости от стадии инфекции или заболевания (например, неинфицированный, инфицированный, количество дней после инфицирования) и состояния здоровья пациента. В различных вариантах осуществления одну или несколько бустерных доз вводят через около 2 недели после примирующей дозы. То есть вводят примирующую дозу и примерно через две недели после этого вводят бустерную дозу. В различных вариантах осуществления одну или несколько бустерных доз вводят через около 4 недели после примирующей дозы. В различных вариантах осуществления одну или несколько бустерных доз вводят через около 6 недели после примирующей дозы. В различных вариантах осуществления одну или несколько бустерных доз вводят через около 8 недели после примирующей дозы. В различных вариантах осуществления одну или несколько бустерных доз вводят через около 12 недели после примирующей дозы. В различных вариантах осуществления одну или несколько бустерных доз вводят через около 1-12 недель после примирующей дозы.

[00205] В различных вариантах осуществления одну или более стимулирующих доз можно вводить в виде одной стимулирующей дозы. В других вариантах осуществления одну или несколько стимулирующих доз можно периодически вводить в

виде стимулирующей дозы. Например, ее можно давать ежеквартально, каждые 4 месяца, каждые 6 месяцев, ежегодно, каждые 2 года, каждые 3 года, каждые 4 года, каждые 5 лет, каждые 6 лет, каждые 7 лет, каждые 8 лет, каждые 9 лет или каждые 10 лет.

[00206] В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 10^3 - 10^7 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 10^4 - 10^6 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 10^3 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 10^4 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 10^5 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 10^6 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления доза составляет около 10^7 БОЕ.

[00207] В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 5×10^3 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 5×10^4 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 5×10^5 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 5×10^6 БОЕ каждая. В различных вариантах осуществления примирующая доза и стимулирующая доза составляют приблизительно 5×10^7 БОЕ каждая.

[00208] В различных вариантах осуществления доза для примирующей дозы и бустерной дозы одинакова.

[00209] В различных вариантах осуществления количество дозы может варьироваться между основной и стимулирующей дозами. В качестве неограничивающего примера примирующая доза может содержать меньше копий вируса по сравнению с бустерной дозой. Например, примирующая доза составляет около 10^3 БОЕ, а стимулирующая доза составляет около 10^4 - 10^6 БОЕ, или примирующая доза составляет около 10^4 , а бустерная доза составляет около 10^5 - 10^7 БОЕ.

[00210] В различных вариантах осуществления, когда стимулирующая доза вводится периодически, последующие стимулирующие дозы могут быть меньше, чем первая стимулирующая доза.

[00211] В качестве неограничивающего примера примирующая доза может содержать больше копий вируса по сравнению с бустерной дозой.

[00212] В различных вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

[00213] В различных вариантах осуществления доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

[00214] В различных вариантах осуществления интраназальное введение модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, иммунной композиции по настоящему изобретению или композиции вакцины по настоящему изобретению включает: указание субъекту высморкаться и запрокинуть голову назад; необязательно, указание субъекту изменить положение головы, чтобы композиция не капала за пределы носа или в горло; введение около 0,25 мл, содержащих дозировку, в каждую ноздрю; указание субъекту осторожно вдохнуть носом; и указание субъекту не сморкаться в течение определенного периода времени; например, около 60 минут.

[00215] В некоторых вариантах осуществления субъект не принимает никаких иммуносупрессивных препаратов. В различных вариантах осуществления субъект не принимает никаких иммунодепрессантов примерно за 180 дней, 150 дней, 120 дней, 90 дней, 75 дней, 60 дней, 45 дней, 30 дней, 15 дней или 7 дней до введения модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, иммунной композиции по настоящему изобретению или композиции вакцины по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления субъект не принимает никаких иммуносупрессивных препаратов в течение приблизительно 1 дня, 7 дней, 14 дней, 30 дней, 45 дней, 60 дней, 75 дней, 90 дней, 120 дней, 150 дней, 180 дней, 9 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 21 месяца или 24 месяцев после введения модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, иммунной композиции по настоящему изобретению или композиции вакцины по настоящему изобретению.

[00216] Иммунодепрессанты (включая, помимо прочего, следующие: кортикостероиды (например, преднизолон (Deltasone, Orasone), будесонид (Entocort EC), преднизолон (Millipred)), ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин (Neoral, Sandimmune, SangCyа), такролимус (Astagraf XL, Envarsus XR, Prograf), механическая мишень ингибиторов рапамицина (mTOR) (например, сиролимус (Rapamune), эверолимус (Afinitor, Zortress)), ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы (IMDH) (например, азатиоприн (Azasan, Imuran), лефлуномид (Arava), микофенолят (CellCept, Myfortic)), биологические препараты (например, абатацепт (Orencia), адалимумаб (Humira), анакинра (Kineret), цертолизумаб (Cimzia), этанерцепт (Enbrel), голимумаб (Simponi), инфликсимаб (Remicade), иксекизумаб (Taltz), натализумаб (Tysabri), ритуксимаб (Rituxan), секукинумаб (Cosentyx), тоцилизумаб (Actemra), устекинумаб (Stelara), ведолизумаб (Entyvio)), моноклональные антитела (например, базиликсимаб (Simulect), даклизумаб (Zinbryta), муромонаб (Orthoclone OKT3)).

Медицинское использование

[00217] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композицию вакцины по настоящему изобретению или иммунную композицию по настоящему изобретению для применения для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19.

[00218] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композицию вакцины по настоящему изобретению или иммунную композицию по настоящему изобретению для применения для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19, при этом применение включает примирующую дозу модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию в виде вакцины по настоящему изобретению, или иммунную композицию по настоящему изобретению и одну или несколько бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию вакцины по настоящему изобретению, или иммунной композиции по настоящему изобретению.

[00219] Различные варианты осуществления настоящего изобретения включают применение модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композиции вакцины по настоящему изобретению, или иммунной композиции по настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19.

[00220] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают применение модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, композиции вакцины по настоящему изобретению или иммунной композиции по настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для вызова иммунного ответа или для лечения или профилактики COVID-19, при этом производство включает примирующую дозу модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию вакцины по настоящему изобретению, или иммунную композицию по настоящему изобретению и одну или несколько бустерных доз модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, или композицию в виде вакцины по настоящему изобретению, или иммунной композиции по настоящему изобретению.

[00221] Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по настоящему изобретению представляет собой любой из модифицированных коронавирусов SARS-CoV-2, обсуждаемых в данном документе. Композиция вакцины по настоящему изобретению представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе композиций в виде вакцины. Иммунная композиция по настоящему изобретению представляет собой любую из обсуждаемых в данном документе иммунных композиций.

[00222] В различных вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

Способы получения

[00223] Различные варианты осуществления обеспечивают способ получения модифицированного коронавируса SARS-CoV-2, включающий: получение нуклеотидной последовательности, кодирующей один или несколько белков исходного коронавируса SARS-CoV-2 или один или несколько его фрагментов; перекодирование нуклеотидной

последовательности для уменьшения экспрессии одного или нескольких белков или одного или нескольких их фрагментов; и замену нуклеиновой кислоты, имеющей перекодированную нуклеотидную последовательность, в геноме исходного коронавируса SARS-CoV-2 с получением модифицированного генома коронавируса SARS-CoV-2, при этом экспрессия перекодированной нуклеотидной последовательности снижена по сравнению с исходным вирусом.

[00224] В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вирусную нуклеиновую кислоту дикого типа (wt). В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой природный изолят вирусной нуклеиновой кислоты. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой предварительно модифицированную вирусную нуклеиновую кислоту или ранее ослабленную вирусную нуклеиновую кислоту. В различных вариантах осуществления исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вариант SARS-CoV-2.

[00225] В другом варианте осуществления создание модифицированного генома коронавируса SARS-CoV-2 включает использование клонирующего хозяина.

[00226] В другом варианте осуществления создание модифицированного генома коронавируса SARS-CoV-2 включает конструирование инфекционного клона кДНК с использованием вектора ВАС, с использованием стратегии ПЦР с удлинением с перекрытием или стратегии слияния на основе длинной ПЦР.

[00227] В другом варианте осуществления модифицированный геном коронавируса SARS-CoV-2 дополнительно содержит одну или несколько мутаций, включая делецию, замены и добавления. Один или несколько могут быть 1-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 или 91-100 мутаций.

[00228] В различных вариантах осуществления перекодирование нуклеотидной последовательности для снижения экспрессии одного или нескольких белков или одного или нескольких их фрагментов осуществляется путем уменьшения отклонения в частоте использования кодонов (СРВ) по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2, снижение предпочтения кодонов по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2 или увеличение количества динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2, как обсуждается в данном документе.

Образование ослабленного вируса

[00229] Различные варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способ получения ослабленных клеток, включающий: трансфекцию популяции клеток вектором, включающим вирусный геном; пассирование популяции клеток в культуре клеток по меньшей мере один раз; сбор супернатанта из клеточной культуры.

[00230] В различных вариантах осуществления способ дополнительно включает концентрирование супернатанта.

[00231] В различных вариантах осуществления способ включает пассирование популяции клеток от 2 до 15 раз; и сбор супернатанта из клеточной культуры популяции клеток. В различных вариантах осуществления способ включает пассирование популяции клеток от 2 до 10 раз; и сбор супернатанта из клеточной культуры популяции клеток. В различных вариантах осуществления способ включает пассирование популяции клеток от 2 до 7 раз; и сбор супернатанта из клеточной культуры популяции клеток. В различных вариантах осуществления способ включает пассирование популяции клеток от 2 до 5 раз; и сбор супернатанта из клеточной культуры популяции клеток. В различных вариантах осуществления способ включает пассирование популяции клеток 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 10 раз; и сбор супернатанта из клеточной культуры популяции клеток. В различных вариантах осуществления сбор супернатанта из клеточной культуры осуществляется во время каждого пассажа популяции клеток. В других вариантах сбор супернатанта из клеточной культуры осуществляется во время одного или нескольких пассажей популяции клеток. Например, это можно делать через каждый второй пассаж; каждые два пассажа, каждые три пассажа и т. д.

Наборы

[00232] Настоящее изобретение также относится к набору для вакцинации субъекта, для вызова иммунного ответа или для вызова защитного иммунного ответа у субъекта. Набор подходит для практического применения способа по изобретению для вызова иммунного ответа или для вызова защитного иммунного ответа. Набор представляет собой набор материалов или компонентов, включающий по меньшей мере одну из композиций по изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления набор содержит композицию, содержащую любой из обсуждаемых в данном документе модифицированных вирусов SARS-CoV-2, любую из обсуждаемых в данном документе иммунных композиций или любую из обсуждаемых в данном документе композиций в виде вакцины по настоящему изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления набор содержит унифицированные разовые дозы композиции, включающей модифицированный вирус SARS-CoV-2, иммунные композиции или композиции вакцины по настоящему изобретению, как описано в данном документе; например, каждый флакон содержит достаточно для дозы около 10^3 - 10^7 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, или более конкретно, 10^4 - 10^6 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 10^4 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 10^5 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2 или 10^6 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2; или более конкретно, 5×10^4 - 5×10^6 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 5×10^4 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 5×10^5 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2 или 5×10^6 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2. В различных вариантах осуществления набор содержит несколько доз композиции, содержащей модифицированный вирус SARS-CoV-2, иммунные композиции или композиции вакцины по настоящему изобретению, как описано в данном документе; например, если набор содержит 10 дозировок во флаконе,

каждый флакон содержит около $10 \times 10^3 - 10^7$ БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, или более конкретно, $10 \times 10^4 - 10^6$ БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 10×10^4 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 10×10^5 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, или 10×10^6 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, или более конкретно, $50 \times 10^4 - 50 \times 10^6$ БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 50×10^4 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, 50×10^5 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2, или 50×10^6 БОЕ модифицированного вируса SARS-CoV-2.

[00233] Точная природа компонентов, входящих в набор по изобретению, зависит от его предполагаемого назначения. Например, некоторые варианты осуществления предназначены для вакцинации субъекта, для вызова иммунного ответа или для вызова защитного иммунного ответа у субъекта. В одном варианте осуществления набор предназначен, в частности, для профилактического лечения млекопитающих. В другом варианте осуществления набор предназначен, в частности, для профилактического лечения людей. В дополнительных вариантах осуществления набор предназначен для применения в ветеринарии для лечения таких субъектов, как, помимо прочего, сельскохозяйственные животные, домашние животные и лабораторные животные.

[00234] Инструкции по применению могут быть включены в набор. «Инструкции по применению» обычно включают материальное выражение, описывающее метод, который следует использовать при использовании компонентов набора для достижения желаемого результата, например, для вакцинации субъекта, для вызова иммунного ответа или для вызова защитного иммунного ответа у субъекта. Например, для назального введения инструкции по применению могут включать, помимо прочего, инструкции для субъекта сморкаться и запрокидывать голову назад, инструкции для субъекта изменять положение головы, чтобы композиция не капала за пределы носа или вниз по горлу, инструкции по введению около 0,25 мл препарата в каждую ноздрю; инструкции для субъекта осторожно вдыхать и/или инструкции для субъекта не сморкаться в течение определенного периода времени; например, около 60 минут. Дальнейшие инструкции могут включать указание субъекту не принимать какие-либо иммунодепрессанты.

[00235] Необязательно, набор также содержит другие полезные компоненты, такие как разбавители, буферы, фармацевтически приемлемые носители, шприцы, капельницы, катетеры, аппликаторы, пипеточные или измерительные инструменты, перевязочные материалы или другие полезные принадлежности, которые легко узнают специалисты в данной области техники.

[00236] Материалы или компоненты, собранные в наборе, могут быть предоставлены практикующему врачу в хранении любым удобным и подходящим способом, сохраняющим их работоспособность и полезность. Например, компоненты могут находиться в растворенной, обезвоженной или лиофилизированной форме; они могут поставляться при комнатной, охлажденной или замороженной температуре. Компоненты обычно содержатся в подходящем(-их) упаковочном(-ых) материале(-ах). Используемая в данном документе фраза «упаковочный материал» относится к одной или

нескольким физическим структурам, используемым для размещения содержимого набора, таким как композиции по изобретению и т.п. Упаковочный материал изготавливается известными способами, предпочтительно для обеспечения стерильной, свободной от загрязнений окружающей среды. Упаковочные материалы, используемые в наборе, такие же, как обычно используемые в вакцинах. Используемый в данном документе термин «упаковка» относится к подходящей твердой матрице или материалу, такому как стекло, пластик, бумага, фольга и т.п., способному удерживать отдельные компоненты набора. Так, например, упаковка может представлять собой стеклянный флакон, используемый для содержания подходящих количеств композиции по изобретению, содержащей модифицированный вирус SARS-CoV-2, иммунных композиций или композиций вакцины по настоящему изобретению, как описано в данном документе. Упаковочный материал обычно имеет внешнюю этикетку, на которой указано содержимое и/или назначение набора и/или его компонентов.

Последовательности

[00237] SEQ ID NO:2 - эталонная последовательность с модифицированным сайтом рестрикции, модифицированная для нокаута сайтов BsaI и BsmBI; существующий BsaI с нокаутом: a17973g (от Arg AGA до AGG), c24106 t (от Asp GAC до GAT); существующие сайты BsmBI с нокаутом: c2197t (от Asp GAC до GAT), a9754g (от Arg AGA до AGG), g17331a (от Glu GAG до GAA)

[00238]

ATTAAGGTTTATACCTTCCCAGGTAACAAACCAACCAACTTTCGATCTCTTGTAGA
TCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGCTGCATGCTTAGT
GCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAATTAATGTCGTTGACAGGACACGAGTAACT
CGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTGCAGCCGATCATCAGCAC
ATCTAGGTTTTCGTCCGGGTGTGACCGAAAGGTAAGATGGAGAGCCTTGTCCCTGGTT
TCAACGAGAAAACACACGTCCAACCTCAGTTTGCCTGTTTTACAGGTTTCGCGACGTGC
TCGTACGTGGCTTTGGAGACTCCGTGGAGGAGGTCTTATCAGAGGCACGTCAACATC
TTAAAGATGGCACTTGTGGCTTAGTAGAAGTTGAAAAGGCGTTTTGCCTCAACTTG
AACAGCCSTATGTGTTTCATCAAACGTTCCGATGCTCGAACTGCACCTCATGGTCATG
TTATGGTTGAGCTGGTAGCAGAACTCGAAGGCATTCAGTACGGTCGTAGTGGTGAG
ACACTTGGTGTCTTGTCCCTCATGTGGGCGAAATACCAGTGGCTTACCGCAAGGTT
CTTCTTCGTAAGAACGGTAATAAAGGAGCTGGTGGCCATAGTTACGGCGCCGATCTA
AAGTCATTTGACTTAGGCGACGAGCTTGGCACTGATCCTTATGAAGATTTTCAAGAA
AACTGGAACACTAAACATAGCAGTGGTGTACCCGTGAACTCATGCGTGAGCTTAA
CGGAGGGGCATACACTCGCTATGTGATAACAACCTTCTGTGGCCCTGATGGCTACCC
TCTTGAGTGCATTAAGACCTTCTAGCACGTGCTGGTAAAGCTTCATGCACTTTGTC
CGAACAACCTGGACTTTATTGACACTAAGAGGGGTGTATACTGCTGCCGTGAACATG
AGCATGAAATTGCTTGGTACACGGAACGTTCTGAAAAGAGCTATGAATTGCAGACA
CSTTTTGAAATTAATTTGGCAAAGAAATTTGACACCTTCAATGGGGAATGTCCAAAT
TTTGTATTTCCCTTAAATTCATAATCAAGACTATTCAACCAAGGGTTGAAAAGAAA

AAGCTTGATGGCTTTATGGGTAGAATTCGATCTGTCTATCCAGTTGCGTCACCAAAT
GAATGCAACCAAATGTGCCTTTCAACTCTCATGAAGTGTGATCATTGTGGTGAAACT
TCATGGCAGACGGGCGATTTTGTAAAGCCACTTGCGAATTTTGTGGCACTGAGAAT
TTGACTAAAGAAGGTGCCACTACTTGTGGTACTTACCCCAAATGCTGTTGTTAAA
ATTTATTGTCCAGCATGTCACAATTCAGAAGTAGGACCTGAGCATAAGTCTTGCCGAA
TACCATAATGAATCTGGCTTGAAAACCATCTTCGTAAGGGTGGTCGCACTATTGCC
TTTGGAGGCTGTGTGTTCTTATGTTGGTTGCCATAACAAGTGTGCCTATTGGGTTCC
CACGTGCTAGCGCTAACATAGGTTGTAACCATAACAGGTGTTGTTGGAGAAGGTTCCG
AAGGTCTTAATGACAACCTTCTTGAAATACTCCAAAAAGAGAAAGTCAACATCAAT
ATTGTTGGTGACTTTAAACTTAATGAAGAGATCGCCATTATTTGGCATCTTTTTCTG
CTTCCACAAGTGCTTTTGTGGAACTGTGAAAGGTTTGGATTATAAAGCATTCAAAC
AAATTGTTGAATCCTGTGGTAATTTTAAAGTTACAAAAGGAAAAGCTAAAAAAGGT
GCCTGGAATATTGGTGAACAGAAATCAATACTGAGTCCTCTTTATGCATTTGCATCA
GAGGCTGCTCGTGTGTACGATCAATTTCTCCCGCACTCTTGAAACTGCTCAAATTT
CTGTGCGTGTTTTACAGAAGGCCGCTATAACAATACTAGATGGAATTTACAGTATT
CACTGAGACTCATTGATGCTATGATGTTACATCTGATTTGGCTACTAACAATCTAG
TTGTAATGGCCTACATTACAGGTGGTGTGTTTTCAGTTGACTTCGCAGTGGCTAACTA
ACATCTTTGGCACTGTTTATGAAAACTCAAACCCGTCCTTGATTGGCTTGAAGAGA
AGTTTAAGGAAGGTGTAGAGTTTCTTAGAGAAAGGTTGGGAAATTGTTAAATTTATCTC
AACCTGTGCTTGTGAAATTGTCGGTGGACAAATTGTCACCTGTGCAAAGGAAATTAA
GGAGAGTGTTCAGACATTCTTAAAGCTTGTAATAAATTTTGGCTTTGTGTGCTGAC
TCTATCATTATTGGTGGAGCTAACTTAAAGCCTTGAATTTAGGTGAAACATTTGTC
ACGCACTCAAAGGGATTGTACAGAAAGTGTGTTAAATCCAGAGAAGAACTGGCCT
ACTCATGCCTCTAAAAGCCCCAAAAGAAATTATCTTCTTAGAGGGAGAAACACTTCC
CACAGAAGTGTTAACAGAGGAAGTTGTCTTGAAAACCTGGTGATTTACAACCATTAG
AACAACTACTAGTGAAGCTGTTGAAGCTCCATTGGTTGGTACACCAGTTTGTATTA
ACGGGCTTATGTTGCTCGAAATCAAAGACACAGAAAAGTACTGTGCCCTTGCACCTA
ATATGATGGTAACAAACAATACCTTCACACTCAAAGGCGGTGCACCAACAAAGGTT
ACTTTTGGTGATGACACTGTGATAGAAGTGCAAGGTTACAAGAGTGTGAATATCACT
TTTGAACCTGATGAAAGGATTGATAAAGTACTTAATGAGAAGTGCTCTGCCTATACA
GTTGAACCTCGGTACAGAAGTAAATGAGTTCGCCTGTGTTGTGGCAGATGCTGTCATA
AAAACCTTGCAACCAGTATCTGAATTACTTACACCACTGGGCATTGATTTAGATGAG
TGGAGTATGGCTACATACTACTTATTTGATGAGTCTGGTGAGTTTAAATTGGCTTCA
CATATGTATTGTTCTTTCTACCCTCCAGATGAGGATGAAGAAGAAGGTGATTGTGAA
GAAGAAGAGTTTGGCCATCAACTCAATATGAGTATGGTACTGAAGATGATTACCA
AGGTAAACCTTTGGAATTTGGTGCCACTTCTGCTGCTCTTCAACCTGAAGAAGAGCA
AGAAGAAGATTGGTTAGATGATGATAGTCAACAACTGTTGGTCAACAAGACGGCA
GTGAGGACAATCAGACAACACTACTATTCAAACAATTGTTGAGGTTCAACCTCAATTAG
AGATGGAACCTTACACCAGTTGTTTCAGACTATTGAAGTGAATAGTTTTAGTGGTTATT
TAAAACCTACTGACAATGTATACATTAATAAATGCAGACATTGTGGAAGAAGCTAAA

AAGGTAAAACCAACAGTGGTTGTTAATGCAGCCAATGTTTACCTTAAACATGGAGG
AGGTGTTGCAGGAGCCTTAAATAAGGCTACTAACAATGCCATGCAAGTTGAATCTG
ATGATTACATAGCTACTAATGGACCACTTAAAGTGGGTGGTAGTTGTGTTTTAAGCG
GACACAATCTTGCTAAACACTGTCTTCATGTTGTGCGGCCCAAATGTTAACAAAGGTG
AAGACATTCAACTTCTTAAGAGTGCTTATGAAAATTTAATCAGCACGAAGTTCTAC
TTGCACCATTATTATCAGCTGGTATTTTTGGTGCTGACCCTATACATTCTTTAAGAGT
TTGTGTAGATACTGTTTCGCACAAATGTCTACTTAGCTGTCTTTGATAAAAATCTCTAT
GACAAACTTGTTTCAAGCTTTTTGGAAATGAAGAGTGAAAAGCAAGTTGAACAAAA
GATCGCTGAGATTCCTAAAGAGGAAGTTAAGCCATTTATAACTGAAAGTAAACCTTC
AGTTGAACAGAGAAAACAAGATGATAAGAAAATCAAAGCTTGTGTTGAAGAAGTTA
CAACAACCTCTGGAAGAACTAAGTTCCTCACAGAAAACCTTGTTACTTTATATTGACA
TTAATGGCAATCTTCATCCAGATTCTGCCACTCTTGTTAGTGACATTGACATCACTTT
CTTAAAGAAAGATGCTCCATATATAGTGGGTGATGTTGTTCAAGAGGGTGTTTTAAAC
TGCTGTGGTTATACCTACTAAAAGGCTGGTGGCACTACTGAAATGCTAGCGAAAG
CTTTGAGAAAAGTGCCAACAGACAATTATATAACCACTTACCCGGGTCAGGGTTTAA
ATGGTTACACTGTAGAGGAGGCAAAGACAGTGCTTAAAAAGTGTAAGAGTGCCTTT
TACATTCTACCATCTATTATCTCTAATGAGAAGCAAGAAATTCTTGGAAGTGTCTT
GGAATTTGCGAGAAATGCTTGCACATGCAGAAGAAACACGCAAATTAATGCCTGTC
TGTGTGGAAGTAAAGCCATAGTTTCAACTATACAGCGTAAATATAAGGGTATTAA
AATACAAGAGGGTGTGGTTGATTATGGTGCTAGATTTTACTTTTACACCAGTAAAC
AACTGTAGCGTCACTTATCAACACACTTAACGATCTAAATGAACTCTTGTTACAAT
GCCACTTGGCTATGTAACACATGGCTTAAATTTGGAAGAAGCTGCTCGGTATATGAG
ATCTCTCAAAGTGCCAGCTACAGTTTCTGTTTCTTCACCTGATGCTGTTACAGCGTAT
AATGGTTATCTTACTTCTTCTTCTAAAACACCTGAAGAACATTTTATTGAAACCATCT
CACTTGCTGGTTCCTATAAAGATTGGTCCTATTCTGGACAATCTACACAACCTAGGTA
TAGAATTTCTTAAGAGAGGTGATAAAAAGTGATATTACACTAGTAATCCTACCACAT
TCCACCTAGATGGTGAAGTTATCACCTTTGACAATCTTAAGACACTTCTTTCTTTGAG
AGAAGTGAGGACTATTAAGGTGTTTACAACAGTAGACAACATTAACCTCCACACGC
AAGTTGTGGACATGTCAATGACATATGGACAACAGTTTGGTCCAACCTTATTTGGATG
GAGCTGATGTTACTAAAATAAAACCTCATAATTCACATGAAGGTAAAACATTTTATG
TTTTACCTAATGATGACACTCTACGTGTTGAGGCTTTTGAGTACTACCACACAACCTG
ATCCTAGTTTTCTGGGTAGGTACATGTCAGCATTAAATCACACTAAAAGTGGAAT
ACCCACAAGTTAATGGTTTAACTTCTATTAATGGGCAGATAACAACCTGTTATCTTG
CCACTGCATTGTTAACACTCCAACAAATAGAGTTGAAGTTAATCCACCTGCTCTAC
AAGATGCTTATTACAGAGCAAGGGCTGGTGAAGCTGCTAACTTTTGTGCACTTATCT
TAGCCTACTGTAATAAGACAGTAGGTGAGTTAGGTGATGTTAGAGAAACAATGAGT
TACTTGTTC AACATGCCAATTTAGATTCTTGCAAAAGAGTCTTGAACGTGGTGTGT
AAAACCTTGTGGACAACAGCAGACAACCCTTAAGGGTGTAGAAGCTGTTATGTACAT
GGGCACACTTTCTTATGAACAATTTAAGAAAGGTGTTTACGATACCTTGTACGTGTGG
TAAACAAGCTACAAAATATCTAGTACAACAGGAGTCACCTTTTGTATGATGTCAGC

ACCACCTGCTCAGTATGAACTTAAGCATGGTACATTTACTTGTGCTAGTGAGTACAC
TGGTAATTACCAGTGTGGTCACTATAAACATATAACTTCTAAAGAACTTTGTATTG
CATAGACGGTGCTTTACTTACAAAGTCCTCAGAATACAAAGGTCCTATTACGGATGT
TTTCTACAAAGAAAACAGTTACACAACAACCATAAAACCAGTTACTTATAAATTGG
ATGGTGTGTTTGTACAGAAATTGACCCTAAGTTGGACAATTATTATAAGAAAGACA
ATTCTTATTTACAGAGCAACCAATTGATCTTGTACCAAACCAACCATATCCAAACG
CAAGCTTCGATAATTTTAAGTTTGTATGTGATAATATCAAATTTGCTGATGATTTAAA
CCAGTTAACTGGTTATAAGAAACCTGCTTCAAGAGAGCTTAAAGTTACATTTTTCCC
TGACTTAAATGGTGATGTGGTGGCTATTGATTATAAACACTACACACCCTCTTTTAA
GAAAGGAGCTAAATTGTTACATAAACCTATTGTTTGGCATGTTAACAATGCAACTAA
TAAAGCCACGTATAAACCAAATACCTGGTGTATACGTTGTCTTTGGAGCACAAAACC
AGTTGAAACATCAAATTCGTTTGTATGTACTGAAGTCAGAGGACGCGCAGGGAATGG
ATAATCTTGCCTGCGAAGATCTAAAACCAGTCTCTGAAGAAGTAGTGGAAAATCCT
ACCATACAGAAAGACGTTCTTGAGTGTAATGTGAAAACCTACCGAAGTTGTAGGAGA
CATTATACTTAAACCAGCAAATAATAGTTTAAAAATTACAGAAGAGGTTGGCCACA
CAGATCTAATGGCTGCTTATGTAGACAATTCTAGTCTTACTATTAAGAAACCTAATG
AATTATCTAGAGTATTAGGTTTAAAACCCTTGCTACTCATGGTTTAGCTGCTGTTAA
TAGTGTCCCTTGGGATACTATAGCTAATTATGCTAAGCCTTTTCTTAAACAAAGTTGTT
AGTACAACACTAACATAGTTACACGGTGTTTAAACCGTGTTTGTTACTAATTATATG
CCTTATTTCTTTACTTTATTGCTACAATTGTGTACTTTTACTAGAAGTACAAATTCTA
GAATTAAGCATCTATGCCGACTACTATAGCAAAGAATACTGTTAAGAGTGTCCGT
AAATTTTGTCTAGAGGCTTCATTTAATTATTTGAAGTCACCTAATTTTTCTAAACTGA
TAAATATTATAATTTGGTTTTTACTATTAAGTGTTTGCCTAGGTTCTTTAATCTACTC
AACCGCTGCTTTAGGTGTTTTAATGTCTAATTTAGGCATGCCTTCTTACTGTACTGGT
TACAGAGAAGGCTATTTGAACTCTACTAATGTCACTATTGCAACCTACTGTACTGGT
TCTATACCTTGTAGTGTGTTGTCTTAGTGGTTTAGATTCTTTAGACACCTATCCTTCTT
AGAACTATACAAATTACCATTTTCATCTTTTAAATGGGATTTAACTGCTTTTGGCTTA
GTTGCAGAGTGGTTTTTGGCATATATTCTTTTCACTAGGTTTTTCTATGTACTTGGAT
TGGCTGCAATCATGCAATTGTTTTTCAGCTATTTTGCAGTACATTTTATTAGTAATTC
TTGGCTTATGTGGTTAATAATTAATCTTGTACAAATGGCCCCGATTTTCAGCTATGGTT
AGAATGTACATCTTCTTTCATCATTTTTATTATGTATGGAAAAGTTATGTGCATGTTG
TAGACGGTTGTAATTCATCAACTTGTATGATGTGTTACAAACGTAATAGAGCAACAA
GAGTCGAATGTACAACCTATTGTTAATGGTGTTAGAAGGTCCTTTTATGTCTATGCTA
ATGGAGGTAAAGGCTTTTGCAAAACCTACACAATTGGAATTGTGTTAATTGTGATACAT
TCTGTGCTGGTAGTACATTTATTAGTGATGAAGTTGCGAGAGACTTGTCACTACAGT
TTAAAAGACCAATAAATCCTACTGACCAGTCTTCTTACATCGTTGATAGTGTTACAG
TGAAGAATGGTTCCATCCATCTTTACTTTGATAAAGCTGGTCAAAGACTTATGAAA
GACATTCTCTCTCATTTTTGTTAACTTAGACAACCTGAGAGCTAATAACACTAAAG
GTTCAATGCCTATTAATGTTATAGTTTTTGTATGGTAAATCAAATGTGAAGAATCAT
CTGCAAATCAGCGTCTGTTTACTACAGTCAGCTTATGTGTCAACCTATACTGTTACT

AGATCAGGCATTAGTGTCTGATGTTGGTGATAGTGCGGAAGTTGCAGTTAAAATGTT
TGATGCTTACGTTAATACGTTTTTCATCAACTTTTAACGTACCAATGGAAAACTCAA
AACACTAGTTGCAACTGCAGAAGCTGAACTTGCAAAGAATGTGTCCTTAGACAATG
TCTTATCTACTTTTATTTTCAGCAGCTCGGCAAGGGTTTGTGATTGATGATAGAAAC
TAAAGATGTTGTTGAATGTCTTAAATTGTCACATCAATCTGACATAGAAGTTACTGG
CGATAGTTGTAATAACTATATGCTCACCTATAACAAAGTTGAAAACATGACACCCCG
TGACCTTGGTGCTTGTATTGACTGTAGTGCGCGTCATATTAATGCGCAGGTAGCAAA
AAGTCACAACATTGCTTTGATATGGAACGTTAAAGATTTTCATGTCATTGTCTGAACA
ACTACGAAAACAAATACGTAGTGCTGCTAAAAAGAATAACTTACCTTTTAAGTTGAC
ATGTGCAACTACTAGACAAGTTGTTAATGTTGTAACAACAAAGATAGCACTTAAGG
GTGGTAAAATTGTTAATAATTGGTTGAAGCAGTTAATTAAGTTACACTTGTGTTCC
TTTTTGTGCTGCTATTTTCTATTTAATAACACCTGTTTCATGTCATGTCTAAACATACT
GACTTTTCAAGTGAAATCATAGGATACAAGGCTATTGATGGTGGTGTCACTCGTGAC
ATAGCATCTACAGATACTTGTTTTGCTAACAACATGCTGATTTTGACACATGGTTT
AGCCAGCGTGGTGGTAGTTATACTAATGACAAAGCTTGCCCATTGATTGCTGCAGTC
ATAACAAGAGAAGTGGGTTTTGTCGTGCCTGGTTTTGCCTGGCACGATATTACGCACA
ACTAATGGTGACTTTTTGCATTTCTTACCTAGAGTTTTTAGTGCAGTTGGTAACATCT
GTTACACACCATCAAACTTATAGAGTACACTGACTTTGCAACATCAGCTTGTGTTT
TGGCTGCTGAATGTACAATTTTTAAAGATGCTTCTGGTAAGCCAGTACCATATTGTT
ATGATACCAATGTACTAGAAGGTTCTGTTGCTTATGAAAGTTTACGCCCTGACACAC
GTTATGTGCTCATGGATGGCTCTATTATTCAATTTCTAACACCTACCTTGAAGGTTT
TGTTAGAGTGGTAACAACCTTTGATTCTGAGTACTGTAGGCACGGCACTTGTGAAAG
ATCAGAAGCTGGTGTGGTGTATCTACTAGTGGTAGATGGGTACTTAACAATGATTA
TTACAGATCTTTACCAGGAGTTTTCTGTGGTGTAGATGCTGTAATTTACTTACTAAT
ATGTTTACACCACTAATTCAACCTATTGGTGCTTTGGACATATCAGCATCTATAGTA
GCTGGTGGTATTGTAGCTATCGTAGTAACATGCCTTGCCTACTATTTTATGAGGTTTA
GAAGAGCTTTTGGTGAATACAGTCATGTAGTTGCCTTTAATACTTTACTATTCCTTAT
GTCATTCACTGTACTCTGTTTAAACACCAGTTTACTCATTCTTACCTGGTGTTTATTCTG
TTATTTACTTGTACTTGACATTTTATCTTACTAATGATGTTTCTTTTTTAGCACATATT
CAGTGGATGGTTATGTTACACCTTTAGTACCTTTCTGGATAACAATTGCTTATATCA
TTTGTATTTCCACAAAGCATTCTATTGGTTCTTTAGTAATTACCTAAAGAG_gCGTGT
AGTCTTTAATGGTGTTCCTTTAGTACTTTTGAAGAAGCTGCGCTGTGCACCTTTTTG
TTAAATAAAGAAATGTATCTAAAGTTGCGTAGTGATGTGCTATTACCTCTTACGCAA
TATAATAGATACTTAGCTCTTTATAATAAGTACAAGTATTTTAGTGGAGCAATGGAT
ACAACACTAGCTACAGAGAAGCTGCTTGTGTCATCTCGCAAAGGCTCTCAATGACTTC
AGTAACTCAGGTTCTGATGTTCTTTACCAACCACCACAAACCTCTATCACCTCAGCT
GTTTTGCAGAGTGGTTTTAGAAAAATGGCATTCCCATCTGGTAAAGTTGAGGGTGT
ATGGTACAAGTAACTTGTGGTACAACACTTAAACGGTCTTTGGCTTGTGACGTA
GTTTACTGTCCAAGACATGTGATCTGCACCTCTGAAGACATGCTTAAACCCTAATTAT
GAAGATTTACTCATTCGTAAGTCTAATCATAATTTCTTGGTACAGGCTGGTAATGTTT

AACTCAGGGTTATTGGACATTCTATGCAAAATTGTGTACTTAAGCTTAAGGTTGATA
CAGCCAATCCTAAGACACCTAAGTATAAGTTTGTTCGCATTCAACCAGGACAGACTT
TTTCAGTGTAGCTTGTACAATGGTTCACCATCTGGTGTACCAATGTGCTATGAG
GCCCAATTTCACTATTAAGGGTTCATTCCTAATGGTTCATGTGGTAGTGTGGTTTT
AACATAGATTATGACTGTGTCTCTTTTTGTTACATGCACCATATGGAATTACCAACTG
GAGTTCATGCTGGCACAGACTTAGAAGGTAACTTTTATGGACCTTTTGTGACAGGC
AAACAGCACAAGCAGCTGGTACGGACACAACCTATTACAGTTAATGTTTTAGCTTGGT
TGTACGCTGCTGTTATAAATGGAGACAGGTGGTTTCTCAATCGATTTACCACAACCTC
TTAATGACTTTAACCTTGTGGCTATGAAGTACAATTATGAACCTCTAACACAAGACC
ATGTTGACATACTAGGACCTCTTCTGCTCAAACCTGGAATTGCCGTTTTAGATATGTG
TGCTTCATTAAGAATTACTGCAAAATGGTATGAATGGACGTACCATATTGGGTAG
TGCTTTATTAGAAGATGAATTTACACCTTTTGATGTTGTTAGACAATGCTCAGGTGTT
ACTTTCCAAAGTGCAGTGAAAAGAACAATCAAGGGTACACACCACTGGTTGTTACT
CACAATTTGACTTCACTTTTAGTTTTAGTCCAGAGTACTCAATGGTCTTTGTTCTTTT
TTTTGTATGAAAATGCCTTTTACCTTTTGCTATGGGTATTATTGCTATGTCTGCTTTT
GCAATGATGTTTGTCAAACATAAGCATGCATTTCTCTGTTTGTGTTTTGTTACCTTCTC
TTGCCACTGTAGCTTATTTAATATGGTCTATATGCCTGCTAGTTGGGTGATGCGTAT
TATGACATGGTTGGATATGGTTGATACTAGTTTGTCTGGTTTTAAGCTAAAAGACTG
TGTTATGTATGCATCAGCTGTAGTGTACTAATCCTTATGACAGCAAGAACTGTGTA
TGATGATGGTGCTAGGAGAGTGTGGACACTTATGAATGTCTTGACACTCGTTTATAA
AGTTTATTATGGTAATGCTTTAGATCAAGCCATTTCCATGTGGGCTCTTATAATCTCT
GTTACTTCTAACTACTCAGGTGTAGTTACAACCTGTCATGTTTTTGGCCAGAGGTATTG
TTTTATGTGTGTTGAGTATTGCCCTATTTTCTTCATAACTGGTAATACACTTCAGTG
TATAATGCTAGTTTATTGTTTCTTAGGCTATTTTTGTAAGTTGTTACTTTGGCCTCTTTT
GTTTACTCAACCGCTACTTTAGACTGACTCTTGGTGTGTTATGATTACTTAGTTTCTAC
ACAGGAGTTTAGATATATGAATTCACAGGGACTACTCCCACCAAGAATAGCATAG
ATGCCTTCAAACCTAACATTAATTTGTTGGGTGTTGGTGGCAAACCTTGTATCAAAG
TAGCCACTGTACAGTCTAAAATGTCAGATGTAAAGTGCACATCAGTAGTCTTACTCT
CAGTTTTGCAACAACCTCAGAGTAGAATCATCATCTAAATTGTGGGCTCAATGTGTCC
AGTTACACAATGACATTCTCTTAGCTAAAGATACTACTGAAGCCTTTGAAAAAATGG
TTTCACTACTTTCTGTTTTGCTTTCCATGCAGGGTGCTGTAGACATAAACAAGCTTTG
TGAAGAAATGCTGGACAACAGGGCAACCTTACAAGCTATAGCCTCAGAGTTTAGTT
CCCTTCCATCATATGCAGCTTTTGCTACTGCTCAAGAAGCTTATGAGCAGGCTGTTG
CTAATGGTGATTCTGAAGTTGTTCTTAAAAAGTTGAAGAAGTCTTTGAATGTGGCTA
AATCTGAATTTGACCGTGATGCAGCCATGCAACGTAAGTTGGAAAAGATGGCTGAT
CAAGCTATGACCCAAATGTATAAACAGGCTAGATCTGAGGACAAGAGGGCAAAGT
TACTAGTGCTATGCAGACAATGCTTTTCACTATGCTTAGAAAGTTGGATAATGATGC
ACTCAACAACATTATCAACAATGCAAGAGATGGTTGTGTTCCCTTGAACATAATACC
TCTTACAACAGCAGCCAAACTAATGGTTGTCATACCAGACTATAACACATATAAAA
ATACGTGTGATGGTACAACATTTACTTATGCATCAGCATTGTGGGAAATCCAACAGG

TTGTAGATGCAGATAGTAAAATTGTTCAACTTAGTGAAATTAGTATGGACAATTCAC
CTAATTTAGCATGGCCTCTTATTGTAACAGCTTTAAGGGCCAATTCTGCTGTCAAATT
ACAGAATAATGAGCTTAGTCCTGTTGCACTACGACAGATGTCTTGTGCTGCCGGTAC
TACACAAACTGCTTGCCTGATGACAATGCGTTAGCTTACTACAACACAACAAAGG
GAGGTAGGTTTGTACTTGCCTGTTATCCGATTTACAGGATTTGAAATGGGCTAGAT
TCCCTAAGAGTGATGGAAGTGGTACTATCTATACAGAAGTGGAAACCACCTTGTAGGT
TTGTTACAGACACACCTAAAGGTCCTAAAGTGAAGTATTTATACTTTATTAAGGAT
TAAACAACCTAAATAGAGGTATGGTACTTGGTAGTTTAGCTGCCACAGTACGTCTAC
AAGCTGGTAATGCAACAGAAGTGCCTGCCAATCAACTGTATTATCTTTCTGTGCTT
TTGCTGTAGATGCTGCTAAAGCTTACAAAGATTATCTAGCTAGTGGGGGACAACCAA
TCACTAATTGTGTTAAGATGTTGTGTACACACACTGGTACTGGTCAGGCAATAACAG
TTACACCGGAAGCCAATATGGATCAAGAATCCTTTGGTGGTGCATCGTGTGTCTGT
ACTGCCGTTGCCACATAGATCATCAAATCCTAAAGGATTTTGTGACTTAAAAGGTA
AGTATGTACAAATACCTACAACCTTGTGCTAATGACCCTGTGGGTTTTACTTAAAA
ACACAGTCTGTACCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGGCTGTAGTTGTGATCAAC
TCCGCGAACCCATGCTTCAGTCAGCTGATGCACAATCGTTTTTAAACGGGTTTGC GG
TGTAAGTGCAGCCCGTCTTACACCGTGCGGCACAGGCACTAGTACTGATGTCGTATA
CAGGGCTTTTGACATCTACAATGATAAAGTAGCTGGTTTTGCTAAATTCCTAAAAAC
TAATTGTTGTCGCTTCCAAGAAAAGGACGAAGATGACAATTTAATTGATTCTTACTT
TGTAGTTAAGAGACACACTTTCTCTAACTACCAACATGAAGAAACAATTTATAATTT
ACTTAAGGATTGTCCAGCTGTTGCTAAACATGACTTCTTTAAGTTTAGAATAGACGG
TGACATGGTACCACATATATCACGTCAACGTCTTACTAAATACACAATGGCAGACCT
CGTCTATGCTTTAAGGCATTTTGATGAAGGTAATTGTGACACATTAAGAAATAACT
TGTCACATAACAATTGTTGTGATGATGATTATTTCAATAAAAAGGACTGGTATGATTT
TGTAGAAAACCCAGATATATTACGCGTATACGCCAACTTAGGTGAACGTGTACGCC
AAGCTTTGTTAAAAACAGTACAATTCTGTGATGCCATGCGAAATGCTGGTATTGTTG
GTGTAAGTACATTAGATAATCAAGATCTCAATGGTAACTGGTATGATTTCCGGTGATT
TCATACAAACCACGCCAGGTAGTGGAGTTCCTGTTGTAGATTCTTATTATTCATTGTT
AATGCCTATATTAACCTTGACCAGGGCTTTAACTGCAGAGTCACATGTTGACACTGA
CTTAACAAAGCCTTACATTAAGTGGGATTTGTTAAAATATGACTTCACGGAAGAGAG
GTTAAAACCTTTGACCGTATTTTTAAATATTGGGATCAGACATAACCACCAAATTG
TGTTAACTGTTTGGATGACAGATGCATTCTGCATTGTGCAAACCTTAATGTTTTATTC
TCTACAGTGTTCACCTACAAGTTTTGGACCACTAGTGAGAAAAATATTTGTTGAT
GGTGTTCATTTGTAGTTTCAACTGGATAACCACTCAGAGAGCTAGGTGTTGTACAT
AATCAGGATGTAACTTACATAGCTCTAGACTTAGTTTTAAGGAATTACTTGTGTAT
GCTGCTGACCCTGCTATGCACGCTGCTTCTGGTAATCTATTACTAGATAAACGCACT
ACGTGCTTTTTCAGTAGCTGCACTTACTAACAATGTTGCTTTTCAAACCTGTCAAACCCG
GTAATTTTAAACAAAGACTTCTATGACTTTGCTGTGTCTAAGGGTTTCTTTAAGGAAG
GAAGTTCTGTTGAATTAACAACTTCTTCTTTGCTCAGGATGGTAATGCTGCTATCA
GCGATTATGACTACTATCGTTATAATCTACCAACAATGTGTGATATCAGACAACACTAC

TATTTGTAGTTGAAGTTGTTGATAAGTACTTTGATTGTTACGATGGTGGCTGTATTAA
TGCTAACCAAGTCATCGTCAACAACCTAGACAAATCAGCTGGTTTTCCATTTAATAA
ATGGGGTAAGGCTAGACTTTATTATGATTCAATGAGTTATGAGGATCAAGATGCACT
TTTCGCATATACAAAACGTAATGTCATCCCTACTATAACTCAAATGAATCTTAAGTA
TGCCATTAGTGCAAAGAATAGAGCTCGCACCGTAGCTGGTGTCTCTATCTGTAGTAC
TATGACCAATAGACAGTTTCATCAAAAATTATTGAAATCAATAGCCGCCACTAGAG
GAGCTACTGTAGTAATTGGAACAAGCAAATTCTATGGTGGTTGGCACAACATGTTAA
AAACTGTTTATAGTGATGTAGAAAACCCTCACCTTATGGGTTGGGATTATCCTAAAT
GTGATAGAGCCATGCCTAACATGCTTAGAATTATGGCCTCACTTGTCTTGCTCGCA
AACATACAACGTGTTGTAGCTTGTACACCGTTTCTATAGATTAGCTAATGAGTGTG
CTCAAGTATTGAGTGAAATGGTCATGTGTGGCGGTTCACTATATGTTAAACCAGGTG
GAACCTCATCAGGAGATGCCACAACCTGCTTATGCTAATAGTGTTTTTAACATTTGTC
AAGCTGTCACGGCCAATGTTAATGCACTTTTATCTACTGATGGTAACAAAATTGCCG
ATAAGTATGTCCGCAATTTACAACACAGACTTTATGAGTGTCTCTATAGAAATAGAG
ATGTTGACACAGACTTTGTGAATGAGTTTTACGCATATTTGCGTAAACATTTCTCAAT
GATGATACTCTCTGACGATGCTGTTGTGTGTTTCAATAGCACTTATGCATCTCAAGGT
CTAGTGGCTAGCATAAAGAACTTTAAGTCAGTTCTTTATTATCAAAAACAATGTTTTT
ATGTCTGAAGCAAAATGTTGGACTGAGACTGACCTTACTAAAGGACCTCATGAATTT
TGCTCTCAACATACAATGCTAGTTAAACAGGGTGATGATTATGTGTACCTTCCTTAC
CCAGATCCATCAAGAATCCTAGGGGCCGGCTGTTTTGTAGATGATATCGTAAAAACA
GATGGTACACTTATGATTGAACGGTTCGTGTCTTTAGCTATAGATGCTTACCCACTTA
CTAAACATCCTAATCAGGAGTATGCTGATGTCTTTCATTTGTACTIONACAATACATAA
GAAAGCTACATGATGAGTTAACAGGACACATGTTAGACATGTATTCTGTTATGCTTA
CTAATGATAACACTTCAAGGTATTGGGAACCTGAGTTTTATGAGGCTATGTACACAC
CGCATAACAGTCTTACAGGCTGTTGGGGCTTGTGTTCTTTGCAATTCACAGACTTCATT
AAGATGTGGTGCTTGCATACGTAGACCATTCTTATGTTGTAAATGCTGTTACGACCA
TGTCATATCAACATCACATAAATTAGTCTTGTCTGTTAATCCGTATGTTTGCAATGCT
CCAGGTTGTGATGTCACAGATGTGACTCAACTTTACTTAGGAGGTATGAGCTATTAT
TGTAATCACATAAACCACCATTAGTTTTCCATTGTGTGCTAATGGACAAGTTTTTTG
GTTTATATAAAAATACATGTGTTGGTAGCGATAATGTTACTGACTTTAATGCAATTG
CAACATGTGACTGGACAAATGCTGGTGATTACATTTTAGCTAACACCTGTACTGAAA
GACTCAAGCTTTTTGCAGCAGAAACGCTCAAAGCTACTGAGGAGACATTTAAACTGT
CTTATGGTATTGCTACTGTACGTGAAGTGCTGTCTGACAGAGAATTACATCTTTCAT
GGGAAGTTGGTAAACCTAGACCACCTTAACCGAAATTATGTCTTTACTGGTTATC
GTGTAATAAAAACAGTAAAGTACAAATAGGAGAGTACACCTTTGAAAAAGGTGAC
TATGGTGATGCTGTTGTTTACCGAGGTACAACAACCTTACAAATTAATGTTGGTGAT
TATTTTGTGCTGACATCACATACAGTAATGCCATTAAGTGCACCTACACTAGTGCCA
CAAGAGCACTATGTTAGAATTACTGGCTTATACCCAACACTCAATATCTCAGATGAG
TTTTCTAGCAATGTTGCAAATTATCAAAAGGTTGGTATGCAAAAGTATTCTACACTC
CAGGGACCACCTGGTACTGGTAAGAGTCATTTTGCTATTGGCCTAGCTCTCTACTAC

CCTTCTGCTCGCATAGTGTATACAGCTTGCTCTCATGCCGCTGTTGATGCACTATGTG
AGAAGGCATTA AAAATATTTGCCTATAGATAAAATGTAGTAGAATTATACCTGCACGTG
CTCGTGTAGAGTGT TTTTGATAAAATTC AAAGTGAATTCAACATTAGAACAGTATGTCT
TTTGTACTGTAAATGCATTGCCTGA_aACGACAGCAGATATAGTTGTCTTTGATGAAAT
TTCAATGGCCACAAATTATGATTTGAGTGTGTCAATGCCAGATTACGTGCTAAGCA
CTATGTGTACATTGGCGACCCTGCTCAATTACCTGCACCACGCACATTGCTAACTAA
GGGCACACTAGAACCAGAATATTTCAATTCAGTGTGTAGACTTATGAAA ACTATAG
GTCCAGACATGTTCCCTCGGAACTTGTCGGCGTTGTCCTGCTGAAATTGTTGACTG
TGAGTGCTTTGGTTTATGATAATAAGCTTAAAGCACATAAAGACAAATCAGCTCAAT
GCTTTAAAATGTTTTATAAGGGTGTATCACGCATGATGTTTCATCTGCAATTAACA
GGCCACAAATAGGCGTGGTAAGAGAATTCCTTACACGTAACCCTGCTTGGAGAAAA
GCTGTCTTTATTTACCTTATAATTCACAGAATGCTGTAGCCTCAAAGATTTTGGGAC
TACCAACTCAA ACTGTTGATTCATCACAGGGCTCAGAATATGACTATGTCATATTCA
CTCAAACCACTGAAACAGCTCACTCTTGTAATGTAAACAGATTTAATGTTGCTATTA
CCAGAGCAA AAGTAGGCATACTTTGCATAATGTCTGATAG_gGACCTTTATGACAAGT
TGCAATTTACAAGTCTTGAAATTCCACGTAGGAATGTGGCAACTTTACAAGCTGAAA
ATGTAACAGGACTCTTTAAAGATTGTAGTAAGGTAATCACTGGGTTACATCCTACAC
AGGCACCTACACACCTCAGTGTGACTAAATTCAA AACTGAAGGTTTATGTGTTG
ACATACCTGGCATACTAAGGACATGACCTATAGAAGACTCATCTCTATGATGGGTT
TTAAAATGAATTATCAAGTTAATGGTTACCCTAACATGTTTATCACCCGCGAAGAAG
CTATAAGACATGTACGTGCATGGATTGGCTTCGATGTGCGAGGGGTGTCATGCTACTA
GAGAAGCTGTTGGTACCAATTTACCTTTACAGCTAGGTTTTTCTACAGGTGTTAACCT
AGTTGCTGTACCTACAGGTTATGTTGATACACCTAATAATACAGATTTTTCCAGAGT
TAGTGCTAAACCACCGCCTGGAGATCAATTTAAACACCTCATA CCACTTATGTACAA
AGGACTTCCTTGGAATGTAGTGCGTATAAAGATTGTACAAATGTTAAGTGACACACT
TAAAATCTCTCTGACAGAGTCGTATTTGTCTTATGGGCACATGGCTTTGAGTTGAC
ATCTATGAAGTATTTTGTGAAAATAGGACCTGAGCGCACCTGTTGTCTATGTGATAG
ACGTGCCACATGCTTTTCCACTGCTTCAGACACTTATGCCTGTTGGCATCATTCTATT
GGATTTGATTACGTCTATAATCCGTTTATGATTGATGTTCAACAATGGGGTTTTACAG
GTAACCTACAAAGCAACCATGATCTGTATTGTCAAGTCCATGGTAATGCACATGTAG
CTAGTTGTGATGCAATCATGACTAGGTGTCTAGCTGTCCACGAGTGCTTTGTTAAGC
GTGTTGACTGGACTATTGAATATCCTATAAATTGGTGATGAACTGAAGATTAATGCGG
CTTGTAGAAAGGTTCAACACATGGTTGTTAAAGCTGCATTATTAGCAGACAAATTCC
CAGTTCTTCACGACATTGGTAACCCTAAAGCTATTAAGTGTGTACCTCAAGCTGATG
TAGAATGGAAGTTCTATGATGCACAGCCTTG TAGTGACAAAGCTTATAAAAATAGAA
GAATTATTCTATTCTTATGCCACACATTCTGACAAATTCACAGATGGTGTATGCCTAT
TTTGAATTGCAATGTCGATAGATATCCTGCTAATTCCATTGTTTGTAGATTTGACAC
TAGAGTGCTATCTAACCTTAACTTGCTGGTTGTGATGGTGGCAGTTTGTATGTAAA
TAAACATGCATTCCACACACCAGCTTTTGATAAAAGTGCTTTTGTTAATTTAAAACA
ATTACCATTTTTCTATTACTCTGACAGTCCATGTGAGTCTCATGGAAAACAAGTAGT

GTCAGATATAGATTATGTACCACTAAAGTCTGCTACGTGTATAACACGTTGCAATTT
AGGTGGTGCTGTCTGTAGACATCATGCTAATGAGTACAGATTGTATCTCGATGCTTA
TAACATGATGATCTCAGCTGGCTTTAGCTTGTGGGTTTACAAACAATTTGATACTTAT
AACCTCTGGAACACTTTTACAAGACTTCAGAGTTTAGAAAATGTGGCTTTTAATGTT
GTAAATAAGGGACACTTTGATGGACAACAGGGTGAAGTACCAGTTTCTATCATTAAT
AACACTGTTTACACAAAAGTTGATGGTGTGATGTAGAATTGTTTGAAAATAAAACA
ACATTACCTGTTAATGTAGCATTGAGCTTTGGGCTAAGCGCAACATTAAACCAGTA
CCAGAGGTGAAAATACTCAATAATTTGGGTGTGGACATTGCTGCTAATACTGTGATC
TGGGACTACAAAAGAGATGCTCCAGCACATATATCTACTATTGGTGTGTTCTATG
ACTGACATAGCCAAGAAACCAACTGAAACGATTTGTGCACCACTCACTGTCTTTTTT
GATGGTAGAGTTGATGGTCAAGTAGACTTATTTAGAAATGCCCGTAATGGTGTCTT
ATTACAGAAGGTAGTGTTAAAGTTTACAACCATCTGTAGGTCCCAAACAAGCTAGT
CTTAATGGAGTCACATTAATTGGAGAAGCCGTAAAAACACAGTTCAATTATTATAAG
AAAGTTGATGGTGTGTTGCCAACAATTACCTGAAACTTACTTTACTCAGAGTAGAAAT
TTACAAGAATTTAAACCCAGGAGTCAAATGGAAATTGATTTCTTAGAATTAGCTATG
GATGAATTCATTGAACGGTATAAATTAGAAGGCTATGCCTTCGAACATATCGTTTAT
GGAGATTTTAGTCATAGTCAGTTAGGTGGTTTACATCTACTGATTGGACTAGCTAAA
CGTTTTAAGGAATCACCTTTTGAATTAGAAGATTTTATTCCTATGGACAGTACAGTT
AAAAACTATTTCATAACAGATGCGCAAACAGGTTTCACTAAGTGTGTGTGTTCTGTT
ATTGATTTATTACTTGATGATTTTGTGAAATAATAAAATCCCAAGATTTATCTGTAG
TTTCTAAGGTTGTCAAAGTGAATGACTATTGACTATACAGAAATTTCAATTTATGCTTTGGTG
TAAAGATGGCCATGTAGAAACATTTTACCCAAAATTACAATCTAGTCAAGCGTGGC
AACCGGGTGTGCTATGCCTAATCTTTACAAAATGCAAAGAATGCTATTAGAAAAGT
GTGACCTTCAAATTATGGTGATAGTGCAACATTACCTAAAGGCATAATGATGAATG
TCGCAAATATACTCAACTGTGTCAATATTTAAACACATTAACATTAGCTGTACCCT
ATAATATGAGAGTTATACATTTTGGTGCTGGTTCTGATAAAGGAGTTGCACCAGGTA
CAGCTGTTTTAAGACAGTGGTTGCCTACGGGTACGCTGCTTGTGATTGAGATCTTA
ATGACTTTGTCTCTGATGCAGATTCAACTTTGATTGGTGTGATTGTGCAACTGTACATA
AGCTAATAAATGGGATCTCATTATTAGTGATATGTACGACCCTAAGACTAAAAATGT
TACAAAAGAAAATGACTCTAAAGAGGGTTTTTTCACTTACATTTGTGGGTTTATACA
ACAAAAGCTAGCTCTTGGAGGTTCCGTGGCTATAAAGATAACAGAACATTCTTGGA
ATGCTGATCTTTATAAGCTCATGGGACACTTCGCATGGTGGACAGCCTTTGTTACTA
ATGTGAATGCGTCATCATCTGAAGCATTTTTAATTGGATGTAATTATCTTGGCAAAC
CACGCGAACAAATAGATGGTTATGTCATGCATGCAAATTACATATTTTGGAGGAATA
CAAATCCAATTCAGTTGTCTTCCCTATTCTTTATTTGACATGAGTAAATTTCCCCTTAA
ATTAAGGGGTACTGCTGTTATGTCTTTAAAAGAAGGTCAAATCAATGATATGATTTT
ATCTCTTCTTAGTAAAGGTAGACTTATAATTAGAGAAAACAACAGAGTTGTTATTTT
TAGTGATGTTCTTGTTAACAATAAACAATGTTTGTGTTTTCTTGTTTTATTGCC
ACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAACCAGAACTCAATTACCCCTGCATA
CACTAATTCTTTCACACGTGGTGTGTTATTACCCTGACAAAGTTTTTCAGATCCTCAGTT

TTACATTCAACTCAGGACTTGTTCTTACCTTTCTTTTCCAATGTTACTTGGTTCATGC
TATACATGTCTCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTCCTACCATT
TAATGATGGTGTATTTTGGCTTCCACTGAGAAGTCTAACATAATAAGAGGCTGGAT
TTTTGGTACTACTTTAGATTCTGAAGACCCAGTCCCTACTTATTGTTAATAACGCTACT
AATGTTGTTATTAAGTCTGTGAATTTCAATTTTGTAAATGATCCATTTTGGGTGTTT
ATTACCACAAAAACAACAAAAGTTGGATGGAAAGTGAGTTCAGAGTTTATTCTAGT
GCGAATAATTGCACTTTTGAATATGTCTCTCAGCCTTTTCTTATGGACCTTGAAGGAA
AACAGGGTAATTTCAAAAATCTTAGGGAATTTGTGTTTAAGAATATTGATGGTTATT
TTAAAATATATTCTAAGCACACGCCTATTAATTTAGTGCCTGATCTCCCTCAGGGTTT
TTCGGCTTTAGAACCATTGGTAGATTTGCCAATAGGTATTAACATCACTAGGTTTCA
AACTTTACTTGCTTTACATAGAAGTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTTGG
ACAGCTGGTGCTGCAGCTTATTATGTGGGTTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAA
AATATAATGAAAATGGAACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCT
CAGAAACAAAGTGTACGTTGAAATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAAC
TCTAACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCTATTGTTAGATTTCTAATATTACAAAC
TTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTATGCTTGG
ACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCAT
CATTTTCCACTTTTAAGTGTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTT
TACTAATGTCTATGCAGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGC
TCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTAC
AGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAACTTGTATTCTAAGGTTGGTGGTAATTA
TAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAGATAT
TTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAAATGGTGTGGAAGGTTTTAA
TTGTTACTTTTCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGTTGGTTACCAA
CCATACAGAGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTG
GACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATG
GTTTAAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAAC
AATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAGACACTTG
AGATTCTTGACATTACACCATGTTCTTTTGGTGGTGTGAGTGTATAACACCAGGAA
CAAATACTTCTAACCAGGTTGCTGTTCTTTATCAGGATGTTAACTGCACAGAAGTCC
CTGTTGCTATTTCATGCAGATCAACTTACTCCTACTTGGCGTGTTTATTCTACAGGTTT
TAATGTTTTTCAAACACGTGCAGGCTGTTTAATAGGGGCTGAACATGTCAACAACCTC
ATATGAGTGTGACATACCCATTGGTGCAGGTATATGCGCTAGTTATCAGACTCAGAC
TAATTCTCCTCGGCGGGCACGTAGTGTAGCTAGTCAATCCATCATTGCCTACACTAT
GTCACTTGGTGCAGAAAATTCAGTTGCTTACTCTAATAACTCTATTGCCATACCCAC
AAATTTTACTATTAGTGTTACCACAGAAATTCTACCAGTGTCTATGACCAAGACATC
AGTAGATTGTACAATGTACATTTGTGGTGATTCAACTGAATGCAGCAATCTTTTGT
GCAATATGGCAGTTTTTGTACACAATTAACCGTGCTTTAACTGGAATAGCTGTTGA
ACAAGACAAAAACACCCAAGAAGTTTTTGCACAAGTCAAACAAATTTACAAAACAC
CACCAATTAAGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCACAAATATTACCAGATCCATCAA

AACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAAGATCTACTTTTCAACAAAGTGACACTTGCAG
ATGCTGGCTTCATCAAACAATATGGTGATTGCCTTGGTGATATTGCTGCTAGAGAiCT
CATTTGTGCACAAAAGTTTAAACGGCCTTACTGTTTTGCCACCTTTGCTCACAGATGA
AATGATTGCTCAATACACTTCTGCACTGTTAGCGGGTACAATCACTTCTGGTTGGAC
CTTTGGTGCAGGTGCTGCATTACAAATACCATTTGCTATGCAAATGGCTTATAGGTT
TAATGGTATTGGAGTTACACAGAATGTTCTCTATGAGAACCACAAAATTGATTGCCAA
CCAATTTAATAGTGCTATTGGCAAATTCAGACTCACTTTCTTCCACAGCAAGTGC
ACTTGAAAACCTTCAAGATGTGGTCAACCAAATGCACAAGCTTTAAACACGCTTGT
TAAACAACCTTAGCTCCAATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTTTTAAATGATATCCTTTCA
CGTCTTGACAAAGTTGAGGCTGAAGTGCAAATTTGATAGGTTGATCACAGGCAGACT
TCAAAGTTTGCAGACATATGTGACTCAACAATTAATTAGAGCTGCAGAAATCAGAG
CTTCTGCTAATCTTGCTGCTACTAAAATGTCAGAGTGTGTACTTGGACAATCAAAAA
GAGTTGATTTTTGTGGAAAGGGCTATCATCTTATGTCCTTCCCTCAGTCAGCACCTCA
TGGTGTAGTCTTCTTGCATGTGACTTATGTCCCTGCACAAGAAAAGAACTTCACAAC
TGCTCCTGCCATTTGTCATGATGGAAAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGTGTCTTTGTT
TCAAATGGCACACACTGGTTTGTAAACACAAAGGAATTTTTATGAACCACAAATCATT
ACTACAGACAACACATTTGTGTCTGGTAACTGTGATGTTGTAATAGGAATTGTCAAC
AACACAGTTTATGATCCTTTGCAACCTGAATTAGACTCATTCAAGGAGGAGTTAGAT
AAATATTTTAAAGAATCATAATCACCAGATGTTGATTTAGGTGACATCTCTGGCATT
AATGCTTCAGTTGTAAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAA
GAATTTAAATGAATCTCTCATCGATCTCCAAGAAGTGGAAAGTATGAGCAGTATAT
AAAATGGCCATGGTACATTTGGCTAGGTTTTATAGCTGGCTTGATTGCCATAGTAAT
GGTGACAATTATGCTTTGCTGTATGACCAGTTGCTGTAGTTGTCTCAAGGGCTGTTGT
TCTTGTGGATCCTGCTGCAAATTTGATGAAGACGACTCTGAGCCAGTGCTCAAAGGA
GTCAAATTACATTACACATAAACGAACCTTATGGATTTGTTTATGAGAATCTTCACAA
TTGGAACCTGTAACCTTTGAAGCAAGGTGAAATCAAGGATGCTACTCCTTCAGATTTTG
TTCGCGCTACTGCAACGATACCGATACAAGCCTCACTCCCTTTCGGATGGCTTATTG
TTGGCGTTGCACTTCTTGCTGTTTTTCAGAGCGCTTCCAAAATCATAACCCTCAAAAA
GAGATGGCAACTAGCACTCTCCAAGGGTGTTCACCTTGTGTTGCAACTTGCTGTTGTT
GTTTGTAACAGTTTACTCACACCTTTTGCTCGTTGCTGCTGGCCTTGAAGCCCCTTTT
CTCTATCTTTATGCTTTAGTCTACTTCTTGCAGAGTATAAACTTTGTAAGAATAATAA
TGAGGCTTTGGCTTTGCTGGAAATGCCGTTCCAAAAACCCATTACTTTATGATGCCA
ACTATTTTCTTTGCTGGCATACTAATTGTTACGACTATTGTATACCTTACAATAGTGT
AACTTCTTCAATTGTCATTACTTCAGGTGATGGCACAACAAGTCCTATTTCTGAACAT
GACTACCAGATTGGTGGTTATACTGAAAAATGGGAATCTGGAGTAAAAGACTGTGT
TGTATTACACAGTTACTTCACTTCAGACTATTACCAGCTGTACTCAACTCAATTGAGT
ACAGACACTGGTGTGTAACATGTTACCTTCTTATCTACAATAAAAATTGTTGATGAG
CCTGAAGAACATGTCCAAATTCACACAATCGACGGTTCATCCGGAGTTGTTAATCCA
GTAATGGAACCAATTTATGATGAACCGACGACGACTACTAGCGTGCCTTTGTAAGCA
CAAGCTGATGAGTACGAACCTTATGTACTCATTTCGTTTCGGAAGAGACAGGTACGTTA

ATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTTCGTGGTATTCTTGCTAGTTACACTAG
CCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTTAACGTGAGTCT
TGTA AAAACCTTCTTTTTACGTTTACTCTCGTGTTAAAAATCTGAATTCTTCTAGAGTT
CCTGATCTTCTGGTCTAAACGAACTAAATATTATATTAGTTTTTCTGTTTGGAACCTT
AATTTTAGCCATGGCAGATTCCAACGGTACTATTACCGTTGAAGAGCTTAAAAAGCT
CCTTGAACAATGGAACCTAGTAATAGGTTTTCTATTCTTACATGGATTTGTCTTCTA
CAATTTGCCTATGCCAACAGGAATAGGTTTTTGTATATAATTAAGTTAATTTTCTCT
GGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAA
TTGGATCACCGGTGGAATTGCTATCGCAATGGCTTGCTTGTAGGCTTGATGTGGCT
CAGCTACTTCATTGCTTCTTTCAGACTGTTTGC GCGTACGCGTTCATGTGGTCATTC
AATCCAGAACTAACATTCTTCTCAACGTGCCACTCCATGGCACTATTCTGACCAGA
CCGCTTCTAGAAAGTGAACCTCGTAATCGGAGCTGTGATCCTTCGTGGACATCTTCGT
ATTGCTGGACACCATCTAGGACGCTGTGACATCAAGGACCTGCCTAAAGAAATCAC
TGTTGCTACATCACGAACGCTTCTTATTACAAATTGGGAGCTTCGCAGCGTGTAGC
AGGTGACTCAGGTTTTGCTGCATACAGTCGCTACAGGATTGGCAACTATAAATTA
CACAGACCATTCCAGTAGCAGTGACAATATTGCTTTGCTTGTACAGTAAGTGACAAC
AGATGTTTCATCTCGTTGACTTTCAGGTTACTATAGCAGAGATATTACTAATTATTAT
GAGGACTTTTAAAGTTTCCATTTGGAATCTTGATTACATCATAAACCTCATAATTAA
AAATTTATCTAAGTCACTAACTGAGAATAAATATTCTCAATTAGATGAAGAGCAACC
AATGGAGATTGATTAACGAACATGAAAATTATTCTTTTTCTTGGCACTGATAACACT
CGCTACTTGTGAGCTTTATCACTACCAAGAGTGTGTTAGAGGTACAACAGTACTTTT
AAAAGAACCTTGCTCTTCTGGAACATACGAGGGCAATTCACCATTTTCATCCTCTAGC
TGATAACAAATTTGCACTGACTTGCTTTAGCACTCAATTTGCTTTTGTCTGTCCTGAC
GGCGTAAAACACGTCTATCAGTTACGTGCCAGATCAGTTTCACCTAAACTGTTTCATC
AGACAAGAGGAAGTTCAAGAACTTTACTCTCCAATTTTTCTTATTGTTGCGGCAATA
GTGTTTATAACACTTTGCTTCACACTCAAAGAAAGACAGAATGATTGAACTTTCAT
TAATTGACTTCTATTTGTGCTTTTTAGCCTTCTGCTATTCCTTGTTTTAATTATGCTT
ATTATCTTTTGGTTCTCACTTGAAGATCATAATGAACTTGTACACGCCTAA
ACGAACATGAAATTTCTTGTTTTCTTAGGAATCATCACA ACTGTAGCTGCATTTACC
AAGAATGTAGTTTACAGTCATGTACTCAACATCAACCATATGTAGTTGATGACCCGT
GTCCTATTCACTTCTATTCTAAATGGTATATTAGAGTAGGAGCTAGAAAATCAGCAC
CTTTAATTGAATTGTGCGTGGATGAGGCTGGTTCTAAATCACCCATTCAGTACATCG
ATATCGGTAATTATACAGTTTCTGTTTACCTTTTACAATTAATTGCCAGGAACCTAA
ATTGGGTAGTCTTGTAGTGC GTTGTTCGTTCTATGAAGACTTTTTAGAGTATCATGAC
GTTTCGTGTTGTTTTAGATTTTCATCTAAACGAACAACTAAAATGTCTGATAATGGAC
CCAAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCCTCAGATTCAACTG
GCAGTAACCAGAATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAACAACGTCGGCCCCA
AGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGA
AGACCTTAAATTCCTCGAGGACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCAG
ATGACCAAATTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGT

AAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGA
 AGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGG
 GAGCCTTGAATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAAATGCT
 GCAATCGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGA
 AGGGAGCAGAGGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCTCATCACGTAGTCGCAACA
 GTTCAAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGGAACTTCTCCTGCTAGAATGGCT
 GGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTT
 GAGAGCAAAATGTCTGGTAAAGGCCAACAAACAAGGCCAAACTGTCACTAAGA
 AATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAACGTA CTGCCACTAAAGCA
 TACAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCCAGAACAACCCAAGGAAATTT
 TGGGGACCAGGAACTAATCAGACAAGGAACTGATTACAAACATTGGCCGCAAATTG
 CACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCCTTCGGAATGTCGCGCATTGGCATGGAAG
 TCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTGGATGACAAA
 GATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATATTGACGCATACAAA
 ACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAAGAAGGCTGATGAAACTC
 AAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAACCTGTGACTCTTCTCCTGCTGCA
 GATTTGGATGATTTCTCAAACAATTGCAACAATCCATGAGCAGTGCTGACTCAACT
 CAGGCCTAAACTCATGCAGACCACACAAGGCAGATGGGCTATATAAACGTTTTTCGC
 TTTTCCGTTTACGATATATAGTCTACTCTTGTGCAGAATGAATTCTCGTAACTACATA
 GCACAAGTAGATGTAGTTAACTTTAATCTCACATAGCAATCTTTAATCAGTGTGTAA
 CATTAGGGAGGACTTGAAAGAGCCACCACATTTTCACCGAGGCCACGCGGAGTACG
 ATCGAGTGTACAGTGAACAATGCTAGGGAGAGCTGCCTATATGGAAGAGCCCTAAT
 GTGTAATAATTAATTTAGTAGTGTATCCCCATGTGATTTTAATAGCTTCTTAGGAGA
 ATGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

[00239] SEQ ID NO:3 - деоптимизированный коронавирус SARS-CoV-2 (Wuhan-CoV_101K) (деоптимизированный в отношении BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019). области деоптимизированы: 11294-12709, 14641-15903 (домен nsp12 (например, РНК-зависимая РНК-полимераза «RdRP»)), 21656-22306 (начало шиповидного белка), 22505-23905 (середина шиповидного белка), 24110-25381 (конец шиповидного белка).

[00240]

ATTAAAGGTTTATACCTTCCCAGGTAACAAACCAACCAACTTTCGATCTCTTGTAGA
 TCTGTTCTCTAAACGAACTTTAAAATCTGTGTGGCTGTCACTCGGCTGCATGCTTAGT
 GCACTCACGCAGTATAATTAATAACTAATTA CTGTCGTTGACAGGACACGAGTAACT
 CGTCTATCTTCTGCAGGCTGCTTACGGTTTCGTCCGTGTTGCAGCCGATCATCAGCAC
 ATCTAGGTTTTCGTCCGGGTGTGACCGAAAGGTAAGATGGAGAGCCTTGTCCCTGGTT
 TCAACGAGAAAACACACGTCCAACCTCAGTTTGCCTGTTTTACAGGTTTCGCGACGTGC
 TCGTACGTGGCTTTGGAGACTCCGTGGAGGAGGTCTTATCAGAGGCACGTCAACATC
 TTAAGATGGCACTTGTGGCTTAGTAGAAGTTGAAAAAGGCGTTTTGCCTCAACTTG
 AACAGCCCTATGTGTTTCATCAAACGTTTCGGATGCTCGAACTGCACCTCATGGTCATG
 TTATGGTTGAGCTGGTAGCAGAACTCGAAGGCATT CAGTACGGTCGTAGTGGTGAG

ACACTTGGTGTCCCTTGTCCCTCATGTGGGCGAAATACCAGTGGCTTACCGCAAGGTT
CTTCTTCGTAAGAACGGTAATAAAGGAGCTGGTGGCCATAGTTACGGCGCCGATCTA
AAGTCATTTGACTTAGGGCGACGAGCTTGGCACTGATCCTTATGAAGATTTTCAAGAA
AACTGGAACACTAAACATAGCAGTGGTGTACCCGTGAACTCATGCGTGAGCTTAA
CGGAGGGGCATACACTCGCTATGTTCGATAACAACCTTCTGTGGCCCTGATGGCTACCC
TCTTGAGTGCATTAAAGACCTTCTAGCACGTGCTGGTAAAGCTTCATGCACTTTGTC
CGAACAACCTGGACTTTATTGACACTAAGAGGGGTGTATACTGCTGCCGTGAACATG
AGCATGAAATTGCTTGGTACACGGAACGTTCTGAAAAGAGCTATGAATTGCAGACA
CCTTTTGAAATTAATTGGCAAAGAAATTTGACACCTTCAATGGGGAATGTCCAAAT
TTTGTATTTCCCTTAAATTCCATAATCAAGACTATTCAACCAAGGGTTGAAAAGAAA
AAGCTTGATGGCTTTATGGGTAGAATTCGATCTGTCTATCCAGTTGCGTCACCAAAT
GAATGCAACCAAATGTGCCTTTCAACTCTCATGAAGTGTGATCATTGTGGTGAACT
TCATGGCAGACGGGCGATTTTGTAAAGCCACTTGCGAATTTTGTGGCACTGAGAAT
TTGACTAAAGAAGGTGCCACTACTTGTGGTACTTACCCCAAATGCTGTTGTTAAA
ATTTATTGTCCAGCATGTCACAATTCAGAAGTAGGACCTGAGCATAGTCTTGCCGAA
TACCATAATGAATCTGGCTTGAAAACCATTCTTCGTAAGGGTGGTCGCACTATTGCC
TTTGGAGGCTGTGTGTTCTTATGTTGGTTGCCATAACAAGTGTGCCTATTGGGTTCC
CACGTGCTAGCGCTAACATAGGTTGTAACCATACAGGTGTTGTTGGAGAAGGTTCCG
AAGGTCTTAATGACAACCTTCTTGAAATACTCCAAAAAGAGAAAGTCAACATCAAT
ATTGTTGGTGACTTTAAACTTAATGAAGAGATCGCCATTATTTTGGCATCTTTTTCTG
CTTCCACAAGTGCTTTTGTGGAACTGTGAAAGGTTTGGATTATAAAGCATTCAAAC
AAATTGTTGAATCCTGTGGTAATTTTAAAGTTACAAAAGGAAAAGCTAAAAAAGGT
GCCTGGAATATTGGTGAACAGAAATCAATACTGAGTCCTCTTTATGCATTTGCATCA
GAGGCTGCTCGTGTTGTACGATCAATTTTCTCCCGCACTCTTGAAACTGCTCAAATTT
CTGTGCGTGTTTTACAGAAGGCCGCTATAACAATACTAGATGGAATTTACAGTATT
CACTGAGACTCATTGATGCTATGATGTTACATCTGATTTGGCTACTAACAATCTAG
TTGTAATGGCCTACATTACAGGTGGTGTGTTTCAAGTACTTCGCAGTGGCTAACTA
ACATCTTTGGCACTGTTTATGAAAACTCAAACCCGTCCTTGATTGGCTTGAAGAGA
AGTTTAAGGAAGGTGTAGAGTTTCTTAGAGATGGTTGGGAAATTGTTAAATTTATCT
CAACCTGTGCTTGTGAAATTGTCGGTGGACAAATTGTCACCTGTGCAAAGGAAATTA
AGGAGAGTGTTTACAGACATTCTTTAAGCTTGTAATAAATTTTGGCTTTGTGTGCTG
ACTCTATCATTATTGGTGGAGCTAACTTAAAGCCTTGAATTTAGGTGAAACATTTG
TCACGCACTCAAAGGGATTGTACAGAAAGTGTGTTAAATCCAGAGAAGAACTGGC
CTACTCATGCCTCTAAAAGCCCCAAAAGAAATTATCTTCTTAGAGGGAGAAACACTT
CCCACAGAAGTGTTAACAGAGGAAGTTGTCTTGAAAAGTGGTGAATTTACAACCATTA
GAACAACCTACTAGTGAAGCTGTTGAAGCTCCATTGGTTGGTACACCAGTTTGTATT
AACGGGCTTATGTTGCTCGAAATCAAAGACACAGAAAAGTACTGTGCCCTTGCACCT
AATATGATGGTAACAAACAATACCTTCACTCAAAGGCGGTGCACCAACAAAGGT
TACTTTTGGTGATGACTGTGATAGAAGTGCAAGGTTACAAGAGTGTGAATATCAC
TTTTGAACTTGATGAAAGGATTGATAAAGTACTTAATGAGAAGTGCTCTGCCTATAC

AGTTGAACTCGGTACAGAAGTAAATGAGTTCGCCTGTGTTGTGGCAGATGCTGTCAT
AAAAACTTTGCAACCAGTATCTGAATTACTIONTACACCACTGGGCATTGATTTAGATGA
GTGGAGTATGGCTACATACTACTTATTTGATGAGTCTGGTGAGTTTAAATTGGCTTC
ACATATGTATTGTTCTTTCTACCCTCCAGATGAGGATGAAGAAGAAGGTGATTGTGA
AGAAGAAGAGTTTGAGCCATCAACTCAATATGAGTATGGTACTGAAGATGATTACC
AAGGTAAACCTTTGGAATTTGGTGCCACTTCTGCTGCTCTTCAACCTGAAGAAGAGC
AAGAAGAAGATTGGTTAGATGATGATAGTCAACAAACTGTTGGTCAACAAGACGGC
AGTGAGGACAATCAGACACTIONTATTCAAACAATTGTTGAGGTTCAACCTCAATTA
GAGATGGACTIONTACACCAGTTGTTCCAGACTATTGAAGTGAATAGTTTTAGTGGTTAT
TTAAACTIONTACTGACAATGTATACATTAAAAATGCAGACATTGTGGAAGAAGCTAA
AAAGGTAAAACCAACAGTGGTTGTTAATGCAGCCAATGTTTACCTTAAACATGGAG
GAGGTGTTGCAGGAGCCTTAAATAAGGCTACTAACAATGCCATGCAAGTTGAATCT
GATGATTACATAGCTACTAATGGACCACTIONTAAAGTGGGTGGTAGTTGTGTTTTAAGC
GGACACAATCTTGCTAAACTIONTGTCTTCATGTTGTTCGGCCCAAATGTTAACAAAGGT
GAAGACATTCAACTIONTCTTAAGAGTGCTTATGAAAATTTAATCAGCACGAAGTTCTA
CTTGCACCATTATTATCAGCTGGTATTTTTGGTGCTGACCCTATACATTCTTTAAGAG
TTTGTGTAGATACTIONTGTTCGCACAAATGTCTACTIONTAGCTGTCTTTGATAAAAATCTCTA
TGACAACTIONTGTTTCAAGCTTTTTGGAAATGAAGAGTGAAAAGCAAGTTGAACAAA
AGATCGCTGAGATTCCTAAAGAGGAAGTTAAGCCATTTATAACTIONTGAAGTAAACCT
TCAGTTGAACAGAGAAAACAAGATGATAAGAAAATCAAAGCTTGTGTTGAAGAAGT
TACAACACTIONCTGGAAGAACTIONTAAAGTTCCTCACAGAAACTIONTGTTACTIONTTATATTGA
CATTAAATGGCAATCTTCATCCAGATTCTGCCACTIONCTTGTTAGTGACATTGACATCACTION
TTCTTAAAGAAAGATGCTCCATATATAGTGGGTGATGTTGTTCAAGAGGGGTGTTTTA
ACTIONTGTGTTATACCTIONTACTAAAAAGGCTGGTGGCACTIONTACTGAAATGCTAGCGAA
AGCTTTGAGAAAAGTGCCAACAGACAATTATATAACTIONTACCCTIONTACCCGGGTGAGGGTTT
AAATGGTTACTIONTGTAGAGGAGGCAAAGACAGTGCTTAAAAAGTGTAAAAGTGCCT
TTTACATTCTACCATIONTCTATTATCTCTAATGAGAAGCAAGAAATTCTTGGACTIONTGTTT
TTGGAATTTGCGAGAAATGCTTGCACATGCAGAAGAAACACGCAAATTAATGCCTG
TCTGTGTGGAACTIONTAAAGCCATAGTTTCACTIONTATACAGCGTAAATATAAGGGTATTA
AAATACAAGAGGGTGTGGTTGATTATGGTGCTAGATTTTACTIONTTTACACCAGTAAAA
CACTIONTGTAGCGTCACTIONTATCAACACACTIONTAAACGATCTAAATGAACTIONCTTGTTACAA
TGCCACTIONTGGCTATGTAACACATGGCTTAAATTTGGAAGAAGCTGCTCGGTATATGA
GATCTCTCAAAGTGCCAGCTACAGTTTCTGTTTCTTCCACTIONTGATGCTGTTACAGCGTA
TAATGGTTATCTTACTIONTCTTCTTCTTCTAAAACACTIONTGAAGAACATTTTATTGAAACCATION
TCACTIONTGCTGGTTCCATAAAAGATTGGTCCATIONTCTGGACTIONTCTACACACTIONTAGGT
ATAGAATTTCTTAAAGAGAGGTGATAAAAGTGTATATTACACTIONTAGTAATCCCTIONTACCACA
TTCCACTIONTAGATGGTGAAGTTATCACCTTTGACACTIONTCTTAAAGACACTIONTCTTTCTTTGA
GAGAAGTGAGGACTIONTATTAAGGTGTTTACAACAGTAGACAACATIONTAACTIONTCCACACG
CAAGTTGTGGACATGTCAATGACATATGGACAACAGTTTGGTCCACTIONTATTTGGAT
GGAGCTGATGTTACTIONTAAAATAAAACTIONTCCATAATTCACTIONTGAAGGTAAAACATIONTTAT

GTTTTACCTAATGATGACTCTACGTGTTGAGGCTTTTGAGTACTACCAACA
GATCCTAGTTTTCTGGGTAGGTACATGTCAGCATTAAATCACACTAAAAAGTGGAAA
TACCCACAAGTTAATGGTTAACTTCTATTAATGGGCAGATAACAACCTGTTATCTT
GCCACTGCATTGTTAACACTCCAACAAATAGAGTTGAAGTTAATCCACCTGCTCTA
CAAGATGCTTATTACAGAGCAAGGGCTGGTGAAGCTGCTAACTTTTGTGCACTTATC
TTAGCCTACTGTAATAAGACAGTAGGTGAGTTAGGTGATGTTAGAGAAACAATGAG
TTACTTGTTCACATGCCAATTTAGATTCTTGCAAAAGAGTCTTGAACGTGGTGTGT
AAAACCTGTGGACAACAGCAGACAACCCTTAAGGGTGTAGAAGCTGTTATGTACAT
GGGCACACTTTCTTATGAACAATTTAAGAAAGGTGTTTACAGATACCTTGTACGTGTGG
TAAACAAGCTACAAAATATCTAGTACAACAGGAGTCACCTTTTGTATGATGTCAGC
ACCACCTGCTCAGTATGAACTTAAGCATGGTACATTTACTTGTGCTAGTGAGTACAC
TGGTAATTACCAGTGTGGTCACTATAAACATATAACTTCTAAAGAACTTTGTATTG
CATAGACGGTGCTTTACTTACAAAGTCCTCAGAATACAAAGGTCCTATTACGGATGT
TTTCTACAAAGAAAACAGTTACACAACAACCATAAAACCAGTTACTTATAAATTGG
ATGGTGTGTTTGTACAGAAATTGACCCTAAGTTGGACAATTATTATAAGAAAGACA
ATTCTTATTTACAGAGCAACCAATTGATCTTGTACCAAACCAACCATATCCAAACG
CAAGCTTCGATAATTTTAAGTTTGTATGTGATAATATCAAATTTGCTGATGATTTAAA
CCAGTTAACTGGTTATAAGAAACCTGCTTCAAGAGAGCTTAAAGTTACATTTTTCCC
TGACTTAAATGGTGATGTGGTGGCTATTGATTATAAACACTACACACCCTCTTTTAA
GAAAGGAGCTAAATTGTTACATAAACCTATTGTTTGGCATGTTAACAATGCAACTAA
TAAAGCCACGTATAAACCAAATACCTGGTGTATACGTTGTCTTTGGAGCACAAAACC
AGTTGAAACATCAAATTCGTTTGTACTGAAGTCAGAGGACGCGCAGGGAATGG
ATAATCTTGCCTGCGAAGATCTAAAACCAGTCTCTGAAGAAGTAGTGGAATCCT
ACCATACAGAAAGACGTTCTTGAGTGTAATGTGAAAACCTACCGAAGTTGTAGGAGA
CATTATACTTAAACCAGCAAATAATAGTTTAAAAATTACAGAAGAGGTTGGCCACA
CAGATCTAATGGCTGCTTATGTAGACAATTCTAGTCTTACTATTAAGAAACCTAATG
AATTATCTAGAGTATTAGGTTTGAACCCCTTGTACTCATGGTTTAGCTGCTGTTAA
TAGTGTCCCTTGGGATACTATAGCTAATTATGCTAAGCCTTTTCTTAAACAAGTTGTT
AGTACAACACTAACATAGTTACACGGTGTTTAAACCGTGTTTGTACTAATTATATG
CCTTATTTCTTTACTTTATTGCTACAATTGTGTACTTTTACTAGAAGTACAAATTCTA
GAATTAAGCATCTATGCCGACTACTATAGCAAAGAATACTGTTAAGAGTGTCCGT
AAATTTTGTCTAGAGGCTTCATTTAATTATTTGAAGTCACCTAATTTTTCTAAACTGA
TAAATATTATAATTTGGTTTTTACTATTAAGTGTTTGCCTAGGTTCTTTAATCTACTC
AACCGCTGCTTTAGGTGTTTTAATGTCTAATTTAGGCATGCCTTCTTACTGTACTGGT
TACAGAGAAGGCTATTTGAACTCTACTAATGTCACTATTGCAACCTACTGTACTGGT
TCTATACCTTGTAGTGTGTGTCTTAGTGGTTTAGATTCTTTAGACACCTATCCTTCTTT
AGAACTATAACAATTACCATTTTCATCTTTTAAATGGGATTTAACTGCTTTTGGCTTA
GTTGCAGAGTGGTTTTTGGCATATATTCTTTTCACTAGGTTTTTCTATGTAATTGGAT
TGGCTGCAATCATGCAATTGTTTTTTCAGCTATTTTGCAGTACATTTTATTAGTAATTC
TTGGCTTATGTGGTTAATAATTAATCTTGTACAAATGGCCCCGATTTTCAGCTATGGTT

AGAATGTACATCTTCTTTGCATCATTTTATTATGTATGGAAAAGTTATGTGCATGTTG
TAGACGGTTGTAATTCATCAACTTGTATGATGTGTTACAAACGTAATAGAGCAACAA
GAGTCGAATGTACAACCTATTGTTAATGGTGTTAGAAGGTCCTTTTATGTCTATGCTA
ATGGAGGTAAAGGCTTTTGCAAACCTACACAATTGGAATTGTGTTAATTGTGATACAT
TCTGTGCTGGTAGTACATTTATTAGTGATGAAGTTGCGAGAGACTTGTCACTACAGT
TTAAAAGACCAATAAATCCTACTGACCAGTCTTCTTACATCGTTGATAGTGTTACAG
TGAAGAATGGTTCATCCATCTTTACTTTGATAAAGCTGGTCAAAGACTTATGAAA
GACATTCTCTCTCATTTTGTAACTTAGACAACCTGAGAGCTAATAACACTAAAG
GTTCAATTGCCTATTAATGTTATAGTTTTTGTATGGTAAATCAAATGTGAAGAATCAT
CTGCAAATCAGCGTCTGTTTACTACAGTCAGCTTATGTGTCAACCTATACTGTTACT
AGATCAGGCATTAGTGCTGATGTTGGTGATAGTGCGGAAGTTGCAGTTAAAATGTT
TGATGCTTACGTTAATACGTTTTTCATCAACTTTAACGTACCAATGGAAAACTCAA
AACACTAGTTGCAACTGCAGAAGCTGAACTTGCAAAGAATGTGTCCTTAGACAATG
TCTTATCTACTTTTATTTTTCAGCAGCTCGGCAAGGGTTTGTGATTCAGATGTAGAAAC
TAAAGATGTTGTTGAATGTCTTAAATTGTCACATCAATCTGACATAGAAGTTACTGG
CGATAGTTGTAATAACTATATGCTCACCTATAACAAAGTTGAAAACATGACACCCCG
TGACCTTGGTGCTTGTATTGACTGTAGTGCGCGTCATATTAATGCGCAGGTAGCAAA
AAGTCACAACATTGCTTTGATATGGAACGTTAAAGATTTTCATGTCATTGTCTGAACA
ACTACGAAAACAATACTAGTAGTGCTGCTAAAAAGAATAACTTACCTTTTAAAGTTGAC
ATGTGCAACTACTAGACAAGTTGTTAATGTTGTAACAACAAGATAGCACTTAAGG
GTGGTAAAATTGTTAATAATTGGTTGAAGCAGTTAATTAAGTTACACTTGTGTTCC
TTTTTGTGCTGCTATTTTCTATTTAATAACACCTGTTTCATGTCATGTCTAAACATACT
GACTTTTCAAGTGAAATCATAGGATACAAGGCTATTGATGGTGGTGTCACTCGTGAC
ATAGCATCTACAGATACTTGTTTTGCTAACAACATGCTGATTTTGACACATGGTTT
AGCCAGCGTGGTGGTAGTTATACTAATGACAAAGCTTGCCCATTGATTGCTGCAGTC
ATAACAAGAGAAGTGGGTTTTGTCGTGCCTGGTTTTGCCTGGCACGATATTACGCACA
ACTAATGGTGACTTTTTGCATTTCTTACCTAGAGTTTTTGTAGTGCAGTTGGTAACATCT
GTTACACACCATCAAACTTATAGAGTACACTGACTTTGCAACATCAGCTTGTGTTT
TGGCTGCTGAATGTACAATTTTTAAAGATGCTTCTGGTAAGCCAGTACCATATTGTT
ATGATACCAATGTACTAGAAGGTTCTGTTGCTTATGAAAGTTTACGCCCTGACACAC
GTTATGTGCTCATGGATGGCTCTATTATTCAATTTCTAACACCTACCTTGAAGGTTT
TGTTAGAGTGGTAACAACCTTTGATTCTGAGTACTGTAGGCACGGCACTTGTGAAAG
ATCAGAAGCTGGTGTGTTGTGTATCTACTAGTGGTAGATGGGTACTTAACAATGATTA
TTACAGATCTTTACCAGGAGTTTTCTGTGGTGTAGATGCTGTAAATTTACTTACTAAT
ATGTTTACACCACTAATTCAACCTATTGGTGCTTTGGACATATCAGCATCTATAGTA
GCTGGTGGTATTGTAGCTATCGTAGTAACATGCCTTGCCTACTATTTTATGAGGTTTA
GAAGAGCTTTTGGTGAATACAGTCATGTAGTTGCCTTTAATACTTTACTATTCCTTAT
GTCATTCACTGTACTCTGTTTAAACACCAGTTTACTCATTCTTACCTGGTGTGTTATTCTG
TTATTTACTTGTACTTGACATTTTATCTTACTAATGATGTTTCTTTTTTAGCACATATT
CAGTGGATGGTTATGTTTACACCTTTAGTACCTTTCTGGATAACAATTGCTTATATCA

TTTGTATTTCCACAAAGCATTCTATTGGTTCTTTAGTAATTACCTAAAGAGGCGTGT
 AGTCTTTAATGGTGTTCCTTTAGTACTTTTGAAGAAGCTGCGCTGTGCACCTTTTTG
 TTAAATAAAGAAATGTATCTAAAGTTGCGTAGTGATGTGCTATTACCTCTTACGCAA
 TATAATAGATACTTAGCTCTTTATAATAAGTACAAGTATTTTAGTGGAGCAATGGAT
 ACAACTAGCTACAGAGAAGCTGCTTGTGTGCATCTCGCAAAGGCTCTCAATGACTTC
 AGTAACTCAGGTTCTGATGTTCTTTACCAACCACCACAAACCTCTATCACCTCAGCT
 GTTTTGCAGAGTGGTTTTAGAAAAATGGCATTCCCATCTGGTAAAGTTGAGGGTGT
 ATGGTACAAGTAACTTGTGGTACAACCTAACGTTCTTTGGCTTGATGACGTA
 GTTTACTGTCCAAGACATGTGATCTGCACCTCTGAAGACATGCTTAACCCTAATTAT
 GAAGATTTACTCATTTCGTAAGTCTAATCATAATTTCTTGGTACAGGCTGGTAATGTTT
 AACTCAGGGTTATTGGACATTCTATGCAAATTTGTGTACTTAAGCTTAAGGTTGATA
 CAGCCAATCCTAAGACACCTAAGTATAAGTTTGTTCGCATTCAACCAGGACAGACTT
 TTTCAGTGTAGCTTGTACAATGGTTCACCATCTGGTGTTTACCAATGTGCTATGAG
 GCCAATTTCACTATTAAGGGTTCATTCCTTAATGGTTCATGTGGTAGTGTGGTTTT
 AACATAGATTATGACTGTGTCTCTTTTTGTTACATGCACCATATGGAATTACCACTG
 GAGTTCATGCTGGCACAGACTTAGAAGGTAACTTTTATGGACCTTTTGTGACAGGC
 AAACAGCACAAGCAGCTGGTACGGACACAACCTATTACAGTTAATGTTTTAGCTTGGT
 TGTACGCTGCTGTTATAAATGGAGACAGGTGGTTTTCTCAATCGATTTACCACAACCTC
 TTAATGACTTTAACCTTGTGGCTATGAAGTACAATTATGAACCTCTAACACAAGACC
 ATGTTGACATACTAGGACCTCTTTCTGCTCAAACCTGGAATTGCCGTTTTAGATATGTG
 TGCTTCATTAAGAAGATTACTGCAAATGGTATGAATGGACGTACCATATTGGGTAG
 TGCTTTATTAGAAGATGAATTTACACCTTTTGATGTTGTTAGACAATGCTCAGGTGTT
 ACTTTCCAAAGTGCAGTGAAAAGAACAATCAAGGGTACACACCACTGGTTGTTACT
 CACAATTTGACTTCACTTTTAGTTTTAGTCCAGAGTACTCAATGGTCTTTGTTCTTTT
 TTTTGTATGAAAATGCCTTTTTACCTTTTGCTATGGGTATTATTGCTATGTCTGCTTTT
 GCAATGATGTTTGTCAAACATAAGCATGCATTTCTCTGTTTGTGTTTTGTTACCTTCTC
 TTGCCACTGTAGCTTATTTAATATGGTCTATATGCCTGCTAGTTGGGTGATGCGTAT
 TATGACATGGTTGGATATGGTTGATACTAGTTTGTCTGGTTTTAACTTAAGGATTGT
 GTTATGTACGCTAGTGCCGTTGTGTTATTGATTCTTATGACTGCTAGAACAGTTTATG
 ACGACGGAGCTAGACGCGTTTGGACACTTATGAACGTACTIONTACACTCGTATATAAGG
 TATATTATGGTAACGCACTCGATCAGGCTATATCTATGTGGGCATTGATTATATCCG
 TTACGTCTAATTATTCAGGCGTAGTACTACAGTTATGTTTCTCGCTAGAGGTATCGT
 TTTTATGTGTGTTGAGTATTGTCCTATATTTTTATAACCGGAATACATTGCAATGT
 ATTATGTTAGTTTATTGTTTTCTCGGTTATTTTTGTACATGTTATTTCCGGTCTATTTT
 TTTGCTTAATAGGTATTTTAGATTGACATTAGGCGTATACGATTATCTCGTTAGTACA
 CAGGAATTTAGATATATGAATTCACAGGGTCTATTGCCTCCTAAAACTCAATCGAC
 GCATTCAAACCTAATATTAAGCTATTAGGCGTAGGTGGTAAGCCTTGTATTAAGTC
 GCTACAGTGCAATCTAAAATGTCTGACGTTAAGTGTACATCAGTCGTTCTGTTATCA
 GTGTTACAGCAATTGAGAGTCGAATCTAGTTCTAAGTTATGGGCTCAATGCGTTCAA
 TTGCACAACGATATACTGTTAGCTAAGGATACTACTGAGGCATTCGAAAAAATGGTT

AGTCTATTATCAGTATTGCTATCTATGCAGGGTGCAGTCGATATTAATAAGTTATGC
GAAGAGATGCTCGATAATAGGGCTACATTGCAGGCAATCGCTAGCGAATTTTCATC
ACTACCATCTTATGCCGCATTCGCAACTGCTCAGGAAGCATAACGAACAAGCCGTAGC
TAACGGTGATTTCAGAGGTTGTGCTTAAAAAACTTAAAAAATCACTTAACGTTGCTAA
ATCCGAATTCGATAGGGACGCCGCTATGCAACGTAAACTCGAAAAAATGGCCGATC
AGGCTATGACACAAATGTATAAACAGGCTAGATCCGAAGATAAGAGAGCTAAGGTT
ACTAGTGCAATGCAAACCTATGCTTTTTACTATGTTGCGTAAACTCGATAACGACGCA
CTTAATAATATTATTAATAACGCTAGGGACGGTTGTGTACCACTTAACATTATACCA
CTTACTACTGCCGCTAAACTTATGGTTCGTTATACCCGATTATAATACTTATAAAAAAT
ACATGTGACGGTACTACTTTTACATACGCTAGTGCATTATGGGAGATACAACAGGTA
GTCGATGCCGATTCTAAAATCGTTCAATTGTCAGAGATATCTATGGATAATTCACCT
AATCTCGCATGGCCTCTTATCGTTACCGCACTTAGAGCTAATTCTGCCGTTAAGTTAC
AGAATAACGAATTGTCACCCGTTGCCCTACGACAGATGTCTTGTGCTGCCGGTACTA
CACAACTGCTTGCACTGATGACAATGCGTTAGCTTACTACAACACAACAAAGGGA
GGTAGGTTTGTACTTGCCTGTTATCCGATTTACAGGATTTGAAATGGGCTAGATTC
CCTAAGAGTGATGGAACCTGGTACTATCTATACAGAACTGGAACCACCTTGTAGGTTT
GTTACAGACACACCTAAAGGTCCTAAAGTGAAGTATTTATACTTTATTAAGGATTA
AACAACTAAATAGAGGTATGGTACTTGGTAGTTTAGCTGCCACAGTACGTCTACAA
GCTGGTAATGCAACAGAAGTGCCTGCCAATTCAACTGTATTATCTTTCTGTGCTTTTG
CTGTAGATGCTGCTAAAGCTTACAAAGATTATCTAGCTAGTGGGGGACAACCAATC
ACTAATTGTGTTAAGATGTTGTGTACACACACTGGTACTGGTCAGGCAATAACAGTT
ACACCGGAAGCCAATATGGATCAAGAATCCTTTGGTGGTGCATCGTGTTGTCTGTAC
TGCCGTTGCCACATAGATCATCCAAATCCTAAAGGATTTTGTGACTTAAAAGGTAAG
TATGTACAAATACCTACAACCTTGTGCTAATGACCCTGTGGGTTTTACTTAAAAAC
ACAGTCTGTACCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGGCTGTAGTTGTGATCAACTC
CGCGAACCCATGCTTCAGTCAGCTGATGCACAATCGTTTTTAAACGGGTTTGCGGTG
TAAGTGCAGCCCGTCTTACACCGTGCGGCACAGGCACTAGTACTGATGTCGTATACA
GGGCTTTTGACATCTACAATGATAAAGTAGCTGGTTTTGCTAAATTCCTAAAAACTA
ATTGTTGTCGCTTCCAAGAAAAGGACGAAGATGACAATTTAATTGATTCTTACTTTG
TAGTTAAGAGACACACTTTCTCTAACTACCAACATGAAGAAACAATTTATAATTTAC
TTAAGGATTGTCCAGCTGTTGCTAAACATGACTTCTTTAAGTTTAGAATAGACGGTG
ACATGGTACCACATATATCACGTCAACGTCTTACTAAATACACAATGGCAGACCTCG
TCTATGCTTTAAGGCATTTTGTATGAAGGTAATTGTGACACATTAAGAAATACTTG
TCACATACAATTGTTGTGATGATGATTATTTCAATAAAAAGGACTGGTATGATTTTG
TAGAAAACCCAGATATATTACGCGTATACGCCAACTTAGGTGAACGTGTACGCCAA
GCTTTGTTAAAAACAGTACAATTCTGTGATGCCATGCGAAATGCTGGTATTGTTGGT
GTACTGACATTAGATAATCAAGATCTCAATGGTAACTGGTATGATTTCCGGTGATTC
ATACAAACCACGCCAGGTAGTGGAGTTCCTGTTGTAGATTCTTATTATTCATTGTTA
ATGCCTATATTAACCTTGACCAGGGCTTTAACTGCAGAGTCACATGTTGACACTGAC
TTAACAAAGCCTTACATTAAGTGGGATTTGTTAAAAATATGACTTCACGGAAGAGAG

GTAAAACTCTTTGACCGTTATTTTAAATATTGGGATCAGACATAACCACCCAAATTG
TGTTAACTGTTTGGATGACAGATGCATTCTGCATTGTGCAAACCTTAATGTTTTATTC
TCTACAGTGTTCCCACCTACAAGTTTTGGACCACTAGTGAGAAAAATATTTGTTGAT
GGTGTTCATTTGTAGTTTCAACTGGATAACACTTCAGAGAGCTAGGTGTTGTACAT
AATCAGGATGTAAACTTACATAGCTCTAGACTTAGTTTTAAGGAATTACTTGTGTAT
GCTGCTGACCCTGCTATGCACGCTGCTTCTGGTAATCTATTACTAGATAAACGCACT
ACGTGCTTTTTAGTAGCTGCACTTACTAATAACGTGCGCATTTCAAACCGTTAAACCA
GGTAATTTTAATAAGGATTTTTACGATTTTCGCCGTTAGTAAGGGATTTTTTAAAGAG
GGTAGTTCAGTCGAACTTAAACACTTCTTTTTTCGCACAAGACGGTAACGCCGCTATT
AGCGATTACGATTATTATAGATATAATCTACCTACTATGTGTGATATTAGACAATTG
TTATTCGTAGTCGAGGTAGTCGATAAGTATTTTCGATTGTTATGACGGAGGTTGTATT
AACGCTAATCAGGTAATCGTTAATAACCTTGATAAGTCTGCCGGTTTTCTTTTAATA
AATGGGGTAAGGCTAGATTGTATTATGATTCTATGTCATACGAAGACCAAGACGCTC
TATTCGCATATACTAAACGTAACGTTATACCTACAATTACGCAAATGAATCTTAAGT
ATGCTATTAGCGCTAAAAATCGCGCTAGAACAGTCGCCGGAGTGTCAATCTGTAGTA
CTATGACTAATCGTCAATTTACCAAAAATTGCTTAAATCAATCGCCGCTACTAGAG
GCGCTACAGTCGTTATCGGTACATCTAAATTTTATGGCGGATGGCATAATATGCTTA
AAACGGTTTATTCTGACGTTGAGAATCCACACCTTATGGGTTGGGATTATCCTAAAT
GCGATCGCGCTATGCCTAATATGCTTAGAATTATGGCTAGTCTCGTACTCGCACGTA
AACATAACAACATGTTGTAGTCTATCACATAGATTTTATAGATTAGCTAACGAATGTG
CACAAGTGCTTAGCGAAATGGTTATGTGTGGTGGATCACTATATGTTAAACCCGGTG
GTACATCTAGCGGTGACGCTACTACCGCATACGCTAATAGCGTATTCAATATATGTC
AAGCCGTTACCGCTAACGTTAACGCTCTACTATCTACTGACGGTAATAAGATAGCCG
ATAAGTATGTTAGAACTTACAACATAGATTGTATGAGTGTCTTTATCGTAATCGCG
ATGTCGATACTGATTTTCGTTAACGAATTCTATGCTTATCTTAGAAAACACTTTAGTAT
GATGATACTATCTGACGATGCCGTAGTGTGTTTTAACTCTACTTATGCTAGTCAGGG
ATTAGTCGCATCAATCAAAAATTTTAAATCAGTGTATATTATCAAAATAACGTTTTT
ATGTCAGAAGCTAAATGTTGGACTGAGACTGATCTTACTAAGGGTCCACACGAATTT
TGTTCAACAATACTATGTTAGTTAAACAGGGTGATGATTATGTGTACCTTCCTTACC
CAGATCCATCAAGAATCCTAGGGGCCGGCTGTTTTGTAGATGATATCGTAAAAACA
GATGGTACACTTATGATTGAACGGTTCGTGTCTTTAGCTATAGATGCTTACCCACTTA
CTAAACATCCTAATCAGGAGTATGCTGATGTCTTTCATTTGTACTIONACAATACATAA
GAAAGCTACATGATGAGTTAACAGGACACATGTTAGACATGTATTCTGTTATGCTTA
CTAATGATAAACACTIONCAAGGTATTGGGAACCTGAGTTTTATGAGGCTATGTACACAC
CGCATAACAGTCTTACAGGCTGTTGGGGCTTGTGTTCTTTGCAATTCACAGACTTCATT
AAGATGTGGTGCTTGCATACGTAGACCATTCTTATGTTGTAAATGCTGTTACGACCA
TGTCATATCAACATCACATAAATTAGTCTTGTCTGTTAATCCGTATGTTTGCAATGCT
CCAGGTTGTGATGTCACAGATGTGACTCAACTTTACTTAGGAGGTATGAGCTATTAT
TGTAATCACATAAACCACCCATTAGTTTTCCATTGTGTGCTAATGGACAAGTTTTTG
GTTTATATAAAAATACATGTGTTGGTAGCGATAATGTTACTGACTTTAATGCAATTG

CAACATGTGACTGGACAAATGCTGGTGATTACATTTTAGCTAACACCTGTACTGAAA
GACTCAAGCTTTTTGCAGCAGAAACGCTCAAAGCTACTGAGGAGACATTTAAACTGT
CTTATGGTATTGCTACTGTACGTGAAGTGCTGTCTGACAGAGAATTACATCTTTCAT
GGGAAGTTGGTAAACCTAGACCACCACTTAACCGAAATTATGTCTTTACTGGTTATC
GTGTAATAAAAACAGTAAAGTACAAATAGGAGAGTACACCTTTGAAAAAGGTGAC
TATGGTGATGCTGTTGTTTACCGAGGTACAACAACCTTACAAATTAATGTTGGTGAT
TATTTTGTGCTGACATCACATACAGTAATGCCATTAAGTGCACCTACACTAGTGCCA
CAAGAGCACTATGTTAGAATTACTGGCTTATACCCAACACTCAATATCTCAGATGAG
TTTTCTAGCAATGTTGCAAATTATCAAAAAGGTTGGTATGCAAAAAGTATTCTACTC
CAGGGACCACCTGGTACTGGTAAGAGTCATTTTGCTATTGGCCTAGCTCTCTACTAC
CCTTCTGCTCGCATAGTGTATACAGCTTGCTCTCATGCCGCTGTTGATGCACTATGTG
AGAAGGCATTAATAATTTGCCTATAGATAAATGTAGTAGAATTATACCTGCACGTG
CTCGTGTAGAGTGTTTTGATAAATTCAAAGTGAATTCAACATTAGAACAGTATGTCT
TTTGTACTGTAAATGCATTGCCTGAAACGACAGCAGATATAGTTGTCTTTGATGAAA
TTTCAATGGCCACAAATTATGATTTGAGTGTTGTCAATGCCAGATTACGTGCTAAGC
ACTATGTGTACATTGGCGACCCTGCTCAATTACCTGCACCACGCACATTGCTAACTA
AGGGCACACTAGAACCAGAATATTTCAATTCAGTGTGTAGACTTATGAAAACATA
GGTCCAGACATGTTCCCTCGGAACTTGTCCGGCGTTGTCCCTGCTGAAATTGTTGACACT
GTGAGTGCTTTGGTTTATGATAATAAGCTTAAAGCACATAAAGACAAATCAGCTCAA
TGCTTTAAAATGTTTTATAAGGGTGTTATCACGCATGATGTTTCATCTGCAATTAACA
GGCCACAAATAGGCGTGGTAAGAGAATTCCTTACACGTAACCCTGCTTGGAGAAAA
GCTGTCTTTATTTACCTTATAATTCACAGAATGCTGTAGCCTCAAAGATTTTGGGAC
TACCAACTCAAACCTGTTGATTCATCACAGGGCTCAGAATATGACTATGTCATATTCA
CTCAAACCACTGAAACAGCTCACTCTTGTAATGTAAACAGATTTAATGTTGCTATTA
CCAGAGCAAAGTAGGCATACTTTGCATAATGTCTGATAGGGACCTTTATGACAAGT
TGCAATTTACAAGTCTTGAAATTCCACGTAGGAATGTGGCAACTTTACAAGCTGAAA
ATGTAACAGGACTCTTTAAAGATTGTAGTAAGGTAATCACTGGGTTACATCCTACAC
AGGCACCTACACACCTCAGTGTTGACACTAAATTCAAAACTGAAGGTTTATGTGTTG
ACATACCTGGCATAACCTAAGGACATGACCTATAGAAGACTCATCTCTATGATGGGTT
TTAAAATGAATTATCAAGTTAATGGTTACCCTAACATGTTTATCACCCGCGAAGAAG
CTATAAGACATGTACGTGCATGGATTGGCTTCGATGTGCGAGGGGTGCATGCTACTA
GAGAAGCTGTTGGTACCAATTTACCTTTACAGCTAGGTTTTTCTACAGGTGTTAACCT
AGTTGCTGTACCTACAGGTTATGTTGATACACCTAATAATACAGATTTTTCCAGAGT
TAGTGCTAAACCACCGCCTGGAGATCAATTTAAACACCTCATACCACTTATGTACAA
AGGACTTCCTTGGAAATGTAGTGCATATAAAGATTGTACAAATGTTAAGTGACACACT
TAAAAATCTCTCTGACAGAGTCGTATTTGTCTTATGGGCACATGGCTTTGAGTTGAC
ATCTATGAAGTATTTTGTGAAAATAGGACCTGAGCGCACCTGTTGTCTATGTGATAG
ACGTGCCACATGCTTTTCCACTGCTTCAGACACTTATGCCTGTTGGCATCATTCTATT
GGATTTGATTACGTCTATAATCCGTTTATGATTGATGTTCAACAATGGGGTTTTACAG
GTAACCTACAAAGCAACCATGATCTGTATTGTCAAGTCCATGGTAATGCACATGTAG

CTAGTTGTGATGCAATCATGACTAGGTGTCTAGCTGTCCACGAGTGCTTTGTTAAGC
GTGTTGACTGGACTATTGAATATCCTATAATTGGTGATGAACTGAAGATTAATGCGG
CTTGTAGAAAGGTTCAACACATGGTTGTTAAAGCTGCATTATTAGCAGACAAATTCC
CAGTTCTTCACGACATTGGTAACCCTAAAGCTATTAAGTGTGTACCTCAAGCTGATG
TAGAATGGAAGTTCTATGATGCACAGCCTTGTAGTGACAAAGCTTATAAAATAGAA
GAATTATTCTATTCTTATGCCACACATTCTGACAAATTCACAGATGGTGTATGCCTAT
TTTGG AATTGCAATGTCGATAGATATCCTGCTAATTCCATTGTTTGTAGATTTGACAC
TAGAGTGCTATCTAACCTTAACTTGCCTGGTTGTGATGGTGGCAGTTTGTATGTAAA
TAAACATGCATTCCACACACCAGCTTTTGATAAAAAGTGCTTTTGTTAATTTAAAACA
ATTACCATTTTTCTATTACTCTGACAGTCCATGTGAGTCTCATGGAAAACAAGTAGT
GTCAGATATAGATTATGTACCACTAAAGTCTGCTACGTGTATAACACGTTGCAATTT
AGGTGGTGCTGTCTGTAGACATCATGCTAATGAGTACAGATTGTATCTCGATGCTTA
TAACATGATGATCTCAGCTGGCTTTAGCTTGTGGGTTTACAAACAATTTGATACTTAT
AACCTCTGGAACACTTTTACAAGACTTCAGAGTTTAGAAAATGTGGCTTTTAATGTT
GTAAATAAGGGACACTTTGATGGACAACAGGGTGAAGTACCAGTTTCTATCATTAAAT
AACACTGTTTACACAAAAGTTGATGGTGTGATGTAGAATTGTTTGAAAATAAAAACA
ACATTACCTGTTAATGTAGCATTGAGCTTTGGGCTAAGCGCAACATTAAACCAGTA
CCAGAGGTGAAAATACTCAATAATTTGGGTGTGGACATTGCTGCTAATACTGTGATC
TGGGACTACAAAAGAGATGCTCCAGCACATATATCTACTATTGGTGTGTTCTATG
ACTGACATAGCCAAGAAACCAACTGAAACGATTTGTGCACCACTCACTGTCTTTTTT
GATGGTAGAGTTGATGGTCAAGTAGACTTATTTAGAAATGCCCGTAATGGTGTCTT
ATTACAGAAGGTAGTGTTAAAGGTTTACAACCATCTGTAGGTCCCAAACAAGCTAGT
CTTAATGGAGTCACATTAATTGGAGAAGCCGTAAAAACACAGTTCAATTATTATAAG
AAAGTTGATGGTGTGTTGCCAACAATTACCTGAAACTTACTTTACTCAGAGTAGAAAT
TTACAAGAATTTAAACCCAGGAGTCAAATGGAAATTGATTTCTTAGAATTAGCTATG
GATGAATTCATTGAACGGTATAAATTAGAAGGCTATGCCTTCGAACATATCGTTTAT
GGAGATTTTAGTCATAGTCAGTTAGGTGGTTTACATCTACTGATTGGACTAGCTAAA
CGTTTTAAGGAATCACCTTTTGAATTAGAAGATTTTATTCCTATGGACAGTACAGTT
AAAAACTATTTCATAACAGATGCGCAAACAGGTTTCACTAAGTGTGTGTGTTCTGTT
ATTGATTTATTACTTGATGATTTTGTGAAATAATAAAAATCCCAAGATTTATCTGTAG
TTTCTAAGGTTGTCAAAGTACTATTGACTATACAGAAATTTCAATTTATGCTTTGGTG
TAAAGATGGCCATGTAGAAACATTTTACCCAAAATTACAATCTAGTCAAGCGTGGC
AACCGGGTGTGCTATGCCTAATCTTTACAAAATGCAAAGAATGCTATTAGAAAAGT
GTGACCTTCAA AATTATGGTGATAGTGCAACATTACCTAAAGGCATAATGATGAATG
TCGCAAAAATATACTCAACTGTGTCAATATTTAAACACATTAACATTAGCTGTACCCT
ATAATATGAGAGTTATACATTTTGGTGCTGGTTCTGATAAAGGAGTTGCACCAGGTA
CAGCTGTTTTAAGACAGTGGTTGCCTACGGGTACGCTGCTTGTGATTGAGATCTTA
ATGACTTTGTCTCTGATGCAGATTCAACTTTGATTGGTGATTGTGCAACTGTACATAC
AGCTAATAAATGGGATCTCATTATTAGTGATATGTACGACCCTAAGACTAAAAATGT
TACAAAAGAAAATGACTCTAAAGAGGGTTTTTTCACTTACATTTGTGGGTTTATACA

ACAAAAGCTAGCTCTTGGAGGTTCCGTGGCTATAAAGATAACAGAACATTCTTGGA
ATGCTGATCTTTATAAGCTCATGGGACACTTCGCATGGTGGACAGCCTTTGTTACTA
ATGTGAATGCGTCATCATCTGAAGCATTTTTAATTGGATGTAATTATCTTGGCAAAC
CACGCGAACAAATAGATGGTTATGTCATGCATGCAAATTACATATTTTGGAGGAATA
CAAATCCAATTCAGTTGTCTTCCTATTCTTTATTTGACATGAGTAAATTTCCCCTTAA
ATTAAGGGGTACTGCTGTTATGTCTTTAAAAGAAGGTCAAATCAATGATATGATTTT
ATCTCTTCTTAGTAAAGGTAGACTTATAATTAGAGAAAACAACAGAGTTGTTATTTT
TAGTGATGTTCTTGTTAACAACTAAACGAACAATGTTTGTTTTTCTTGTTTTATTGCC
ACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATCTTACAACCAGAACTCAATTACCCCCTGCATA
CACTAATTCTTTTACTAGGGGGGTTTATTATCCTGATAAGGTTTTTTCGTAGTTCAGTC
TTGCATAGTACTCAGGATCTATTTTTACCTTTCTTTTCGAACGTTACTTGGTTTCAGC
CTATACACGTTTCCGGTACTAACGGTACTAAAAGATTCGATAATCCTGTCTTACCAT
TTAACGACGGAGTGTATTTTCGCTAGTACCGAAAAATCTAATATTATTAGGGGTTGGA
TATTCGGTACTACTCTTGACTCTAAAACGCAATCATTGTTAATCGTTAATAACGCTAC
TAACGTCGTTATTAAGGTATGCGAATTTTCAGTTTTGTAACGATCCTTTCTTAGGCGTT
TATTATCATAAAAATAATAAGTCTTGGATGGAATCCGAATTTAGAGTGTATAGTTCC
GCTAATAATTGTACATTCGAATACGTTTCGCAACCATTTCTTATGGATCTTGAGGGT
AAGCAGGGTAATTTTAAAAATTTGCGTGAATTCGTTTTTAAAAATATAGACGGTTAT
TTTAAGATATACTCTAAACATACCCCTATTAATCTCGTTAGGGATCTACCTCAGGGTT
TTTCCGCTCTTGAGCCATTAGTCGATTTGCCAATAGGTATTAATTTACTAGATTTCA
GACTCTTTTAGCGTTACATAGATCTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTTGG
ACAGCTGGTGCTGCAGCTTATTATGTGGGTTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTA
AATATAATGAAAATGGAACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCT
CAGAAACAAAGTGTACGTTGAAATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCAAACA
TCTAATTTTAGAGTGCAACCTACCGAATCAATCGTTAGATTTCTAATATTACTAACT
TATGTCCATTTGGGGAAGTTTTTAAACGCTACTAGATTCGCTAGCGTTTACGCTTGGA
ATCGTAAACGTATATCTAATTGCGTTGCCGATTATTCCGTACTTTATAATTCCGCTAG
TTTTTCTACTTTTAAAGTGTTACGGAGTTAGTCCAATAAGCTTAACGATCTATGTTTT
ACTAACGTATACGCTGATTCATTTCGTTATTAGAGGTGACGAAGTTAGACAGATTGCA
CCAGGTCAAACAGGTAAGATTGCCGATTATAATTATAAGTTGCCTGACGATTTTACA
GGTTGCGTTATCGCTTGAATTCTAATAATCTCGATTCTAAAGTCGGAGGTAATTAT
AATTATCTATATAGATTGTTTCGTAAGTCTAACCTTAAACCATTTCGAACGGGATATT
AGTACTGAGATTTATCAGGCAGGTAGTACACCTTGTAACGGTGTCGAAGGTTTTAAT
TGTTATTTTCCACTTCAATCTTACGGTTTTCAACCTACTAACGGAGTCGGATATCAAC
CATATAGAGTAGTCGTTCTATCATTTCGAACCTGTTACATGCACCCGCTACAGTTTGTG
GTCCTAAAAAATCTACTAACTTAGTTAAGAATAAATGCGTTAATTTTAACTTTAACG
GTCTTACAGGTACAGGCGTACTTACCGAATCTAACAAAAAATTTTTACCATTTCAAC
AATTTGGTAGGGATATAGCCGATACTACTGACGCAGTTAGGGATCCACAAACACTT
GAGATACTCGATATTACACCTTGTTCTTTTGGCGGGGTTAGCGTAATTACACCCGGT
ACTAATACATCTAATCAGGTTCGCAGTACTTTATCAAGACGTTAATTGTACTGAAGTG

CCAGTCGCTATACATGCTGATCAATTGACACCTACATGGCGGGTTTATTCTACCGGT
TCTAACGTTTTTCAGACTAGAGCCGGTTGTCTTATAGGCGCTGAACATGTTAATAAC
TCATACGAATGCGATATTCCTATAGGCGCAGGTATTTGCGCATCATATCAAACACAG
ACTAACTCACCTAGACGTGCTAGATCCGTTGCTAGTCAATCTATTATCGCTTATACTA
TGTCTTTAGGCGCTGAAAACCTCAGTCGCATACTCTAATAACTCAATCGCTATACCTA
CTAATTTTACAATTAGCGTACTACTGAGATTTTACCCGTTAGTATGACTAAGACTTC
AGTCGATTGTACTATGTATATTTGCGGTGACTCTACCGAATGTTCTAATCTGTTATTG
CAATACGGATCTTTTTGTACACAATTGAATCGTGCACCTTACAGGTATTGCAGTCGAA
CAGGATAAGAATACACAAGAGGTTTTTGCACAAGTCAAACAAATTTACAAAACACC
ACCAATTAAGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCACAAATATTACCAGATCCATCAA
ACCAAGCAAGAGGTCATTTATTGAAGATCTACTTTTCAACAAAGTGACACTTGCAGA
TGCTGGCTTCATCAAACAATATGGTGATTGCCTTGGTGATATTGCTGCTAGAGATCT
CATTTGCGCTCAAAAATTTAACGGACTTACAGTTTTTACCACCTTACTTACTGACGA
AATGATTGCGCAATATACATCCGCATTGTTAGCCGGA ACTATTACATCCGGATGGAC
TTTTGGCGCAGGCGCAGCATTACAGATTCCATTCGCTATGCAAATGGCTTATAGGTT
TAACGGTATAGGCGTTACGCAAAACGTA CTTTATGAGAATCAAAA ACTTATCGCTAA
CCAATTTAATTCCGCTATCGGTAAGATTCAGGATTCATTGTCTAGTACTGCTAGTGC
ACTCGGTAAGTTGCAAGACGTAGTGAATCAAAACGCTCAAGCACTTAATACACTCG
TTAAACAGCTTAGTTCTAATTTTGGCGCAATTTCTAGTGTGCTTAACGATATACTATC
TAGACTCGATAAAGTCGAAGCCGAAGTGCAAATCGATAGATTGATTACCGGTAGGT
TGCAATCATTGCAAACATACGTTACACAGCAATTGATTAGGGCCGCAGAGATACGC
GCTAGCGCTAATCTCGCAGCTACTAAAATGTCTGAATGCGTACTCGGACAATCTAAA
CGTGTTCGATTTTTGCGGTAAGGGATATCATCTTATGTCTTTTCCACAATCTGCACCTC
ACGGAGTCGTGTTTTTACACGTTACTTATGTGCCAGCTCAAGAGAAAAATTTTACAA
CCGCTCCTGCTATTTGTATGACGGTAAGGCACATTTTCCCTAGAGAGGGCGTATTCCG
TTTCTAACGGTACACATTGGTTCGTTACACAACGTAATTTTACGAACCTCAAATTAT
TACTACTGATAATACATTCGTATCAGGTAATTGTGACGTAGTGATAGGTATCGTTAA
TAATACAGTTTACGATCCACTTCAACCTGAACTCGATAGTTTTAAAGAGGAACTCGA
TAAGTATTTTAAAATCATAACATCACCTGACGTCGACTTAGGCGATATTTAGGTAT
TAACGCTAGTGTGTTAACATTCAAAAAGAGATTGATAGACTTAACGAAGTCGCTA
AAAATCTTAACGAATCACTTATCGATCTGCAAGAGTTAGGTAAGTATGAGCAATATA
TTAAATGGCCTTGGTATATTTGGTTAGGCTTTATAGCCGGATTGATCGCAATCGTTAT
GGTTACAATTATGTTATGTTGTATGACATCATGTTGTTTCATGTCTTAAGGGATGTTGT
TCATGCGGATCATGTTGTAAATTTGACGAAGACGATTCCGAACCAGTGCTTAAAGGC
GTAAAGTTACATTATACATAAACGAACCTTATGGATTTGTTTATGAGAATCTTCACAA
TTGGA ACTGTA ACTTTGAAGCAAGGTGAAATCAAGGATGCTACTCCTTCAGATTTTG
TTCGCGCTACTGCAACGATACCGATACAAGCCTCACTCCCTTTCGGATGGCTTATTG
TTGGCGTTGCACTTCTTGCTGTTTTTTCAGAGCGCTTCCAAAATCATAACCCTCAAAA
GAGATGGCAACTAGCACTCTCCAAGGGTGTTCACTTTGTTTGCAACTTGCTGTTGTT
GTTTGTAACAGTTTACTCACACCTTTTGCTCGTTGCTGCTGGCCTTGAAGCCCCTTTT

CTCTATCTTTATGCTTTAGTCTACTTCTTGCAGAGTATAAACTTTGTAAGAATAATAA
TGAGGCTTTGGCTTTGCTGGAAATGCCGTTCCAAAAACCCATTACTTTATGATGCCA
ACTATTTTCTTTGCTGGCATACTAATTGTTACGACTATTGTATACCTTACAATAGTGT
AACTTCTTCAATTGTCATTACTTCAGGTGATGGCACAACAAGTCCTATTTCTGAACAT
GACTACCAGATTGGTGGTTATACTGAAAAATGGGAATCTGGAGTAAAAGACTGTGT
TGTATTACACAGTACTTCACTTCAGACTATTACCAGCTGTACTCAACTCAATTGAGT
ACAGACACTGGTGTGTAACATGTTACCTTCTTCATCTACAATAAAAATTGTTGATGAG
CCTGAAGAACATGTCCAAATTCACACAATCGACGGTTCATCCGGAGTTGTTAATCCA
GTAATGGAACCAATTTATGATGAACCGACGACGACTACTAGCGTGCCTTTGTAAGCA
CAAGCTGATGAGTACGAACTTATGTACTCATTTCGTTTCGGAAGAGACAGGTACGTTA
ATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGGCTTTCGTGGTATTCTTGCTAGTTACACTAG
CCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTACTGCTGCAATATTGTTAACGTGAGTCT
TGTA AAAACCTTCTTTTTACGTTTACTCTCGTGTTAAAAATCTGAATTCTTCTAGAGTT
CCTGATCTTCTGGTCTAAACGAACTAAATATTATATTAGTTTTTCTGTTTGGAACCTT
AATTTTAGCCATGGCAGATTCCAACGGTACTATTACCGTTGAAGAGCTTAAAAAGCT
CCTTGAACAATGGAACCTAGTAATAGGTTTCCTATTCTTACATGGATTTGTCTTCTA
CAATTTGCCTATGCCAACAGGAATAGGTTTTTGTATATAATTAAGTTAATTTTCTCT
GGCTGTTATGGCCAGTAACTTTAGCTTGTTTTGTGCTTGCTGCTGTTTACAGAATAAA
TTGGATCACCGGTGGAATTGCTATCGCAATGGCTTGTCTTGTAGGCTTGATGTGGCT
CAGCTACTTCATTGCTTCTTTCAGACTGTTTGC GCGTACGCGTTCATGTGGTCATTC
AATCCAGAACTAACATTCTTCTCAACGTGCCACTCCATGGCACTATTCTGACCAGA
CCGCTTCTAGAAAGTGAACCTCGTAATCGGAGCTGTGATCCTTCGTGGACATCTTCGT
ATTGCTGGACACCATCTAGGACGCTGTGACATCAAGGACCTGCCTAAAGAAATCAC
TGTTGCTACATCACGAACGCTTCTTATTACAAATTGGGAGCTTCGCAGCGTGTAGC
AGGTGACTCAGGTTTTGCTGCATACAGTCGCTACAGGATTGGCAACTATAAATTA
CACAGACCATTCCAGTAGCAGTGACAATATTGCTTTGCTTGTACAGTAAGTGACAAC
AGATGTTTCATCTCGTTGACTTTCAGGTTACTATAGCAGAGATATTACTAATTATTAT
GAGGACTTTTAAAGTTTCCATTTGGAATCTTGATTACATCATAAACCTCATAATTAA
AAATTTATCTAAGTCACTAACTGAGAATAAATATTCTCAATTAGATGAAGAGCAACC
AATGGAGATTGATTAACGAACATGAAAATTATTCTTTTCTTGGCACTGATAACACT
CGCTACTTGTGAGCTTTATCACTACCAAGAGTGTGTTAGAGGTACAACAGTACTTTT
AAAAGAACCTTGCTCTTCTGGAACATACGAGGGCAATTCACCATTTTCATCCTCTAGC
TGATAACAAATTTGCACTGACTTGCTTTAGCACTCAATTTGCTTTTGTGCTTGTGCTGAC
GGCGTAAAACACGTCTATCAGTTACGTGCCAGATCAGTTTCACCTAAACTGTTTCATC
AGACAAGAGGAAGTTCAAGAACTTTACTCTCCAATTTTTCTTATTGTTGCGGCAATA
GTGTTTATAACACTTTGCTTCACACTCAAAGAAAGACAGAATGATTGAACTTTCAT
TAATTGACTTCTATTTGTGCTTTTTAGCCTTCTGCTATTCCTTGTTTTAATTATGCTT
ATTATCTTTTGGTTCTCACTTGAACGTGCAAGATCATAATGAACTTGTACGCCTAA
ACGAACATGAAATTTCTTGTTTTTCTTAGGAATCATCACAACACTGTAGCTGCATTTACC
AAGAATGTAGTTTACAGTCATGTACTCAACATCAACCATATGTAGTTGATGACCCGT

GTCCTATTCACCTTCTATTCTAAATGGTATATTAGAGTAGGAGCTAGAAAATCAGCAC
 CTTTAATTGAATTGTGCGTGGATGAGGCTGGTTCTAAATCACCCATTCAGTACATCG
 ATATCGGTAATTATACAGTTTCCTGTTTACCTTTTACAATTAATTGCCAGGAACCTAA
 ATTGGGTAGTCTTGTAGTGC GTTGTTCGTTCTATGAAGACTTTTTAGAGTATCATGAC
 GTTCGTGTTGTTTTAGATTTTCATCTAAACGAACAACTAAAATGTCTGATAATGGAC
 CCCAAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCCTCAGATTCAACTG
 GCAGTAACCAGAATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAAAACAACGTGGGCCCA
 AGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGA
 AGACCTTAAATTCCCTCGAGGACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCAG
 ATGACCAAATTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGT
 AAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAACTGGGCCAGA
 AGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGG
 GAGCCTTGAATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAAATGCT
 GCAATCGTGCTACAACCTTCCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGA
 AGGGAGCAGAGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCTCATCACGTAGTCGCAACA
 GTTCAAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGGAACTTCTCCTGCTAGAATGGCT
 GGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTT
 GAGAGCAAAATGTCTGGTAAAGGCCAACAACAACAAGGCCAAACTGTCACTAAGA
 AATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAACGTACTGCCACTAAAGCA
 TACAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCCAGAACAAACCCAAGGAAATTT
 TGGGGACCAGGAACTAATCAGACAAGGAACTGATTACAAACATTGGCCGCAAATTG
 CACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCCTTCGGAATGTCGCGCATTGGCATGGAAG
 TCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTGGATGACAAA
 GATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATATTGACGCATACAAA
 ACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAAGAAGGCTGATGAAACTC
 AAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAACCTGTGACTCTTCTCCTGCTGCA
 GATTTGGATGATTTCTCAAACAATTGCAACAATCCATGAGCAGTGCTGACTCAACT
 CAGGCCTAAACTCATGCAGACCACACAAGGCAGATGGGCTATATAAACGTTTTTCGC
 TTTTCCGTTTACGATATATAGTCTACTCTTGTGCAGAATGAATTCTCGTAACTACATA
 GCACAAGTAGATGTAGTTAACTTTAATCTCACATAGCAATCTTTAATCAGTGTGTAA
 CATTAGGGAGGACTTGAAAGAGCCACCACATTTTCACCGAGGCCACGCGGAGTACG
 ATCGAGTGTACAGTGAACAATGCTAGGGAGAGCTGCCTATATGGAAGAGCCCTAAT
 GTGTAATAATTAATTTAGTAGTCTATCCCCATGTGATTTTAATAGCTTCTTAGGAGA
 ATGACAAAAA

[00241] SEQ ID NO:4 (деоптимизировано по отношению к вашингтонскому изоляту (GenBank: MN985325.1) с делецией 36 нуклеотидов в шиповидном белке).

attaaaggtttatacttcccaggttaacaacaaccaactttcagatctctttagatctgttctctaaacgaactttaaactctgtgtg
 gctgtcactcggctgcatgcttagtgactcacgcagtataattaataactaattactgtcgttgacaggacacgagtaactcgtctatctctgc
 aggetgcttacggtttcgtccgtgttcagccgatcatcagcacatctaggtttcgtccgggttgaccgaaaggttaagatggagagcctgt
 ccctggtttcaacgagaaaacacacgtccaactcagtttgctgtttacaggttcgcgacgtgctcgtacgtggctttggagactccgtggag

gaggtcttatcagaggcacgtcaacatctaaagatggcacttgtggcttagtagaagttgaaaaaggcgttttgcctcaacttgaacagccct
 atgtgttcatcaaacgttcggatgctcgaactgcacctcatggatcatgttatggttgagctggttagcagaactcgaaggcattcagtacggtcg
 tagtgggtgagacacttgggtgccttgcctcatgtgggcgaataaccagtggcctaccgcaaggttcttctcgaagaacggtaataaagga
 gctggtggccatagttaccggcgccgatctaaagtatftgacttaggcgacgagcttggcactgatccttatgaagatfttcaagaaaactgga
 aactaaacatagcagtggtgttaccctgaactcatgctgagcttaacggaggggcatacactcgtatgctgataacaacttctgtggcc
 ctgatggctaccctcttgagtgcattaaagacctctagcacgtgctggtaaagcttcatgcactftgtccgaacaactggactftattgacacta
 agaggggtgtactgctccgtgaacatgagcatgaaatftgcttggfacacggaacgttctgaaaagagctatgaattgcagacacctfttg
 aaftaaatftgcaagaaatftgacacctcaatggggaatgtccaaatftgtatftcccttaaatccataatcaagactatftcaaccaagggt
 tgaagaaagaaagcttgatggctttagggtagaattcgtctgtctatccagttgctgcaccaaatgaatgcaaccaaatgtcctftcaactc
 tcatgaagtgtgatcattgtggtgaaactcattggcagacgggcgattftgttaaagccacttgcgaatfttggcactgagaatftgactaaa
 gaaggtgccactacttgggttacttaccceaaaatgctgttftaaatftattgtccagcatgtcacaatftcagaagtaggacctgagcatagt
 ctgcccgaataccataatgaatctggcttgaaaaccattctcgtaaaggggtgctgcactattgcttggagggctgtgttctcttatgttggtt
 gccataacaagtgtgctattgggttccactgctagcgtatacataggttgaaccatacaggtgttggagaaggttccgaaggtcttaa
 tgacaaccttctgaaatactccaaaaagagaaagtcaacatcaatftgttggtagctftaaactaatgaagagatcgcattatfttggcatct
 tttctgctccacaagtcttftgtgaaactgtgaaaggttggattataaagcattcaacaaatfttgaatcctgtgtaatfttaagttaca
 aaagaaaagctaaaaaggtgctggaatftgggtgaacagaaatcaactgagtcctcttatgcatttgcacagaggtgctcgtgttg
 tacgatcaatfttctcccactcttgaactgctcaaaatctgtgctgtttacagaaggccgctataacaatactagatggaatftcacagta
 ttcactgagactcattgatgctatgatftcacatctgattggctactaacaatctagtgtaatggcctacattacaggtgggtgttgcattga
 ctctgcagtggttaactaacatcttggcactgtttagaaaaactcaaacccgtccttgattggcttgaagagaagfttaaggaaggttagag
 tttcttagacaggttgggaaatfttaaatftatctcaacctgtcctgtgaaatftcggtggacaaatftcacctgtgcaaaggaaftaag
 gagagtgtcagacattcttaagcttgaataaaatfttggcttftgtgctgactctatcattatftggtagctaaacttaagccttgaatfta
 ggtgaaacatttgcacgcactcaaaagggtgtacagaaagtgtgftaaatccagagaagaaactggcctactcatgcctctaaaagcccc
 aaaagaaatftcttcttagaggagaaacacttcccacagaagtgttaacagaggaaagttgcttgaaaactggtgattacaaccattagaa
 caacctactagtgaagctgtgaagctccattgggtgtacaccagttgtattaacgggcttatgtgctcgaatcaagacacagaaaagt
 actgtgcccttgcacctaatatgatggttaacaacaataacttcaactcaaaaggggtgcaccaacaaggttactfttgggtgatgacactgt
 gatagaagtcaaggttacaagagtgtgaatftcactfttgaacttcatgaaaggatgataaagtaactaatgagaagtgtctgcctatacag
 ttgaactcggtagagaagtaaatgagttcgcctgtgttggcagatgctgtcataaaaactftgcaaccagtatctgaattacttacaccactg
 ggcaattgatttagatgagtgagtaggttacatactacttattgatgagctggtgagttatTattggcttccatagtattgttcttctaccct
 ccagatgaggatgaagaagaaggtgattgtgaagaagaagagttgagccatcaactcaatagatggtactgaagatgattaccaag
 gtaaaccttggaaatftggtgccacttctgctgcttcaacctgaagaagagcaagaagaagattggttagatgatgatgcaacaactgtt
 ggtcaacaagacggcagtgaggacaactcagacaactactatftcaacaatftgtaggttcaacctcaattagagatggaacttacaccagtt
 gttcagactattgaagtgaatagtttagtggttattftaaaacttactgacaatgtatcattaaaaatgcagacattgtggaagaagctaaaaag
 gtaaaaccaacagtggttgaatgcagccaatgtttaccttaaacatggaggaggtgttcaggagccttaataaggctactaacaatgcc
 atgcaagttgaatctgatgattacatagctactaatggaccacttaagtggtggtagttgtgtttaaagcggacacaacttctgtaaacactgt
 ctctcatgttgcggcccaatgttaacaagggtgaagacattcaacttctaagagtcttatgaaaatfttaacagcacgaagttctacttgc
 ccattattacagctggatfttgggtgctgacctatacattctttaaagagttgtgtagatactgttcgcacaaatgtctacttagctgtcttftgata
 aaaactctatgacaactfttcaagctfttggaaatgaagagtgaaggaaggtgaacaaaagatcgtgagattcctaaagaggaagt
 taagccatttataactgaaagtaaaccttcaagttgaacagagaaaacaagatgataagaaaatcaagcttgtgttgaagaagttacaacaact
 ctggaagaaactaagttcctcagaaaaactfttactftatftgacattaatggcaatcttcatccagattctgccacttftttagtgacattga
 catcacttcttaagaaagatgctccatataatgtgggtgatgttftcaagaggggttfttaactgctgtggttatacctactaaaaaggctgtg

ggcactactgaaatgctagcgaagctttgagaaaagtccaacagacaattataaaccacttaccgggtcagggtttaaagtgttacact
 gtagaggaggcaaagacagtgcttaaaaagttaaaaagtgccctttacattctaccatctattatctctaatgagaagcaagaaattcttggaaac
 tgtttcttggaaatttgcgagaaatgcttgcacatgcagaagaacacgcaaatatgcctgtctgtgtggaaactaaagccatagtttcaacta
 tacagcgtaaataaagggtattaaaatacaagagggtgtggttgattatggtgctagattttacttttaccagtaaaacaactgtagcgtcac
 ttatcaacacacttaacgatctaaatgaaactcttgttacaatgccacttggctatgtaacacatggctttaaatttgaagaagctgctcggtatat
 gagatctctcaaagtccagctacagtttctgtttcttccactgatgctgttacagcgtataatggttatcttacttcttcttaaacacctgaag
 aacattttattgaaaccatctcacttctgtgttctataaagattggctctattcttgacaatctacacaactaggtatagaatttcttaagagaggt
 gataaaagtgtatattacactagtaatcctaccacattccacctagatggtgaagttatcaccttggacaatcttaagacacttcttcttggagaga
 agtgaggactattaagggttttacaacagtagacaacattaacctccacacgcaagttgtggacatgtcaatgacatatggacaacagtttgg
 ccaacttatttggatggagctgatgttactaaaataaaacctcataaattcacatgaaggtaaaacattttatgttttacctaatgatgacactctacg
 tgttgaggctttttagtactaccacacaactgatcctagtttctgggtaggfacatgtcagcattaaatcacactaaaaagtggaataccac
 aagttaatggtttaacttctattaaatgggcagataacaactgttacttggcactgcattgttaacactccaacaaatagagttgaagttaatcc
 acctgctctacaagatgcttattacagagcaagggtggtgaagctgtaacttttgtgcacttactttagcctactgtaataagacagtaggtg
 agttagggtgatgttagagaacaatgagttacttgtttcaacatgccaattagattcttgcaaaagagcttgaacgtggtgtgtaaaacttgtg
 gacaacagcagacaacccttaaggggtgagaagctgttatgtacatgggcacactttcttataacaatttaagaaaggtgttcagataaccttg
 tacgtgtgtaacaagctacaaaatactagtacaacaggagtcaccttttgtatgatgtcagcaccacctgctcagatgaacttaagcatg
 gtacatttacttgtctagttagtactggttaattaccagtgtggtcactataaacataaacttctaaagaaactttagattgcatagacgggtgc
 tttacttacaagctctcagaatacaaaaggtcctattaccggatgttttctacaagaaaacagttacacaacaaccataaaaccagttacttataa
 attggatggtgttgtttgtacagaaattgacctaaagttggacaattattataagaagacaattcttatttccacagagcaaccaattgatcttga
 ccaaaccaaccatataccaaacgcaagcttcgataaatttaagttgtatgtgataatacaaatgtctgatgatttaaacagtttaactggttataa
 gaaacctgcttaagagagcttaagttacatttttccctgacttaaatggtgatgtggtggctattgattataaacactacacacctctttaaag
 aaaggagctaaattgttacataaacctattgtttggcatgttaacaatgcaactaataaagccacgtataaaccaaacctggtgtatagttgt
 ctttggagcacaaccagttgaaacatcaaatctgtttgatgtactgaagtcagaggacgcgcaggggaatggataacttgcctgcgaagat
 ctaaaaccagctctgaagaagtagtggaaaatcctaccatacagaagaggttctttagtgtaattgtgaaaactaccgaaagttgtaggagac
 attatacttaaacagcaataatagtttaaaaattacagaagaggttggccacacagatctaatggctgctttagtagacaattctagcttact
 attaagaacctaataatgaattatctagagtaffaggttgaaaaccttctactcatggttttagctgctgttaatagtgtcccttgggatactatagc
 taattatgctaagccttttcttaacaaagttgttagtacaactactaacaatagttacacgggtttaaaccgtgtttgactaattatagccttattct
 ttactttattgctacaattgtgtacttttactagaagtaaaaattctagaattaaagcatctatgccgactactatagcaagaataactgttaagagt
 gtcggtaaatgtcttagaggcttcaattatttgaagtcacctaatttttctaaactgataaatattataaattggtttttactattaagtgtttgcc
 taggttctttaatctactcaaccgctgctttaggtgttttaattgtctaatttaggcacgcttcttactgactggttacagagaaggctatttgaactc
 tactaatgtcactattgcaacctactgtactggtctatacctgtagtgtttgtcttaggttttagattcttttagacacctatccttctttagaaactat
 acaaaftaccatttcatcttttaaatgggatttaactgcttttggcttagttgcagagtggtttttggcatalattcttttactaggtttttctatgtactt
 ggattggctgcaatcatgcaattgtttttagctattttgcagtaacattttattagtaattcttggcttattgtggttaataaattatctgtacaaatggc
 cccgatttcagctatggttagaatgtacatcttctttgcatcattttattatgtatggaaaagttatgtcatgtttagacggttgaattcatcaact
 tgtatgatgtgttacaacgtaataagagcaacaagagtcgaatgtacaactattgttaatggtgttagaaggctctttttagctatgctaatgga
 ggtaaaggcttttgcacactacacaattggaattgtgttaattgtgatacattctgtgctggttagtacatttattagtgatgaagttgcgagagact
 tgtcactacagtttaaagaccaataaatcctactgaccagcttcttaccatcgttagatgtgttacagtggaagaatggttccatccatctttacttt
 gataaagctggtcaaaagacttatgaaagacattctctctcattttgttaacttagacaacctgagagctaaataacactaaagggtcattgct
 attaatgttatagtttttagtgtaaatcaaatgtgaagaatcatctgcaaaatcagcgtctgtttactacagtcagcttattgtcaacctatact
 gttactagatcaggcattagtgtctgatgttggatagtgcggaagttgcagttaaaatgtttgatgcttactgtaatacgttttcatcaacttttaa

cgtaccaatggaaaaactcaaaactagttgcaactgcagaagctgaactgcaagaatgtgccttagacaatgtcttactcttatttc
 agcagctcggcaagggtttgtgattcagatfgaanaactaaagatgttgaatgtcttaaatgtcacatcaatctgacatagaagtactgg
 cgatagttgtaataactatatgtcacctataacaaagttgaaaactgacaccccgaccttggctgttattgactgtagtgcgcgcata
 taatgcgcaggtagcaaaaagtcacaacattgctttgatatggaacgttaagattcatgtcattgtctgaacaactacgaaaacaaatagta
 gtgctgctaaaaagaataacttaccttttaagttgacatgtgcaactactagacaagttgtaaatgttgaacaacaaagatagcacttaagggt
 ggtaaaattgtaataattggtgaagcagttaaftaaagttacactgtgttctttttgttctgtctattttctttaataaacctgttcatgtcatg
 tctaaacatactgactttcaagtgaaatcataggatacaaggctattgatgggtgtgctactcgtgacatagcatctacagatactgttttgta
 acaaacatgtgattttgacacatggttagtcagcgtggtgtagtataactaatgacaaagcttgccttattgattgtgcagtcataacaaga
 gaagtgggtttgtcgtgcttggcttggcctggcacgatattacgcacaactaatggtgacttttgcatttctacctagagtttttagtcagttgg
 taacatctgttacacaccatcaaaactatagagtacactgactttgcaacatcagcttgttttggctgctgaatgtacaattttaaagatgctt
 ctggaagccagttaccatattgttatgataccaatgtactagaaggttctgttcttatgaaagttacgcctgacacacgttatgtgctcatgg
 atggctctatttcaatttctaacacctaccttgaaggttctgttagagtggtaacaacCtttgattctgagtactgtaggcacggcactgtga
 aagatcagaagctgggtttgtgtactactagtggtatagggtaacttaacaatgattattacagatctttaccaggagttttctgtggttagat
 gctgtaaafttacttaataatgtttacaccactaattcaacctattgggtctttggacatatcagcatctatagtagctggtggtattgtagctatc
 gtagtaacatgccttgcctactattttatgaggtttagaagagcttttggtaatacagtcagtgatgttgcctttaaactttacttcttcttattgctt
 cactgtactctgtttaacaccagttactcatttacctgggtttattctgttatttactgtacttgacattttacttactaatgatgtttcttttttagc
 acatattcagtgatgggtattgttcacaccttttagtacctttctggataacaattgcttataatcatttatttccacaaagcatttctattggcttcttag
 taattacctaaagagacgtgtagtcttfaatgtgtttcttttagtacttttgaagaagctgcgcgtgtgcaccttttgttaataaagaaatgtatct
 aaagtgcgtagtgatgtctattacctttacgcaatataatagatacttagctctttataataagtacaagatttttagtgagcaatggataca
 actagctacagagaagctgcttgttgcacctcgcgaaaggcttcaatgacttcagtaactcaggttctgatgttctttaccaaccaccacaaac
 ctctatcacctcagctgtttgcagagtgggttttagaaaaatggcattcccatctggtaaaagttgaggggtgtatggtacaagtaactgtggtac
 aactacacttaacggctttggctttagacgttagttactgtccaagacatgtgatctgcaccttgaagacatgcttaacctaatatgaaga
 tttactcattcgaagtctaataataatttcttggtagagctggttaattcaactcagggttattggacattctatgcaaaattgtgacttaagctt
 aaggtgatacagccaatcctaagacacctaagataagtttcttgcattcaaccaggacagactttttagctttagcttgttacaatgggtca
 ccatctggtgtttaccaatgtgctatgaggeccaatttactattaagggttcttcttcttattggttcatgtggtagtgggttttaacatagattat
 gactgtgtctctttttgttcatgcaccataggaaftaccaactggagttcatgtctggcacagacttagaaggtaacttttaggaccttttgtga
 caggcaaacagcacaagcagctggtagcggacacaactattacagttaatgttttagcttgggtgtacgctgctgttataaatggagacaggtg
 gtttctcaatcgafttaccacaacttfaatgactttaaccttggctatgaagtacaattatgaaccttaacacaagaccatgttgacatacta
 ggaccttcttctgctcaaacgtgaattgccgttttagatagtggtcttcaaaaagaactactgcaaaatggtatgaatggacgtaccatattgg
 gtagtgccttattagaagatgaattacaccttttagtgggttagacaatgctcaggttactttccaaagtgcagtgaaaagaacaatcaagg
 gtacacaccactggttactcacaattttgacttcaacttttagtttagtccagagtactcaatggtcttttctttttttgtatgaaaatgcctttt
 acctttgctatgggtattattgctatgtctgcttttgaatgatgtttgcaaacataagcatgcatttctctgtttgtttttgttaccttcttggccact
 gtagcttatttfaatatggctatagcctgctagttgggtgatgcgtattatgacatggttggataggttgatactagtttctgtggttttaagctaa
 aagactgtgtatgtatgcatcagctgtagtgtactaatccttatgacagcaagaactgtgtatgatgatgggtgctaggagagtgtggacactt
 atgaatgcttgacactcgtttataaagttattatggtaattgctttagatcaagccatttccatgtgggctcttataatctctgttacttcaactactc
 aggtgtagttacaactgcatgttCttggccagaggtattgtttatgtgtgtgagatttgcctattttcttcaactggttaatacacttcaagtgt
 ataactgtagttattgtttcttaggctattttttagtcttcttttggctctttttttagtcaaccgctacttttagactgactcttgggtttatgatta
 cttagttctacacaggagtttagatataatgaattcacagggactactcccaccaagaatagcatagatgccttcaaaccaacattaaattgtt
 ggggtgttgggtggcaaacctttagtcaaaagtagccactgtacagctctaaaatgtcagatgtaaagtcacatcagtagtcttactctcagttttgc
 aacaactcagagtagaatcatcatctaaattgtgggctcaatgtgtccagttacacaatgacatttctttagctaaagatactactgaagcctttg

aaaaaatggttcactactttctgttttgccttccatgcagggtgctgtagacataaacaagctttgtgaagaatgctggacaacagggaacc
 ttacaagctatagcctcagagtttagttcccttccatcatatgcagcttttgcactgctcaagaagcttatgagcaggctgttgctaatggtgatt
 ctgaagttgttcttaaaaagttgaagaagctttgaatgtggctaaatctgaatftgaccgtgatgcagccatgcaacgtaagttggaaaagatg
 gctgatcaagctatgacccaaatgtataaacaggctagatctgaggacaagagggcaaaaagtactagtgctatgcagacaatgcttttact
 atgcttagaaaagttggataatgatgactcaacaacattatcaacaatgcaagagatggttgttcccttgaacataaacctcttacaacagc
 agccaaactaatggtgtcataccagactataacacatataaaaatacgtgtgatggtacaacattacttatgcatcagcattgtgggaaatcc
 aacaggtttagatgcagatagtaaaatgttcaacttagtgaaatagtaggacaattcacctaatttagcatggcctcttattgtaacagcttt
 aagggccaaftctgctgtcaaattacagaataatgagcttagtctgttgcactacgacagatgtcttgtgctccggtactacacaaactgctt
 gcaactgatgacaatgctttagcttactacaacacaacaaagggaggtaggtttgacttgcactgttatccgatttacaggatttgaatgggct
 agattccctaagagtgatggaactggtactatctatacagaactggaaccactttaggtttgttacagacacacctaagggtcctaaagtga
 agtatttatactttatataaggtataaacaacctaaatagaggtatggtacttggtagtttagctgccacaglacgtctacaagctggtaatgca
 cagaagtgcctgccaattcaactgtattatctttctgtgcttttgccttagatgctgctaaagcttacaagattatctagctagtgggggacaac
 caatcactaattgtgtaagatggtgtgtacacacactggactggcagcaataacagttacaccggaagccaatgatgcaagaatcttt
 ggtggtgcatcgtgtgtctgtactgccgtgccacatagatcatccaaatcctaaaggattttgacttaaaaggttaagtagtacaataact
 acaacttgcctaatgacctgtgggttttacttaaaaacacagctctgaccgctgcgggtatgtgaaaggttatggctgtagttgtgatcaa
 ctccgcgaaccatgctcagctcagctgatgcacaatcgttttaaacgggttgcgggttaagtgagcccgtcttacaccgtgcggcacag
 gcactagtactgatgtcgtatacagggttttgcacttacaatgataaagtagctgggtttgctaaattcctaaaaactaattgttgcctcca
 agaaaaggacgaagatgacaatttaattgattcttacttttagttaaagagacacactttcttaactaccaacatgaagaaacaattataatfta
 cttaaggattgtccagctgttgcataacatgacttcttaagtttagaatagacgggtgacatggtaccacatatacacgtcaacgtctactaat
 acacaatggcagacctgctatgctttaaaggcattttgatgaaggttaattgtgacacattaaaagaaatactgtcacatacaattgtgtgatg
 atgattattcaataaaaaggactggtatgattttgtagaaaaccagatatactacgcgtatagccaacttaggtgaacgtgtacgccaagct
 ttgttaaaaacagtacaattctgtgatccatgcgaaatgctggtattgttgggtactgacattagataatcaagatctcaatgtaactggtatg
 atttccgtgattcatacaaaaccacgccaggtagtgagggttctgttagattcttatttattcattgtaatgctatataacttaccagggtt
 taactgcagagtcacatgttgacactgacttaacaaagccttacaftaagtgggattttgtaaaatagacttcacggaagagagggttaaaactc
 tttgaccgttatttaaatattgggatcagacataaccaccaaaftgtgtaactgttggatgacagatgacttgcattgtgcaaacfttaattgtt
 ttattctctacagtgttccacctacaagtttggaccactagtgagaaaaatattgttgatggtgttccattttagtttcaactggataccacttc
 agagagctaggtgtgtacataatcaggatgtaactacatagctctagacttagtttaaggaacttctgtgtatgctgctgacctgctatgc
 acgtgcttctggtaatctattactagataaacgcactacgtgctttcagtagctgcaactactaacaatgttgcctttcaactgtcaaacccgg
 taatttaacaaagacttctatgactttgctgtgtctaagggtttcttaaggaaggaagttctgttgaftaaacacttcttcttctcaggatgg
 taatgctgctatcagcgattatgactactatcgttataatctaccaacaatgtgtgatacagacaactactattgtagtgaagttgtgataagt
 actttgattgttacgatggtgctgtatfaatgctaaccaagtcacgtaacaacctagacaaatcagctggtttccatttaataatggggtaa
 ggctagactttattatgattcaatgagttataggatcaagatgcacttttgcataataaaaacgtaatgtcatccctactataactcaaatgaat
 cttaagtagccattagtcaagaatagagctcgcaccgtagctggtgtctctatctgtagtactatgaccaatagacagtttcatcaaaaatta
 ttgaaatcaatagccgccactagaggagctactgtagtaattggaacaagcaaaftctatggtggttggcacaacatgttaaaaactgtttata
 gtgatgtgaaaaccctcacttattgggttgggattatcctaaatgtgatagagccatgcctaactgcttagaattatggcctcacttgttcttg
 ctgcaaacatacaacgtgtgtacttgcacaccgttctatagattagctaatgagtgctcaagattgagtgaaatggtcatgtgtggcg
 gttcactatatttaaacaggtggaacctcatcaggagatgccacaactgcttatgctaagtgttttaacatttgaagctgtcacggcca
 atgttaatgcacttttactactgatgtaacaaaatgccgataagtagtccgcaatttacaacacagactttatgagtgctctatagaaatag
 agatgttgacacagactttgtaatgagttttagcctatatttgcgtaaacatttctcaatgatgatactctctgacgatgctgttgtgttcaatag
 cacttatgcatctcaaggctagtggctagcataaagaacttaagtcagttcttattatcaaaacaatgttttatgctgaagcaaaatgttga

ctgagactgacctactaaaggacctcatgaattttgcctcaacatacaatgctagttaaacagggtgatgattatgtgtaccttacctaccag
 atccatcaagaatcctaggggcccggctgttttagatgatacgtaaaaacagatggtacacttatgattgaacggttcgtgtcttttagctatag
 atgcttaccttactaaacatcctaatacaggagatgctgatgctttcatttgcacttacaatacataagaaagctacatgatgagttaacagg
 acacatgtagacatgtattctgttatgcttactaatgataacactcaaggattgggaacctgagttttatgaggctatgtacacaccgcataca
 gtcttaccaggctgttggggcttgttctttgcaattcacagactcattaagatgtgggtcttgcatacglagaccattcttatgttgaatgctg
 ttaccgacctgtcatatcaacatcacataaattagcttctgttataatccgtatgtttgcaGtgcctccaggttgtgatgtcacagatgtgactcaa
 ctttacttaggaggtatgagctattattgtaaacacataaaccacccattagtttccattgtgtgctaataggacaagttttggttatataaaaaata
 catgtgttggtagcgataatgttactgactttaatgcaattgcaacatgtgactggacaaatgctgggtgattacatttagctaacacctgtactga
 aagactcaagctttttgcagcagaaacgctcaaagctactgaggagacatttaaaactgtcttattggattgctactgtacgtgaagtctgtctg
 acagagaattacatctttcatgggaagttgtaaacctagaccaccacttaaccgaaattatgtctttactggttactgttaactaaaaacagta
 aagtaacaataggagagtagacctttgaaaaagggtactatggtgatgctgttgtttaccgaggtacaacaactacaataaattggtggtgat
 tttttgtgctgacatcacatacagtaatgccatfaagtgcaactacactagtccacaagagcactatgttagaattactggcttataccaaca
 ctcaatatctcagatgagtttctagcaatgttgcaaatatcaaaaagggttgatgcaaaagattctactccagggaccacctggactgggt
 aagagtcattttgctattggcctagctctactacctctgctcgcatalgtgtatacagcttgcctcatgccgctgttgatgactatgtgaga
 aggcattaaaatatttgcctatagataaatgtagtagaattataacctgcacgtgctcgtgtagagttttgataaaitcaaagtgaattcaacatt
 agaacagtagtcttttactgtaaatgcaatgctgagacgacagcagatatagttgcctttgatgaaattcaatggccacaaattatgattg
 agtgttgaatgccagattacgtgtaagcactatgtgtacattggcgacctgctcaattacctgcaccacgcacattgtaactaaggga
 cactagaaccagaatattcaattcagtggttagacttatgaaaactataggtccagacatgttctcggaaactgtcggcgttgcctgctgaa
 attgttgacactgtgagtgctttggttatgataaataagcttaaacacataaagacaaatcagctcaatgctttaaattttataagggtgtat
 cacgcatgatgttcatctgcaatcaacagccacaaataggcgtgtaagagaattccttacacgtaacctgctggagaaaagctgtcttt
 atttaccttataattcacagaatgctgtagcctcaaaagattttggactaccaactcaaacgttgattcatcacagggtcagaatagactat
 gtcatactcactcaaaccactgaacagctcactcttgaatgtaaacagatttaattgttctattaccagagcaaaaagtaggcatactttgcata
 atgtctgatagagacctttatgacaagttgcaatttacaagcttgaattccacgtaggaatgtggcaactttacaagctgaaaatgtaacagg
 actttttaaagattgtagtaaggtaactactgggttacctctacacagccctacacacctcagtggtgacactaaattcaaaactgaaggttt
 atgtgttgacataacctggcatacctaaggacatgacctatagaagactcatctatgatgggttttaaattgaattatcaagtttaattggtaccct
 aacatgtttatcaccgcgaagaagctataagacatgtacgtgcatggattggcttcgatgtcaggggtgtcatgctactagagaagctgtt
 ggtaccaatttaccttacctaggtttttctacaggtgtaacctagttgctgtactacaggttatgttgatacactaataatacagattttcc
 agagttagtgtaaaccaccgctggagatcaatttaaacacctcataccacttatgtacaaggacttcttggaaatgtagtgcgtataaaga
 ttgtacaaatgtaagtacacacttaaaaatctctgacagagtcgtatttgccttatgggcacatggcttgagttgacatctatgaagtattt
 gtgaaaataggacctgagcgcacctgttgcctatgtgatagacgtgccacatgctttccactgcttcagacacttatgctgttggcatctct
 attggatttgattacgtctataatccgtttatgattgatgttcaacaatggggttttacaggtaacctacaaagcaaccatgatctgtattgtcaagt
 ccatggtaatgcacatgtagctagttgtgatgcaatcatgactaggtgtctagctgtccacaggtgctttgtaagcgtgttactggactattga
 atacctataattggtgatgaactgaagattaatgcggcttftagaaaggttcaacacatggttgttaaagctgcaattatgacagacaaattccc
 agttctcagacattggtaaccctaaagctattaagtgtgtacctcaagctgatgtagaatggaagttctatgatgcacagcctttagtgaca
 aagcttataaaatagaagaattattctattctatgccacacattctgacaattcacagatgggtgatgcctattttggaattgcaatgtcgataga
 taccctgtaattccattgttttagatttgacactagagtgctatcctaaccttaactgcttgggtgtgatgggtggcagttgtatgtaataaacat
 gcaatccacacaccagcttttgataaaagtcttttgaatttaaaacaattaccattttctattactctgacagtcctatgtgagctcatggaaaa
 caagtagtgcagatagattatgtaccactaaagtctgctacgtgtataaacagttgcaatttaggtgtgtctgtgtagacatcatgctaat
 gagtacagattgtatctcgtatgcttataacatgatgatctcagctggcttttagcttggggtttacaacaatttgatacttataacctctggaaca
 cttttacaagacttcagagtttagaaaatgtggcttttaattgttgaataaggacactttgatggacaacagggtgaagtaccagtttctatcat

taataacactgtttacacaaaagttgatgggtgatgtagaattgtttgaaaataaaacaacattacctgttaatgtagcatttgagctttgggcta
 agcgcaacattaaaccagtagcagaggtgaaaataactcaataattgggtgtggacattgctgctaatactgtgatctgggactacaaaagag
 atgctccagcacatatactactattgggtgtttgtctatgactgacatagccaagaaaccaactgaaacgatttggcaccactcactgtcttttt
 gatggtagagttgatggtaagtagacttattagaatgccgtaatgggtgtcttattacagaaggtagtgttaaaggtttacaacctctgta
 ggfccaaaacaagctagtcttaattggagtcacattaattggagaagccgtaaaaaacagttcaattattataagaaagttgatgggtgttcca
 acaattacctgaaacttacttactcagagtagaaaattacaagaattaaaccaggagtcfaatggaaattgatttcttagaattagctatggat
 gaattcattgaacgggtataaattagaaggctatgccttcgaacatatacgtttatggagatttttagtcatagtcagttaggtggtttacatctactgat
 tggactagctaaacgttttaaggaatcaccttttgaattagaagattttatctatggacagtagcagttaaaaacttttcataacagatgcgcaa
 acaggttcatctaagtgtgtgttctgttattgatttacttctgatgattttgtgaaataataaaaatcccaagatttactgtagtcttaaggtgtc
 aaagtgactattgactatacagaaatttcaattatgctttgggtgaaagatggccatgtagaaacattttacccaaaattacaatctagcaagcgt
 ggcaaccgggtgttctatgcctaattttacaaaatgcaaagaatgctattagaaaagtgtgaccttcaaaattatgggtgatagtcaacatta
 cctaaaggcataatgatgaatgctgcaaaaatactcaactgtgtcaatattaaacacattaacattagctgtacctataatagagattatc
 attttgggtgctggttctgataaaggagttgcaccaggtacagctgttttaagacagttggttgcctacgggtacgctgcttctgattcagatctta
 atgactttgctctgatgcagattcaactttgattgggtgattgtgcaactgtacatacagctaaataaagggatctcattattagtgatgtacgac
 cctaaagactaaaaatgttacaagaagaatgactctaaagagggtttttcacttaccatttgggtttatacaaaaaagctagctcttggaggt
 tccgtggctataaagataacagaacattcttggaaatgctgatctttataagctcatgggacacttgcctgggtggacagcctttgtactaatgtg
 aatgcgtcatcatctgaagcatttttaattggatgtaattatcttggcaaacacgcgaacaaatagatgggtatgctatgcaaaattacat
 tttggaggaatacaaatccaattcagttgtcttctatctttatttgacatgagtaaatttcccctaaattaaggggtactgctgttatgctttaaa
 agaagggtcaaatcaatgatatgattttatcttcttagtaaaggtagacttataaftagaaaaacaacagagttgttatttctagtgatgttctgt
 taacaactaaacgaacaatgtttgttttctgtttattgccactagctctagtcagtggttaatttacaaccagaactcaattaccccctgat
 aactaattctttcacagtggtgtttattaccctgacaaaagtttcagatcctcagttttacattcaactcaggacttgttcttacccttttccaat
 gttacttgggtccatgctatacatgtctctgggaccaatggtactaagaggtttgataaccctgtcctaccattaatgatgggtttattttgcctcc
 aTtgagaagttaacataataagaggctggatttttggfactacttttagattcgaagaccagtcctacttattgtaataacgctactaatgtt
 ttataaagctgtgaatttcaattttgaaatgatccattttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaagttggatggaaagtgagttcagagttt
 attctagtgcgaataattgcacttttgaatattgtctctcagcctttctatggaccttgaaggaaaacagggttaatttcaaaaatcttagggaattt
 gtgttaagaatattgatggttattttaaataatattctaagcacacgcctattaatttagtgctgatctccctcagggttttctggctttagaacat
 tggtagatttgccaataggtattaacatcactaggttcaactttacttgcctttacGtagaagttattgactcctggtgattcttctcaggttga
 cagctgggtgctgcagcttattatgtgggttatttcaacctaggactttctattaaaataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactg
 tgcacttgacctctctcagaacaaaagtgtacgttgaatccttactgtgaaaaaggaatctatcaaaacttcaacttttagagtccaaccaa
 cagaatctattgttagatttctaataattacaacttgccttttgggtgaagttttaaaccaccagatttgcactctgtttatgcttggaaacagga
 agagaatcagcaactgttfgctgatttctgtcctatataatccgcacatfcttccacttttaagtgttatggagtgtcctactaaattaaatga
 tctctgcttactaatgctatgcagattcatttgaattagaggtgatgaagtcagacaaatcgtccaggggcaaacggaagattgctgatta
 taattataaattaccagatgattttacaggctgcgtttatagcttgaattcaacaacttctgattctaaaggttgggtgtaattataattacctgtatag
 attgttttaggaagttaacttcaaaccttttgagagagatattcaactgaaatctatcaggccggtagcacaccttgaatgggttgaaggtttt
 aattgttactttcttacaatcatatggtttccaaccactaatgggttgggttaccacacatacagagtagtagtactttcttttgaacttctacatg
 caccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttgggttaaaaacaaatgtgtcaatttcaactcaatggtttaaaccaggcacaggtgttc
 ttactgagttaacaaaaagtttctgctttccaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacactttag
 attcttgacattacacatgttcttttgggtgtcagtttataacaccaggaacaaataacttcaaccaggttctgttctttatcaggatgttaac
 tgcacagaagtcctgttctatcatgcagatcaacttactcctacttggcgtgtttattctacaggttctaatttttcaaacacgtgcaggctg
 tttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagttgtacataccattgggtgcaggtatagcgtatgctatcagactcagcaatccatca

ttgectacactatgtcacttgggtgcagaaaattcagttgcttacttaataactctattgccataccacaaaattttactattagtgttaccacagaa
attctaccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaactgaatgcagcaatcttttggcaatatggca
gtttttgtacacaattaaaccgtgctttaactggaatagctgtgaacaagacaaaaacaccaagaagttttgcacaagtcaaacaatttac
aaaacaccaccaattaaagatttgggtggttttaatttttcacaaatattaccagatccatcaaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctac
ttttcaacaaagtgcacttgcagatgctgcttcatcaacaatattgggtgattgccttgggtgatattgctgctagagatctcatttgcgctcaa
aatttaacggacttacagttttaccaccttacttactgacgaaatgattgcgcaatatacatccgcattgtagccggaactattacatccggatg
gacttttggcgcagcgTagcattacagattccattcgctatgcaaatggcttataggtttaacgggtatagccgttacgaaaacgtactttatg
agaatcaaaaacttatcgtcaaccaatttaattccgctatcggtaagattcaggattcattgtctagtagtctgtagtgcactcggtaagttgcaag
acgtagtgaatcaaaaacgctcaagcacttaatacactcgttaaacagcttagttctaattttggcgaatttctagtggttaacgatatactatc
tagactcgataaagtgaagccgaagtgcaaatcgatagattgattaccggtaggtgcaatcattgcaaacatacgttacacagcaattgatt
agggccgcagagatacgcgctagcgtcaatctcgcagctactaaaatgtctgaatgcgctactcggacaatctaaacgtgctgattttgcggt
aagggatcatcttattgtctttccacaatctgcacctcacggagctggttttacacgttacttattgtccagctcaagagaaaaattttacaa
ccgctcctgctatttgcatacggtaaggcacaattttctagagagggcgctattcgttttaacgggtacacattgggttcgttacacaacgtaattt
ttacgaacctcaatttactactgataatacattcgtatcaggttaattgtgactgtagtgataggtatcgttaataatacagtttacgatccacttc
aacctgaactcgatagttttaaaggaactcgataaglattttaaaaatcatacatcacctgacgtcacttagccgatatttcagggtattaacg
ctagtgctgtaacattcaaaaagagattgatagacttaacgaagtcgctaaaaatcttaacgaatcacttatcgatctgcaagagttaggttaag
tatgagcaatatattaatggccttgggtatatttggtaggctttatagccggattgatcgcaatcgttatgggtacaattatggtattgtatgaca
tcatgttgcatacttaaggatgttgcctatcgttgaatttgacgaagacgattccgaaccagtgcttaaggcgtaagttac
attatacataaacgaacttatggattgtttatgagaatcttcacaaatggaactgtaactttgaagcaaggtgaaatcaaggatgctactcctca
gattttgtcgcgctactgcaacgataccgatacaagcctcactcccttcggatggcttattgttggcgttgcacttctgctgttttcagagcg
cttccaaaatcataacctcaaaaagagatggcaactagcactctcaagggtgttactttgttgaacttgcgttgttgtttgtaacgttta
ctcacacctttgtcgttgcgtgctgacctgaagccctttctctatctttatgcttttagctacttcttgcagagtataaactttgtaagaataata
atgaggtttggctttgctggaaatgccgttccaaaacccattcttatgatgccaacttttcttctgctggcactaactaattgttacgactattgt
ataccttacaatagtgaactcttcaattgtcattacttcaggtgatggcacaacaagtcctatttctgaacatgactaccagattgggtgttatac
tgaaaaatgggaactctggagtaaaagactgtgttattacacagttacttcacttcagactattaccagctgtactcaactcaattgagtacaga
cactgggtgtgaacatgttaccttctctacataaaaattgtgatgagcctgaagaacatgtccaaattcacacaatcgacggttcatccgg
agttgtaacccagtaatggaaccaatttatgatgaaccgacgacgactactagcgtgctttgtaagcacaagctgatgagtacgaacttatg
tactcattcgttccggaagagacaggtacgttaatagttatagcgtacttcttttcttcttctgttctggttacttctgtagttactagccatctta
ctgcgcttcgattgtgtgcgactgctgcaatattgttaacgtgagcttgtaaaaccttcttttactgttactctcgtttaaanaatcgaattctct
agagttctgatcttctgcttaaacgaactaaatattatattagttttctgtttggaacttaatttttagccatggcagattccaacgggtactattac
cgttgaagagcttaaaaagctccttgaacaatggaacctagtaataggttcttcttctacatggatttcttctacaatttgcctatgccaac
aggaataggtttttgatataaattaagtttaatttctctggctgttatggccagtaacttttagcttgtttgtcttgcgtgtttacagaataaattg
gatcaccggtggaattgctatcgcaatggcttgcctttaggctttagtggtcagctacttacttcttctcagactgtttgcgctacgcgct
tccatgtggctcattcaatccagaaaactaacatttctcaacgtgccactccatggcactattctgaccagaccgcttctagaaagtgaactcgt
aatcggagctgtgatcttcgtggacatcttctgattgctggacaccatctaggacgctgtgacatcaaggacctgcctaaagaaatcactgtt
gctacatcacgaacgctttcttattacaaattgggagcttcgcagcgtgtagcaggtgactcaggtttgctgcatacagtcgctacaggattg
gcaactataaattaaacacagaccattccagtagcagtgacaatattgctttgcttgcagtaagtgacaacagatgttcatctcgttacttct
aggttactatagcagagatafactaattattatgaggacttttaaagttccatttggaaacttattacatcataaacctcataaataaattatc
taagtcactaactgagaataaataattctcaattagatgaagagcaaccaatggagattgattaaacgaacatgaaaattattctttcttggcact
gataacactcgtacttgtgagctttatcactaccaagagtgtgttagaggtacaacagtaacttttaaaaagaaccttgccttcttgaacatacga

gggcaattcaccatttcatcctctagctgatacaaaattgcactgacttgccttagcactcaatttgctttgcttgcctgacggcgtaaaacac
gtctatcagttacgtgccagatcagttcacctaaactgttcatcagacaagagggaagtcaagaacttacttccaattttcttattgttgcggc
aatagtgttataacactttgcttcaactcaaaagaagacagaatgattgaactttcattaattgacttctatttggcttttagcctttctgctatt
ccttgitttaattatgcttattatcttttggttctcaactgaactgcaagatcataatgaaactgtcacgcctaaacgaacatgaaatttctgtttctt
aggaatcaccacaactgtagctgcaattcaccagaatgtagttacagtcagtaacatcaacatagtagttgatgaccctgtcctat
tcacttctattctaaatggtatattagagtaggagctagaaaaacagcaccttaattgaattgtgcgtggatgaggctggttctaaatcaccatt
cagtaacatgatacggtaattatacagtttctgttccacttttacaattaattgccaggaaactaaattgggtagctttagtagtgcgttgcgttc
tatgaagacttttagagtatcatgacgttcgttggtttagatttcatctaaacgaacaaactaaaatgtctgataatggacccccaaaacagcg
aaatgcacccccgacttgcgttgggtggaccctcagattcaactggcagtaaccagaatggagaacgcagtgggggcgcatcaaaacaacg
tcggcccaaggtttaccataaactgcgttgggtcaccgctcactcaacatggcaaggaagacctaaattccctcgaggacaagg
cgttccaattaacaccaatgacgtccagatgaccaattggctactaccgaagactaccagacgaattcgtgggtggtagcggtaaaatga
aagatcagccaagatggtatttctactacctaggaactggccagaagctggacttccctatggtgtaacaaagacggcatcatatggg
ttgcaactgaggggagccttgaatacaccaaaagatcacattggcaccgcaatcctgtaacaaatgctcaatcgtctacaacttctcaag
gaacaacattgccaaaaggcttctacgcagaaggagcagagggcgagcaagccttctcgttctcactacgtagtcgaacagttc
aagaaattcaactccaggcagcagtaggggaacttctcctgctagaatggctggcaatggcggtagctgctcttcttctgctgcttga
cagattgaaccagcttgagagcaaaatgtctggtaaggccaacaacaaggccaaactgtcactaagaaatctgctgctgaggcttcta
agaagcctcggcaaaaacgtactgccactaaagcatacaatgaacacaagcttccggcagacgtggccagaacaaacccaaggaaattt
tggggaccaggaactaatcagacaaggaactgattacaacattggccgcaattgcacaatttccccagcgttcagcgttctcggaa
tgtcgcgcatggcatggaagtcacacctcgggaactgggtgacctacacaggtgccatcaaatggatgacaaagatccaaatttcaa
gatcaagtcatttctgtaataagcatattgacgcatacaaacattcccaccaacagagcctaaaaaggacaaaaagaagaaggctgatga
aactcaagccttaccgcagagacagaagaacagcaactgtacttcttctcctgctgcagatttggatgatttctccaaacaattgcaaca
tccatgagcagtgctgactcaactcaggcctaaactcatgcagaccacacaaggcagatgggctatataaacgtttcgttttccgtttacga
tatatagtctacttctgctcagaatgaattctgtaactacatagcacaagtagatgtagttaactttaatctcatagcaatctttaatcagtggt
aacattagggaggacttgaagagccaccacatttaccgaggccacgaggtagcagtgatcagtgatgaacaatgctagggagag
ctgctatataggaagagccctaatgtgtaaaatattttagtagtctatccccatgtatttfaatagcttcttaggagaatgacAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAA

[00242] В различных вариантах осуществления, в отношении SEQ ID NO:4, мутация происходит в 3009 Т на А (Ile на Lys): [3009 : 3009]; 9199 С на Т, молчащая: [9199 : 9199]; 11524 С на Т, молчащая: [11524 : 11524]; 16388 G на A (Ser на Asn): [16388 : 16388]; 21846 t на C (Ile на Thr): [21846 : 21846]; 22296 g на A (Arg на His): [22296 : 22296]; 24201 Т на С (Val на Ala): [24237 : 24237]; и/или добавление 36 нуклеотидов actaattctcctcggcgggcacgtagttagctagt (SEQ ID NO:5): [23594].

[00243] SEQ ID NO:6 (перекодированный шиповидный белок по сравнению с шиповидным белком дикого типа USA/WA1/2020).

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLF
LPFFSNVTWFHAIHVSNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASIEKSNIIRGWIFGTTLDSTQS
LLIVNNATNVVIKVFCEFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
LMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINIT
RFQTLALRRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALD
PLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWN

KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQT
 GKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFRDISTEIYQ
 AGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNL
 VKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSF
 GVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIG
 AEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPTNFTISVTTEIL
 PVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVK
 QIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARD
 LICAQKFNGLTVLPPLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGVALQIPFAMQMAYRFN
 GIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQL
 SSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAAT
 KMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVITYVPAQEKNFTTAPAICHDG
 KAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPEL
 DSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVUNIQKEIDRLNEVAKNLNEIDLQELGK
 YEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCCMTSCCSCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPV
 LKGVKLHYT

SEQ ID NO:7 - (деоптимизированный SARS-CoV-2); 29853 п.о., сайт расщепления
 фурином удален

attaaaggtttatacttccaggttaacaaccaaccaacttccgatctctttagatctgttctctaaacgaactttaaactctgtg
 gctgtcactcggctcatgcttagtcactcacgcagtataaataaactaactgtcgttgacaggacacgagtaactcgtctatcttctgc
 aggctgcttaccggttctgctcgttgcagccgatcatcagcacatctaggttctcgggtgtgaccgaaaggttaagatggagagccttgc
 cctggttcaacgagaaaacacacgtccaactcagttgcctgtttacaggttcgcgacgtgctcgtacgtggcttggagactccgtggag
 gaggtcttatcagaggcacgtcaacatcttaagatggcacttgtgcttagtagaagttgaaaaggcgtttgctcaactgaacagccct
 atgtgttcatcaaacgttcggatgctcgaactgcacctcatggtcatgttatggttagctgtagcagaactcgaaggcattcagtagctc
 tagtggtgagacacttgggtccttgcctcatgtggcgaaataaccagtggttaccgcaaggttcttctctgtaagaacggttaataagga
 gctggtggccatagttaccggcggcatctaaagtcattgacttaggcgacgagcttggcactgatccttatgaagatttcaagaaaactgga
 aactaaacatagcagtggtgtaccctgaactcatgctgagcttaacggaggggcatacactcgtatgctgataacaactctgtggcc
 ctgatggctaccctcttagtgcaataagacctctagcacgtgctggtaaaccttcatgcactttgtccgaacaactggacttattgacacta
 agaggggtgtactgctgccgtgaacatgagcatgaaattgcttggtagacggaacgttctgaaaagagctatgaattgcagacacctttg
 aatfaaattggcaagaaattgacacctcaatggggaatgccaattttgtattcccttaattccataatcaagactattcaaccaagggt
 tgaaaagaaaaagcttgatggctttatgggtagaattcgtctctatccagttgcgtcaccataatgaatgcaaccaaatgtgccttcaactc
 tcatgaagtgtatcattgtggtgaaactcatggcagacgggcgattttgtaagccacttgcgaattttgtggcactgagaatttgactaaa
 gaagtgccactacttgggttacttaccceaaaatgctgttgttaaaatttattgtccagcatgtcacaatcagaagtaggacctgagcatagt
 ctgcccgaataccataatgaatctggcttgaaaaccttctctgtaaggggtgctgcactattgcttggagctgtgtgttctcttatgttggt
 gccataacaagtgtgcttattgggtccacgtgctagcgtacaataggttgaaccatacaggtgttgggagaaggttccgaaggtcttaa
 tgacaaccttctgaaatactccaaaaagagaaagtcaacatcaatattgttggtgactttaaactaatgaagagatgccattatttggcatc
 tttctgctccacaagtcttttgggaaactgtgaaaggttggattataaagcattcaacaaattgtgaatcctgtgtaattttaaagttaca
 aaaggaagactaaaaaggtgctggaatattggtgaacagaaatcaactgagtcctctttagcatttgcacagaggctgctcgtgttg
 tacgatcaattttctcccactcttgaactgctcaaaattctgtgcgtgtttacagaagggcgtataacaatactagatggaatttcacagta
 ttcactgagactcattgatgctatgatgttcacatctgatttggctactaacaactagttgtaatggcctacattacaggtgggtgttgcattga

ctctgcagtggttaactaacatctttggcactgtttatgaaaaactcaaacccgtccttgattggcttgaagagaagttaaggaagggttagag
 tttcttagagacgggtgggaaattgttaatttatctcaacctgtgcttgtgaaattgctgggtggacaaattgtcacctgtgcaaaggaaattaag
 gagagtggtcagacattcttaagcttgaataaaatffffggcttgggtgctgactctatcattattgggtggagctaaacttaaaccttgaattta
 ggtgaaacattgtcacgcactcaaagggattgtacagaaagtgtgtaaaatccagagaagaaactggcctactcatgcctctaaaagcccc
 aaaagaaatfatcttcttagagggagaacacttcccacagaaagtgttaacagaggaaagttgcttgaaaactgggtattacaaccattagaa
 caacctactagtgaagctgttgaagctccattgggtgtacaccagttgtattaacgggcttatgtgctcgaatcaaagacacagaaaagt
 actgtgcccttgacctaataatgatggttaacaacaataacctcacactcaaaggggtgcaccaacaaggttacttttgggtgatgacactgt
 gatagaagtgtcaaggttacaagagtgtgaatatacttttgaacttgatgaaaggattgataaagtaacttaataagaagtgtctctgcctatacag
 ttgaactcgggtacagaagtaaatgagttcgcctgtgttggcagatgctgtcataaaaactttgcaaccagtatctgaattacttacaccactg
 ggcattgatttagatgagtgagatggctacatactacttatttgatgagctgggtgagtttaaatggcttcacatatgtattgtctttctacct
 ccagatgaggatgaagaagaaggtgattgtgaagaagaaggtttagccatcaactcaatagatggtactgaagatgattaccaag
 gtaaacctttggaatttgggtccacttctgtgctcttcaacctgaagaagagcaagaagaagattggttagatgatagcaacaactgtt
 ggtcaacaagacggcagtgaggacaatcagacaactactatcaacaattgttaggttcaacctcaattagagatggaacttacaccagtt
 gttcagactattgaagtgaatagtttagtggttatttaaaacttactgacaatgtatacattaaaaatgcagacattgtggaagaagctaaaaag
 gtaaaaccaacagtggttgaatgcaccaatgtttaccttaaacatggaggaggtgttgcaggagccttaataaggctactaacaatgcc
 atgcaagttgaatctgatgattacatagctactaatggaccacttaagtggtggtagttgtgttttaagcggacacaacttctgtaaacactgt
 ctctatgttgcggcccaaatgtaacaaaaggtgaagacattcaacttctaagagtcttatgaaaatttaacagcacgaagttctacttgc
 ccattatfatcagctggtattttgggtgctgacctatacattcttaagagttgtgtagatactgttcgcacaaatgtctacttagctgtcttgata
 aaaatctctatgaaaactgtttcaagcttttggaaatgaagagtgaagaagcaagttgaacaaaagatcgtgagattcctaaagaggaagt
 taagccattataactgaaagtaaaccttcagttgaacagagaaaacaagatgataagaaaatcaagcttgtgttgaagaagttacaacaact
 ctggaagaaactaagttcctcagaaaaactgttactttatattgacattaatggcaatcttcatccagattctgccactctgttagtgacattga
 catcactttctaaagaaagatgctccatataatagtggtgatgttgaagagggtgttttaactgctgtgtttacactactaaaaaggctggt
 ggcactactgaaatgctagcgaagctttgagaaaaagtgccaacagacaattatataaccacttaccgggtcagggtttaaattgtttact
 gttagaggaggcaaagacagtgcttaaaaagtgtaaaagtgccttttacttaccatctattatctctaatgagaagcaagaatcttggaac
 tgtttcttggaaattgcgagaaatgctgcacatgcagaagaacacgcaaatatgcctgtctgtgtgaaactaaagccatagtttcaacta
 tacagcgtaaatataaggttataaatacaagagggtgtgttattggtgcttagattttacttttaccagtaaaacaactgtagcgtcac
 ttatcaacacacttaacgatctaaatgaaactctgttacaatgccacttggctatgtaacacatggcttaaatggagaagctgctcggtat
 gagatctctcaaagtgccagctacagtttctgttcttccactgatgctgttacagcgtataatggttatcttacttcttctaaacacctgaag
 aacattttattgaaaccatctcacttctgttctctataaagattggtcctattctggacaatctacacaactaggtatagaatttctaagagaggt
 gataaaagtgtatattacactagtaatcctaccacattccactagatggtgaagttatcaccttgcacaaatcttaagacacttcttcttggaga
 agtgaggactattaaggtgtttacaacagtagacaacattaacctccacacgcaagttgtggacatgcaatgacatatggacaacagtttgg
 ccaacttattggatggagctgatgttactaaaataaaacctcataattcacatgaaggtaaaacattttatgttttacctaatgatgacactctac
 tgttgaggctttttagtactaccacacaactgatcctagtttctgggttaggtacatgtcagcattaaatcacactaaaaagtggaataccac
 aagttaatggttacttctattaaatgggcagataacaactgttatcttggcactgcattgttaacactccaacaatagagttgaagttatcc
 acctgctctacaagatgcttattacagagcaagggctggtgaagctgtaacttttgtgcacttacttagcctactgtaataagacagtaggtg
 agttaggtgatgttagagaacaatgagttacttgtttcaacatgccaatttagattcttgcaaaagagcttgaacgtggtgtgtaaaacttgt
 gacaacagcagacaacccttaaggggtgagaagctgttatgtacatgggcacactttctatgaacaatttaagaaaggtgttcagataccttg
 tacgtgtgttaacaagctacaaaatactagtacaacaggagtcacctttgttatgatgtcagcaccacctgctcagatgaacttaagcatg
 gtacattacttgtctagttagtacactggttaattaccagttggtcactataaacatataacttctaagaaacttattgcatagacgggtgc
 tttacttacaagctctcagaatacaaaaggtcctattacggatgttttctacaagaaaacagttacacaacaaccataaaaccagttacttataa

attggatggtgtgtttgtacagaaattgacctaaagtggacaattattataagaaagacaattcttatttcacagagcaaccaattgatcttga
 ccaaaccaacatataccaaacgcaagcttcgataatftaaagttgtatgtgataatacaaatgtctgatgattaaaccagttaactgggtataa
 gaaacctgctcaagagagcttaagttacatftttccctgacttaaatgggtgatgtgggtgctattgattataaacactacacacctctttaag
 aaaggagctaaattgtacataaacctattgtttggcatgttaacaatgcaactaataaaagccacgtataaaccaaacctgggtgtacggtg
 ctftggagcacaaccagttgaaacatcaaatcgttgatgtactgaagtcagaggacgcgcagggaatggataatcttgcctgcaagat
 ctaaaaccagtctctgaagaagtagtggaaaatctaccatacagaaagacgttcttgagtgaatgtgaaaactaccgaagttgtaggagac
 attatactaaaccagcaataatagttfaaaaattacagaagaggtggccacacagatctaatggctgcttatgtagacaattctagtcttact
 attaagaacctaataatgaattatctagagtattaggttgaaaacctgctactcatggttagctgctgtaaatagtgccttgggatactatagc
 taattatgctaagccttttctaaacaagttgttagtacaactactaacatagttacacgggtgttaaacctgtttgtactaattatagccttattct
 ttactttattgctacaattgtgacttttactagaagtcacaaftctagaattaaagcatctatgccgactactatagcaagaatactgtaagagt
 gtcggtaaatfttcttagaggctcatttaattattgaaagtcacctaattttctaaactgataaatattataatftggttttactattaagtgttgc
 taggttcttaactactcaaccgctgctttagggtgttaaatgtctaatttaggcatgccttctactgactggttacagagaaggctatttgaactc
 tactaatgtcactattgcaacctactgactggftctatacctgtagtgtttgctttaggtttagattctttagacacctatccttctttagaaactat
 acaaaftaccatttcatcttttaaatgggatttaactgctttggcttagttgcagagtggttttggcatalacttttactaggttttctatgactt
 ggattggctgcaatcatgcaattgttttcagctattttgcaglacattttattagtaattcttggcttatgtggtaataatlaacttctgacaaatggc
 cccgatttcagctatggtagaatgtacatcttcttgcacatftttattatgtatggaaaagttatgtgcatgtttagacggttgtaattcatcaact
 tgtatgatgtttacaacgtaataagagcaacaagagtcgaatgtacaactattgtaatgggtttagaaggctcttttatgctatgctaattgga
 ggtaaaaggctttgcaaacacacaattggaattgtttaaattgtgatactctgtgctggttagtacatttattagtgatgaagttgcgagagact
 tgcactacagttfaaaagaccaataaatctactgaccagctcttctacatcgttagatgtttacagtggaagaatggttccatccatcttacttt
 gataaagctggcfaaaagacttatgaaagacattctctctctcattttgtaacttagacaacctgagagctaaataacactaaaggttcattgct
 attaatgttatagttttgatggtaaatcaaaatgtgaagaatcatctgcaaaatcagcgtctgttactacagtcagcttatgtgcaacctatact
 gttactagatcaggcattagtgtctgatgttggtagatgtcggaagttgcagttaaaatglttgatgcttacgtaatacgttttcatcaactttaa
 cgtaccaatggaaaaactcaaacactagttgcaactgcagaagctgaacttgcagaagaatgtgcttagacaatgtcttacttacttttatttc
 agcagctcggcaagggtttgttattcagatgtagaaactaaagatgttgttgaatgtcttaaatgtcacatcaatctgacatagaagttactgg
 cgatagttgtaataactatagctcacctatacaaaagttgaaaacatgacaccccgtagcttggctgttattgactgtagtcgcgctcatat
 taatgcgcaggtagcaaaaagtcacaacattgctttgatatggaacgttaagattcatgtcattgtctgaacaactacgaaaacaaatagca
 gtgctgctaaaaagaataacttaccttttaagttgacatgtgcaactactagacaagttgtaaatgttgaacaacaaagatagcaactaaagggt
 ggtaaaattgttaataattggtgaagcagttaaftaaagttacactgtgttccftttgttctgctattttctatftaataaacctgttcatgtcatg
 tctaaacatactgactttcaagtgaatcataggatacaaggctattgatgggtgtgctactcgtgacatagcatctacagatactgttttgcata
 acaaacatgctgattttgacacatggttttagtcagcgtggtgtagttataactaatgacaaagcttgccattgattgctgcagtcataacaaga
 gaagtggtttgtcgtgctgtttgctggcagatattacgcacaactaatggtagctttttgcaattcttacctagagtttttagtcagttgg
 taacatctgttacacacatcaaaaactatagagtacactgactttgcaacatcagcttgttttggctgctgaatgtacaattttaaagatgctt
 ctggaagccagttaccatattgttatgataccaatgtactagaagttctgttcttatgaaagtttacgccctgacacacgttatgtgctcatgg
 atggctctatttcaatttctaacacctaccttgaaggttctgttagagtggttaacaacttttattctgagfactgtaggcacggcacttgtgaa
 agatcagaagctgggtttgtatctactagtggtagatgggtacttaacaatgattattacagatctttaccaggagttttctgtgggtgatag
 ctgtaaatftacttactaataatgtttacaccactaattcaacctattggtgctttggacatatcagcatctatagtagctgggtgattgtagctatcg
 tagtaacatgcttgcctactattttatgaggtttagaagacttttggtaatacagtcatgtatgttgccttaataacttacttacttcttattgca
 actgfactctgttaaacaccagtttactcattcttacctggtgtttattctgttatttacttgtacttgacatttacttactaataatgatttcttttttagca
 cataftcagtgatggttatgttcacaccttttagtaccttctgataacaattgcttataatcattttgatttccacaagcatttctattggttctttagt
 aattacctaaagagacgtgtagctttaaattggtgttccfttttagtacttttgaagaagctgcgctgtgcacctttttgtaataaagaatgtatcta

aagttgcgtagtgatgtgctattacctctacgcaatataatagatacttagctctttataataagtacaagtatTTTTagtgaggcaatggatacaa
ctagctacagagaagctgcttgttgcacatcgcgaaaggctcctcaatgacttcagtaactcaggttctgatgttctttaccaaccaccacaaacc
tctatcacctcagctgtttgcagagtggtttagaaaaatggcattcccctctggtaaaagtggagggtgatggtacaagtaacttgggtaca
actacactaacggctcttggctttagacgtattactgtccaagacatgtgatctgcacctctgaagacatgcttaaccetaattatgaagatt
tactcattcgtlaagctaatcataatttctgggtacaggtggtaatgttcaactcaggggtattggacattctatgcaaaattgtgacttaagctta
agggtgatacagccaatcctaagacacctaagtaaaagtttgcattcaaccaggacagactttttagttagcttgttacaatggttcac
catctgggtttaccaatgtgctatgaggcccaatttactattaagggttattccttaaggttcatgtggtagtgggttttaacatagattatg
actgtgctctttttgttcatgaccataggaattaccaactggagttcatgctggcacagacttagaaggtaacttttatggacctttgtgac
aggcaaacagcacaagcagctggtagggacacaaactattacagtaattgttttagcttgggtgacgctgctgttataaatggagacaggtgg
tttcaatcgaattaccacaactcttaagactttaaccttgggtatgaagtacaattatgaaccttaacacaagacctgttgacatactagg
acctctttctgctcaaacctgaattgccgttttagatagtgcttcaaaaagaactactgcaaaatggatgaatggactaccatattgggt
agtgtttatagaagatgaattacaccttttgatgtgttagacaatgctcaggtgttactttccaaagtgcagtgaagaacaatcaagggt
acacaccactgggttactcacaatttgaacttacttttagtttagccagagactcaatggctttgttctttttttgatgaaaatgctttttac
cttttctatgggtattattgctatgtctgttttcaatgatgtttgtcaaacataagcatgcatttctctgtttttttgttaccttcttggcactgt
agcttatttataataggctatagctctgtagtgggtgatgcgtattatgacatgggtggatagggtgatactagtttctggttttaagctaaa
agactgtgttatgatgcatcagctgtagtgttactaatccttagacagcaagaactgtgatgatgatgggtgctaggagagtgtggacacttat
gaatgcttgacactcgttataaagttattatggtaatgcttttagatcaagccatttccatgtgggctcttataatctctgttacttctaactactca
gggtgtagttacaactgtcatgttttggccagaggtattgttttatgtgtttgagttatgccctattttctcataactggtaatacacttcagtgat
aatgctagttattgtttcttaggctatttttgaacttgttactttggcctctttgttactcaaccgctacttttagactgactcttgggtttatgactt
agtttctacacaggagtttagatataatgaattcacagggactactcccaccaagaatagcatagatgcttcaaaccaacattaaattgttgg
gtttggtggcaaaccttgatcaaaagtagccactgtacagctcaaaatgtcagatgtaaagtgcacatcagtagtcttactctcagtttgcac
aactcagagtagaatcatcatctaaattgtgggctcaatgttccagttacacaatgacattctcttagctaaagatactactgaagcctttgaaa
aaatggtttactactttctgttttcttccatgcaggggtctgtlagacataaacaagctttgtgaagaaatgctggacaacagggcaaccttac
aagctatagcctcagagtttagtcccttccatcatatgcagcttttctactgctcaagaagcttatgagcaggctgttctaatgggtattctga
agttgttcttaaaaagttgaagaagcttttgaatgtggctaaatctgaattgaccgtgatgcagccatgcaacgtaagttggaaaagatggctg
atcaagctatgacccaaatgataaacaggctagatctgaggacaagaggggcaaaagttagctagtgctatgcagacaatgcttttactatgc
ttagaagttggataatgatgactcaacaacattatcaacaatgcaagagatggttgttcccttgaacataatacctcttacaacagcagcc
aaactaatgggtgcataccagactataacacatataaaaatagctgtgatggtacaacatttacttatgcatcagcattgtgggaaaatccaaca
ggttgtagatgcagatagtaaaattgttcaacttagtgaattagtaggacaattcacctaatttagcatggcctcttattgtaacagctttaaagg
gccaattctgctgcaaatfacagaataatgagcttagtctgttgcactacgacagatgcttgtgctgccggtactacacaaactgcttgcac
tgatgacaatgcgttagcttactacaacacacaaagggaggttaggtttagcttgcactgttatccgatttacaggattgaaatgggctagat
tccctaagagtgatggaactggfactatctatacagaactggaaccacctgttaggtttgtacagacacacctaaaggctcctaaagtgaagta
tttatactttattaaaggattaaacaacctaaatagaggtatggtagtttagctgccacagtagcttacaagctggtaatgcaacaga
agtgcctgccaattcaactgtattatcttctgtgcttttctgttagatgctgctaaagcttacaagattatctagctagtgggggacaaccaatc
actaatgtgttaagatgttgtgtacacacactggtagctggcaggaataaacagttacaccggaagccaataggtatcaagaatcctttgggtg
gtgcatcgtgttctgtactgccgttccacatagatcatccaaatcctaaaggattttgtgacttaaaaggtaagtatgtacaaatacctacaa
cttgtgctaatgacctgtgggttttacttaaaaacacagctctgtaccgtctgcggatgtggaaagggttatggctgtagtgtgatcaactcc
gcgaacctatgcttcagtcagctgatgcacaatcgttttaaacgggttgcgggtgtaagtgcagcccgttaccacctgcccacagggca
ctgtagctgatgctgatacagggttttgcactctacaatgataaagtactgttttctaaatcctaaaaactaattgttgccttccaaga
aaaggacgaagatgacaatttaattgattcttactttgtagttaagagacacacttcttaactaccaacatgaagaaacaatttataattactta

aggattgccagctgttgctaaacatgacttctttaagtttagaatagacggtagacatggfaccacatatacacgtcaacgtcttactaaataca
 caatggcagacctcgtctatgctttaaggcattttgatgaaggtaattgtgacacattaaaagaatacttgcacatacaattgttggatgatg
 attattcaataaaaaggactggatgattttgtagaaaaccagataatacgcgatacggcaacttaggtgaacgtgtacccaagctttgt
 taaaaacagtacaattctgtgatccatgcgaaatgctggattgttgggtgactgacattagataatcaagatctcaatggtaactggatgatt
 cgggtattcatacaaacaccagcaggtagtgaggttcctgtttagattcttattcattgttaaatgcctataaaccctgaccagggctttaa
 ctgcagagtcacatgttgacactgacttaacaaagccttacattaagtgggattgttaaaatgacttcacggaagagagggttaaaactctt
 gaccgttattttaaatattgggatcagacataaccaccaaatgtgttaactgttggatgacagatgacttctgactgtgcaaaccttaattgtt
 ttctctacagtgttcccacctacaagtttggaccactagtgagaaaaatatttggatgggtgtccattttagtittcaactggataccactcag
 agagctaggtgttgcataatcaggatgtaaacctacatagctctagacttagtttaaggaaacttctgtgtatgctgctgacctgctatgcac
 gctgcttctggtaactctactagataaacgcactacgtgctttcagtagctgcacttactaacaatgttgccttcaaactgtcaaacccggta
 attttaacaaagactctatgactttgctgtgctaaagggtttcttaagggaagggaagttctgtgaattaaaacacttcttcttctgctcaggatggt
 atgctgctatcagcgattatgactactatcgttataatctaccaacaatgtgtgatatcagacaactactattttagtgaagttgtgataaglac
 tttgattgttacgatgggtgctgtattaatgctaaccaagtcacgcaacaacttagacaaatcagctggtttccatttaataaatggggtaag
 gctagactttattatgattcaatgagttatgaggatcaagatgcactttcgcataatacaaacgtaatgtcatccctactataactcaaatgaaatc
 taagtatgccattagtcaaagaatagagctgcaccgtagctgggtctctatctgttagtactatgaccaatagacagtttcatcaaaaattatt
 gaaatcaatagccgccactagaggagctactgtagtaattggaacaagcaaatctatgggtgggtggcacaacatgttaaaaactgtttatagt
 gatgtagaaaacctcacttatgggtgggattatcctaaatgtgatagagccatgcctaacatgcttagaattatggcctcacttgttcttct
 cgcaaacatacaacgtgtgtagcttgcacaccgttctatagattagctaatgagtgctcaagattgagtgaaatggcatgtgtggcgg
 ttactatattgtaaacagggtggaacctcatcaggagatgccacaactgcttatgctaatagtttttaaactttgcaagctgtcacggccaa
 tttaatgcacttttactctatggttaacaaaattgccgataagatgtccgcaatttacaacacagactttatgagtgctctatagaaataga
 gatgttgacacagactttgtaatgagtttacgcataattgcgtaaacatttctcaatgatgactctctgacgatgctgtgtgtttcaatagc
 acttatgcactcaaggctagtggttagcataaagaactttaagtcagttcttattatcaaaacaatgttttatgtctgaagcaaaaatgttgac
 tgagactgacctactaaaggacctatgaattttgctctcaacatacaatgctagttaaacaggggtgatgattatgtgaccttcttaccaga
 tccatcaagaatcctaggggcccggctgtttgtgatgatcgtaaaaacagatggtacacttatgattgaacggttcgtgtcttttagctataga
 tcttaccacttactaaacatcctaactcaggagatgctgatgctttcattttagtactacaatacaagaagctacatgatgagttaacagga
 cacatgttagacatgtattctgttatgcttactaatgataaacctcaaggatgggaacctgagtttatgaggctatgtacacaccgcatacag
 tcttacaggctgtggggcttgttcttgaattcacagacttcaatagatgggtgcttgcatacgtagaccattcttatgtttaaactgtgtt
 acgacctatcatalcaacatcacataaattagcttctgttfaatccgatgtttgcaatgctccagggtgtgatgtcacagatgtgactcaact
 tacttaggaggtatgagctattattgtaaacacataaaccaccattagtttccattgtgtgctaatggacaagttttggtttatataaaaataca
 tgtttggtagcgataatgttactgactttaatgcaattgcaacatgtgactggacaaatgctggtgattacatttagctaacacctgactgaaa
 gactcaagcttttgcagcagaaacgctcaaagctactgaggagacattaaactgtcttatggattgtactgtacgtgaagtgctgtctgac
 agagaattacatcttcatgggaagttggtaaacctagaccaccacttaaccgaaattatgtcttactggttatcgtgtaactaaaaacagtaaa
 gtcaaaataggagagtagaccttgaaaaaggtagctatgggtgatgctgttaccgaggtacaacaactacaattaaatgttgggtgatta
 tttgtgctgacatcacatacagtaatgccattaagtgcacctacactagtccacaagagcactatgttagaactggttatacccaact
 caatatcagatgagtttctagcaatgttgcaaaatataaaaagggtggatgcaaaaagtattctacactccaggaccctggfactggta
 agagctatttgcattggcctagctctactaccctctgctgcatagtgtatacagcttctctcatccgctgttgatgactatgtgagaa
 ggcaataaaatattgcctatagataaattagtagaattatacctgcacgtgctcgttagaggttttgataaattcaagtgaaatcaactta
 gaacagtatgtctttagtactgtaaatgcaatgacctgagacgacagcagatagttgtctttgatgaaattcaatggccacaaattatgattga
 gtgttgcaatgccagattacgtgtaagcactatgtgtacattggcgacctgctcaattacctgcaccacgacattgctaactaagggcac
 actagaaccagaatattcaattcagtggtgtagacttatgaaaactataggtccagacatgttctcggaaactgtcggcgttgcctgctgaaat

tgttgacactgtgagtgtcttggttatgataataagcttaagcacataaagacaaatcagctcaatgcttfaaaatgtttataagggtgtatca
 cgcgatgatgttcatctgcaattaacagccacaaataggcgtggaagagaattccttacacgtaaccctgctggagaaaagctgtcttatt
 tcacctataattcacagaatgctgtagcctcaaagatttggactaccaactcaaactgttgattcatcacagggtcagaatgactatgct
 atattcactcaaacactgaaacagctcactcttgaatgtaaacagattaatgttgctattaccagagcaaaagtaggcatactttgcataatg
 tctgalagagacctttatgacaagttgcaatttacaagcttgaaattccacgttaggaatgtggcaactttacaagctgaaaatgtaacaggact
 ttttaagattgtagtaaggtaatcactgggttacatcctacacagggcacctacacacctcagtggtgacactaaatcaaaactgaaggttatg
 tgtgacatacctggcatalacctaaggacatgacctatagaagactcatctctatgatgggttttaaaatgaattatcaagttaatggttaccctaa
 catgtttatcacccgcgaagaagctataagacatgtacgtgcatggattggcttcgatgctgaggggtgcatgctactagagaagctgttgg
 accaatttacctttacagctaggttttctacaggtgtaacctagttgctgacctacaggttatggtgatacactaataatacagattttccaga
 gttagtgtctaaaccaccgctggagatcaatttaaacacctcatacccttatgtacaaaggacttccctggaatgtagtgcgtataaagattgt
 acaaatgttaagtgtacacacttaaaaaatctctctgacagagtcgtatgtcttattgggcacatggcttggagtgtacatctatgaagtattttgtga
 aaataggacctgagcgcacctgtgtctatgtgatagacgtgccacatgctttccactgcttcagacacttatgcctgttggcatcattctattg
 gatttgattacgtctataatccgtttatgattgatgtcaacaatggggttttacaggttaacctacaaagcaacctgatctgtattgtcaagccat
 ggtaatgcacatgtagctagttgtgatgcaatcatgactagggtctagctgtccacgagtcttggtaagcgtgttgactggactattgaatat
 cctataattgggtgatgaactgaagattaatgctggctttagaaggttcaacacatgggttgaagctgcattatlagcagacaaatcccagtt
 ctccagacattgtaaccctaaagctattaagtgtgtacctcaagctgatgtagaatggaagttctatgatgcacagcctttagtgacaaag
 ctataaaaatagaagaattattctattctatgccacacattctgacaaattcacagatgggtgatgcctatttggaattgcaatgctgatagatc
 ctgctaattccattgtttgtagattgtacactagagtgctatctaaccttaactgectgggtgtgatgggtggcagttttagtataaataacatgcat
 tccacacaccagctttgataaaagtctttgftaatttaaaacaattaccattttctattactctgacagtccatgtgagctcatggaaaaca
 gtagtgcagatagattatgtaccactaaagctgctacgtgtataacacgttgaatttaggtgggtgctgctctgtagacatcatgctaatgag
 tacagattgtatctgatgcttataacatgatgatctcagctggctttagcttgggtttacaacaattgatacttataacctctggaacactttt
 acaagactcagagtttagaaaatgtggctttaatgttgaataaggacactttgatggacaacagggtgaagtaccagtttctatcattaat
 aacactgtttacacaaaagtgtggtgtgtatgtagaattgttgaataaaaacaacattacctgttaatgtagcatttagcttgggctaagc
 gcaacattaaaccagtagcagaggtgaaaatactcaataatgggtgtggacattgctgctaatactgtgatctgggactacaaaagagatg
 ctccagcacatatactactattgggtgttctatgactgacatagccaagaaaccaactgaaacgatttgtgaccactcactgtctttttgat
 ggtagagttgatggcaagtagacttatttagaaatgcccgaatgggtgtcttattacagaaggtagtgttaaagggttacaacctctgtaggt
 cccaaacaagctagcttaatggagtcacattatggagaagccgtaaaaacacagttcaattatataagaaggtgatgggtgttccaac
 aattacctgaaacttacttactcagagtagaaattacaagaatttaaacccaggagtcaaatggaattgatttctagaattagctatggatga
 attcattgaacggtataaattagaaggctatgccttcgaacatatactttatggagatttttagctatagtcagttagggtgtttacatctactgattg
 gactagctaaacgttttaaggaatcacctttgaattagaagattttatcctatggacagtacagttaaaaactattcataacagatgcaaac
 aggtcatcctaagtgtgtgtgtctgttattgatttactttagatgattttgtgaaataataaaatcccaagatttatctgagtttctaagggtgtcaa
 agtgactattgactatacagaaatttattatgctttgggtgaaagatggccatgtagaacattttacccaaaattacaatctagtcaagcgtgg
 caaccgggtgttctatgcctaactttacaaaatGCAAAGAATGCTATTAGAAAAGTGTGACCTTCAAAA
 TTATGGTGATAGTGCAACATTACCTAAAGGCATAATGATGAATGTCGCAAAAATATAC
 TCAACTGTGTCAATATTTAAACACATTAACATTAGCTGTACCCTATAATATGAGAGT
 TATACATTTTGGTGCTGGTTCTGATAAAGGAGTTGCACCAGGTACAGCTGTTTTAAG
 ACAGTGGTTGCCTACGGGTACGCTGCTTGTGCGATTTCAGATCTTAATGACTTTGTCTCT
 GATGCAGATTCAACTTTGATTGGTGATTGTGCAACTGTACATACAGCTAATAAATGG
 GATCTCATTATTAGTGATATGTACGACCCTAAGACTAAAAATGTTACAAAAGAAAAT
 GACTCTAAAGAGGGTTTTTTCACCTACATTTGTGGGTTTATACAACAAAAGCTAGCT

CTTGGAGGTTCCGTGGCTATAAAGATAACAGAACATTCTTGGAATGCTGATCTTTAT
 AAGCTCATGGGACACTTCGCATGGTGGACAGCCTTTGTTACTAATGTGAATGCGTCA
 TCATCTGAAGCATTTTTAATTGGATGTAATTATCTTGCCAAACCACGCGAACAAATA
 GATGGTTATGTCATGCATGCAAATTACATATTTTGGAGGAATACAAATCCAATTCAG
 TTGTCTTCCTATTCTTTATTTGACATGAGTAAATTTCCCCTTAAATTAAGGGGTACTG
 CTGTTATGTCTTTAAAAGAAGGTCAAATCAATGATATGATTTTATCTCTTCTTAGTAA
 AGGTAGACTTATAATTAGAGAAAACAACAGAGTTGTTATTTCTAGTGATGTTCTTGT
 TAACAACATAACGAACAATGTTTGTTTTTCTTGTTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCA
 GTGTGTTAATCTTACAACCAGAACTCAATTACCCCTGCATACACTAATTCTTTTACT
 AGGGGGGTTTATTATCCTGATAAGGTTTTTCGTAGTTCAGTCTTGCCATAGTACTCAG
 GATCTATTTTTACCTTTCTTTTCGAACGTTACTTGGTTTTACGCTATACACGTTTCCGG
 TACTAACGGTACTAAAAGATTTCGATAATCCTGTCTTACCATTTAACGACGGAGTGTA
 TTTCGCTAGTACCGAAAAATCTAATATTATTAGGGGTTGGATATTCGGTACTACTCTT
 GACTCTAAAACGCAATCATTGTTAATCGTTAATAACGCTACTAACGTCGTTATTAAG
 GTATGCGAATTTTCAGTTTTGTAACGATCCTTTCTTAGGCGTTTATTATCATAAAAATA
 ATAAGTCTTGGATGGAATCCGAATTTAGAGTGTATAGTTCCGCTAATAATTGTACAT
 TCGAATACGTTTCGCAACCATTTCTTATGGATCTTGAGGGTAAGCAGGGTAATTTTA
 AAAATTTGCGTGAATTCGTTTTTAAAAATATAGACGGTTATTTTAAGATATACTCTA
 AACATACCCTATTAATCTCGTTAGGGATCTACCTCAGGGTTTTTCCGCTCTTGAGCC
 ATTAGTCGATTTGCCAATAGGTATTAATATTACTAGATTTTCAGACTCTTTTAGCGTTA
 CATAGATCTTATTTGACTCCTGGTGATTCTTCTTCAGGTTGGACAGCTGGTGCTGCAG
 CTTATTATGTGGGTTATCTTCAACCTAGGACTTTTCTATTAATAATAATGAAAATGG
 AACCATTACAGATGCTGTAGACTGTGCACTTGACCCTCTCTCAGAAACAAAGTGTAC
 GTTGAAATCCTTCACTGTAGAAAAAGGAATCTATCaaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctat
 tggtagatttctaataatacaacttgtgcccttttgggaagtttaacgccaccagatttgcactctgttatgcttggaaacaggaagagaatca
 gcaactgtgtgctgattattctgtcctataaattccgcatcatttccactttaagtgattggagtgctcctactaaftaaatgatctctgctta
 ctaatgctatgcagattcatttgaattagaggtgatgaagtcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgctgattataattataat
 taccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaaattcaacaacttgattctaaggttgggtgtaattataaactgtagattgtttagga
 agtctaactcaaacctttgagagagataattcaactgaaatctatcaggccggtagcacacctgtaatggtgttgaaggttttaattgttacttt
 cttfacaatcatatggttccaaccactaatggtgttgggtaccaaccatacagagtagtagtactttctttgaaacttcatatgcaccagcaa
 ctgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggftaaaaacaaatgtgtcaatttcaacttcaatggttaacaggcagaggttcttactgagtct
 acaaaaaagtttctgcctttccaacaatttggcagagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttgagattcttgacatt
 acaccatgttcttttgggtgtcagtggtataacaccaggaacaaataacttcaaccagggtgctgttctttatcaggatgtaactgcacagaa
 gtccctgttctatcatgcagatcaactactcctacttggcgtgttattctacaggttctaattgtttcaaacactgacaggctgttaataggg
 gctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtagacataccattggtgcaggtatagcgtatgatcagactcagcaatccatcattgctaca
 ctatgtcacttgggtgcagaaaatcagttgcttactctaataactctattgccataccacaaaatttactattagttaccacagaaattctacca
 gtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacatttgggtgattcaactgaatgcagcaatctttgttgaatattggcagttttgtac
 acaattaaaccgtgctttaaactggaatagctgttgaacaagacaaaaacaccaagaagttttgcacaagtcaacaaatttcaaaaacacc
 accaattaaagattttgggtgtttaaattttcacaataattaccagatccatcaaaaaccaagcaagagtcattttatgaagatctactttcaaca
 aagtgcacttgcagatgctggcttcatcaacaatatggtgattgccttgggtgatattgctgctagagacctcatttgcacaaaagtttaac

1788-COV-4	12	CTAATTGAGGTTGAACCTCAACAATTG	фрагмент 2
1789-COV-5	13	GAGTATGGTACTGAAGATGATTACCAAG	Линейный
1790-COV-6	14	CTAGGTGGAATGTGGTAGGATTAC	фрагмент 3
1791-COV-7	15	GCTGTTACAGCGTATAATGGTTATCTTAC	Линейный
1792-COV-8	16	GCTGGTTTAAGTATAATGTCTCCTACAAC	фрагмент 4
1793-COV-9	17	GCACAAAACCAGTTGAAACATCAAATTC	Линейный
1794-COV-10	18	GCAACTAGTGTTTTGAGTTTTTCCATTG	фрагмент 5
1795-COV-11	19	GTGAAGAATCATCTGCAAAATCAGC	Линейный
1796-COV-12	20	CAAATGATATAAGCAATTGTTATCCAGAAAG G	фрагмент 6
1797-COV-13	21	GCCTTTAATACTTTACTATTCCCTTATGTCATTC AC	Линейный
1798-COV-14	22	CCAGACAAACTAGTATCAACCATATCC	фрагмент 7
1799-COV-15	23	GCTATGGGTATTATTGCTATGTCTG	Линейный
			фрагмент 8
			- с версиями
1800-COV-16	24	CCTACAAGGTGGTTCAGTTC	WT и Min, требуется отдельная очистка.
1801-COV-17	25	CGACAGATGTCTTGTGCTG	Линейный
1802-COV-18	26	GGTATCCAGTTGAAACTACAAATGG	фрагмент 9
1803-COV-19	27	GATCAGACATAACCACCAAATTG	Линейный
			фрагмент 10
			- с версиями
1804-COV-20	28	CTTATGTATTGTAAGTACAAATGAAAGACATC AG	WT и Min, требуется отдельная очистка.
1805-COV-21	29	GGTGATGATTATGTGTACCTTCCTTAC	Линейный
1806-COV-22	30	CTGTTAATTGCAGATGAAACATCATGC	фрагмент 11
1807-COV-23	31	GTGTGTAGACTTATGAAAАСТАTAGGTCC	Линейный
1808-COV-24	32	CATACAAACTGCCACCATCAC	фрагмент 12
1809-COV-25	33	CCTTGTAGTGACAAAGCTTATAAAATAGAAG	Линейный

1810-COV-26	34	CTGGTGCAACTCCTTTATCAG	фрагмент 13
1811-COV-27	35	GCAAAGAATGCTATTAGAAAAGTGTGAC	Линейный фрагмент 14 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1812-COV-28	36	GATAGATTCCTTTTTCTACAGTGAAGGATTC	Линейный фрагмент 15 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1813-COV-29	37	GACTCCTGGTGATTCTTCTTCAG	Линейный фрагмент 16 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1814-COV-30	38	CTCTAGCAGCAATATCACCAAGG	Линейный фрагмент 17 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1815-COV-31	39	GCACAAGTCAAACAAATTTACAAAACAC	Линейный фрагмент 18 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1816-COV-32	40	CAAAAGGTGTGAGTAAACTGTTACAAAC	Линейный фрагмент 19 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1817-COV-33	41	CTCACTCCCTTTTCGGATGG	Линейный фрагмент 20 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1818-COV-34	42	GAGGTTTATGATGTAATCAAGATTCCAAATGG	Линейный фрагмент 21 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1819-COV-35	43	GCTACAGGATTGGCAACTATAAATTA AAC	Линейный фрагмент 22 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1820-COV-36	44	CCATTCTAGCAGGAGAAGTTCC	Линейный фрагмент 23 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1821-COV-37	45	GCAATCCTGCTAACAATGCTG	Линейный фрагмент 24 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1822-COV-38	46	tttTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCAATTCCTA AGAAGCTATTA AAATC	Линейный фрагмент 25 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1865- CoVFrag19-R	47	GAAGACTTGGTACACTTGAGACG	Альтернативны й праймер для конца генома CoV, конец линейного

фрагмента 19.

[00246] Для включения рСМV во фрагмент 0
SEQ ID

NO:

1862-CoVFrag0-F	48	aattttGACGTCgatccCGTTGACATTGATTATT GACGTC, GAC	С сайтом Zra I с нуклеотида 81 во фрагменте 0.
1863-CoVFrag0-R	49	CCACACAGATTTTAAAGTTCGTTTAGAG	
1864-CoVFrag1-F	50	GCAAATGGGCGGTAGG	

[00247] Стадия 2. Перекрывающаяся ПЦР

[00248] Может потребоваться сначала перекрыть 4-5 фрагментов - очистить продукты - затем перекрыть с получением полного генома.

[00249] Стадия 3.

[00250] Вариант 1: Использовать непосредственно для транскрипции *in vitro*/хранить как продукт перекрывающейся ПЦР;

[00251] Вариант 2: Клонировать в вектор рСС1ВАС

[00252] Для клонирования генома CoV в вектор рСС1ВАС используйте №1883 и 1890 в качестве прямых и обратных праймеров для амплификации фрагмента 0 и фрагмента 19, а также в конечной амплификации после перекрытия. Соберите с *Bsa* I, несущим рСС1ВАС, используя сборку NEB Golden Gate.

1883- ATCGCAGGTCTCGcgctttcccgaaatcgagc Для рСС1ВАС-полной сборки
pGGAfrag1-F (SEQ ID NO:51) CoV начните с нуклеотида 50
во фрагменте 0

1890- ATCGCAGGTCTCGgaggatatagttctctcttca Для рСС1ВАС-полной сборки
pGGAfrag4-R gc (SEQ ID NO:52) CoV

Клонировать в вектор pGGA (из набора клонов Golden Gate) через сайты Bsa I, затем клонировать в вектор рСС1ВАС через сайт Bsa I.

[00253] рСС1ВАС получен из существующей плазмиды рСС1-CysS-CD и нуждается в модификации - см. «Модификация рСС1ВАС»

[00254] Стадия 1: ПЦР и очистка гелем

[00255] Праймеры и матрицы -Для начала из промотора T7

Праймеры	SEQ ID NO:	Последовательности	Матрицы
1823-CoVfrag1- BsaF1	53	TATGCGGGTCTCCGGAGtaatacga ctcactattATTAAAGGTT	Линейный фрагмент 1 Для клона pGGA,

			Линейный фрагмент 1-4, промотор T7-первые 10 нуклеотидов
1824-CoVfrag1-BsaR	54	TATGCGGGTCTCCAGACCTTCG GAACCTTCTCC	Вирусный геном начинается с промотора T7
1825-CoVfrag2-BsaF	55	TATGCGGGTCTCGGTCTTAATG ACAACCTTCTTGAAATAC	Линейный фрагмент 2
1826-CoVfrag2-BsaR	56	TATGCGGGTCTCGAATCTTCTT CTTGCTCTTCTTC	
1827-CoVfrag3-BsaF	57	TATGCGGGTCTCGGATTGGTTA GATGATGATAGTCAACAA	Линейный фрагмент 3
1828-CoVfrag3-BsaR	58	TATGCGGGTCTCGCTTTATAGG AACCAGCAAGTGA	
1829-CoVfrag4-BsaF	59	TATGCGGGTCTCGAAAGATTG GTCCTATTCTGGAC	Линейный фрагмент 4
1830-CoVfrag4-BsaR	60	TATGCGGGTCTCGATGGTTTTA GATCTTCGCAGGCA	Конец в нуклеotide 6400
1831-CoVfrag5-BsaF	61	TGAGTCGGTCTCCGGAGCCAGT CTCTGAAGAAGTAGTG	Линейный фрагмент 5
1832-CoVfrag5-BsaR	62	TGAGTCGGTCTCCATCAGACAC TAATGCCTGATCT	Для клона pGGA, линейный фрагмент 5-9
1833-CoVfrag6-BsaF	63	TGAGTCGGTCTCCTGATGTTGG TGATAGTGCGG	Линейный фрагмент 6
1834-CoVfrag6-BsaR	64	TGAGTCGGTCTCCCAAGTACAA GTAAATAACAGAATAAACAC	
1835-CoVfrag7-BsaF	65	TGAGTCGGTCTCCCTTGACATT TTATCTTACTAATGATGTTTCT	Линейный фрагмент 7
1836-CoVfrag7-BsaR	66	TGAGTCGGTCTCCAGTGGCAA GAGAAGGTAACAAAA	
1837-CoVfrag8-BsaF	67	TGAGTCGGTCTCCCACTGTAGC TTATTTTAATATGGTCTAT	Линейный фрагмент 8 - с версиями WT и Min,
1838-CoVfrag8-BsaR	68	TGAGTCGGTCTCCCCTACCTCC CTTTGTTGTGTT	требуется отдельная очистка.

1839-CoVfrag9-BsaF	69	TGAGTCGGTCTCGTAGGTTTGT ACTTGCACGTGT	Линейный фрагмент 9 Конец в нуклеотиде 14400
1840-CoVfrag9-BsaR	70	TGAGTCGGTCTCGATGGCACTG TAGAGAATAAAACATTAAGTT	
1841-CoVfrag10- BsaF	71	СТАAGGGGTCTCGGGAGTTCCC ACCTACAAGTTTTGG	Линейный фрагмент 10 Для клона рGGA, линейный фрагмент - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка. 10-14
1842-CoVfrag10- BsaR	72	СТАAGGGGTCTCGGTGTACCAT CTGTTTTTACGA	
1843-CoVfrag11- BsaF	73	СТАAGGGGTCTCGACACTTATG ATTGAACGGTTCGTG	Линейный фрагмент 11
1844-CoVfrag11- BsaR	74	СТАAGGGGTCTCGAAAGCACT CACAGTGTCА	
1845-CoVfrag12- BsaF	75	СТАAGGGGTCTCGCTTTGGTTT ATGATAATAAGCTTAAAGCAC	Линейный фрагмент 12
1846-CoVfrag12- BsaR	76	СТАAGGGGTCTCGTTGCAATTC CAAAATAGGCАTACA	
1847-CoVfrag13- BsaF	77	СТАAGGGGTCTCCGCAATGTCG АTAGАTATCCTGCTAA	Линейный фрагмент 13
1848-CoVfrag13- BsaR	78	СТАAGGGGTCTCCAGTATATTT TGCGACATTCATCATTATG	
1849-CoVfrag14- BsaF	79	СТАAGGGGTCTCCTACTCAACT GTGTCAATATTTAAACAC	Линейный фрагмент 14 Конец в нуклеотиде 22400
1850-CoVfrag14- BsaR	80	СТАAGGGGTCTCCATGGTATAT TTTAATAGAAAAGTCCTAGGTT GA	- с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1866-CoVfrag15- BsaF	81	AAGCACGGTCTCCGGAGATGAA AATGGAACCATTACAGAT	Линейный фрагмент 15 Для клона рGGA, линейный фрагмент 15- 19 с сигнальной последовательностью
1867-CoVfrag15- BsaR	82	AAGCACGGTCTCCSTTGGTTTT GATGGATCTGG	

			поли-А
			- с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1868-CoVfrag16- BsaF	83	AAGCACGGTCTCCCAAGCAAGA GGTCATTTATTGAAGATCT	Линейный фрагмент 16 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка.
1869-CoVfrag16- BsaR	84	AAGCACGGTCTCCAGTTGCCAT CTCTTTTTGAGGGT	требуется отдельная очистка.
1870-CoVfrag17- BsaF	85	AAGCACGGTCTCGAACTAGCAC TCTCCAAGGG	Линейный фрагмент 17
1871-CoVfrag17- BsaR	86	AAGCACGGTCTCGTCTGTTGTC ACTTACTGTACAAGC	
1872-CoVfrag18- BsaF	87	AAGCACGGTCTCCCAGATGTTT CATCTCGTTGACTT	Линейный фрагмент 18
1873-CoVfrag18- BsaR	88	AAGCACGGTCTCCTGCTCCCTT CTGCGTAGAAG	
1874-CoVfrag19- BsaF	89	AAGCACGGTCTCGAGCAGAGGC GGCAGTCAAGC	Линейный фрагмент 19 заканчивается перед
1875-CoVfrag19- BsaR	90	AAGCACGGTCTCGATGGgatatag ttctcctttcagc	внутренним BsaI в линейном фрагменте 19

[00256] Для включения pCMV в линейный фрагмент 0

1876-CoVFrag0-BsaF		CCATGTGGTCTCCGGAGgctttcccg aattcgagc (SEQ ID NO:91)	Линейный фрагмент 0, нуклеотид 51 Для клона pGGA, линейный фрагмент 0-4, начинается после внутреннего BsaI в пределах линейного фрагмента 0.
1877-CoVFrag0-BsaR		ATAGACCTCCCACC (SEQ ID NO:92)	
1878-CoVfrag1-BsaF2		CCATGTGGTCTCGCAGAtaatacgc tcactattATTAAAGGTT (SEQ ID NO:93)	Линейный фрагмент 1
1879-CoVfrag1-BsaR2		CCATGTGGTCTCGGACCTTCGG AACCTTCTCC (SEQ ID NO:94)	
1880-CoVfrag2-BsaF2		CCATGTGGTCTCCGGTCTTAATG	используйте № 1826-1830

ACAACCTTCTTGAAATAC (SEQ для остальных вставок
ID NO:95)

[00257] Стадия 2. Сборка вирусного генома на 4 больших фрагмента в pGGA с использованием набора для сборки NEB Golden gate

[00258] Фрагмент 0 (или 1)-4, 5-9, 10-14 и 15-19.

[00259] Следуйте меню набора для сборки NEB Golden gate

[00260] Стадия 3 ПЦР-фрагменты вируса из клонов pGGA для сборки на следующей стадии (также ввести новые сайты Bsa I)

[00261] Стадия 3,1: Повторно ввести Bsa I с помощью ПЦР и очистки гелем (отдельно)

	SEQ ID NO:		
1881-pCC1-F	96	ATCGCAGGTCTCGcctcgaccaattct catgtttg	модифицированный pCC1BAC.
1882-pCC1-R	97	ATCGCAGGTCTCGagcgttattagc gatgagctcg	Для pCC1BAC-полной сборки CoV
1883- pGGAfrag1-F	51	ATCGCAGGTCTCGcgctttcccgaat tcgagc	pGGA-CoV0-4
1884- pGGAfrag1-R	98	ATCGCAGGTCTCGGGTTTTAG ATCTTCGCAGGCA	
1885- pGGAfrag2-F	99	ATCGCAGGTCTCCAACCAGTC TCTGAAGAAGTAGTG	pGGA-CoV5-9
1886- pGGAfrag2-R	100	ATCGCAGGTCTCCACACTGTA GAGAATAAAAACATTTAAAGTT	
1887- pGGAfrag3-F	101	ATCGCAGGTCTCGGTGTTCCC ACCTACAAGTTTTGG	
1888- pGGAfrag3-R	102	ATCGCAGGTCTCGCATTATAT TTTAATAGAAAAGTCCTAGGT TGA	pGGA-CoV10-14
1889- pGGAfrag4-F	103	ATCGCAGGTCTCGAATGAAA ATGGAACCATACAGAT	pGGA-CoV15-19
1890- pGGAfrag4-R	52	ATCGCAGGTCTCGgaggatatagttc ctccttcagc	Для pCC1BAC-полной сборки CoV
1891-pCC1-R2	104	CTCATCGGTCTCGtagttattagc gatgctcg	Для сборки pCC1BAC- fCoV-начало с T7,

1892- pGGAfrag1-F2	105	CTCATCGGTCTCGactaatacgactca ctattATTAAAGGTT	другие праймеры такие же, как и для полной сборки Для сборки pCC1BAC-fCoV-начало с T7, другие праймеры такие же, как и для полной сборки
-----------------------	-----	--	---

[00262] Стадия 3.2 Сборка 4 больших фрагментов в pCC1BAC, используя набор для сборки NEB Golden Gate.

Собрать все фрагменты в вектор pCC1BAC непосредственно

[00263] Стадия 1: ПЦР и очистка гелем

SEQ ID

NO:

1893- pCC1FWD	106	TCAGGTGGTCTCGaggaactatac ctcgaccaattctcatgtttg	модифицированный pCC1BAC Для вставки всех CoVfrag Insto pCC1 в одну реакцию
1894- pCC1REV	107	TCAGGTGGTCTCGgcgatgagct cggacttc	pCC1BAC (модифицированный) заканчивается в нуклеотиде 7439
1895-CoVInst0 FWD	108	TCAGGTGGTCTCGtcgctaataac gctttcccgaattcgagc	Линейный фрагмент 0
1896-CoVInst0 REV	109	TCAGGTGGTCTCGGCTTATA TAGACCTCCCACC	
1897-CoVInst1 FWD	110	TCAGGTGGTCTCGAAGCAG AtaatacgactcactattATTAAAGGT T	Линейный фрагмент 1
1898-CoVInst1 REV	111	TCAGGTGGTCTCGAACCTTC TCCAACAACACC	
1899-CoVInst2 FWD	112	TCAGGTGGTCTCCGGTTCCG AAGGTCTTAATGACAACCTT CTTGAAATAC	Линейный фрагмент 2

1900-CoVInst2 REV	113	TCAGGTGGTCTCCCTTGCTC TTCTTCAGGTTG	
1901-CoVInst3 FWD	114	TCAGGTGGTCTCCCAAGAAG AAGATTGGTTAGATGATGAT AGTCAACAA	Линейный фрагмент 3
1902-CoVInst3 REV	115	TCAGGTGGTCTCCATAGGAA CCAGCAAGTGAG	
1903-CoVInst4 FWD	116	TCAGGTGGTCTCGCTATAAA GATTGGTCCTATTCTGGAC	Линейный фрагмент 4
1904-CoVInst4 REV	117	TCAGGTGGTCTCGTTTAGAT CTTCGCAGGCA	
1905-CoVInst5 FWD	118	TCAGGTGGTCTCCTAAAACC AGTCTCTGAAGAAGTAGTG	Линейный фрагмент 5
1906-CoVInst5 REV	119	TCAGGTGGTCTCCCATCAGA CACTAATGCCTGATCT	
1907-CoVInst6 FWD	120	TCAGGTGGTCTCCGATGTTG GTGATAGTGCGG	Линейный фрагмент 6
1908-CoVInst6 REV	121	TCAGGTGGTCTCCTAAATAA CAGAATAAACACCAGGT	
1909-CoVInst7 FWD	122	TCAGGTGGTCTCGTTTACTT GTACTTGACATTTTATCTTAC TAATGATGTTTCT	Линейный фрагмент 7
1910-CoVInst7 REV	123	TCAGGTGGTCTCGAGAGAAG GTAACA AAAACAAACA	
1911-CoVInst8 FWD	124	TCAGGTGGTCTCGCTCTTGC CACTGTAGCTTATTTAATA TGGTCTAT	Линейный фрагмент 8 - с версиями WT и Min,
1912-CoVInst8 REV	125	TCAGGTGGTCTCGAGTACAA ACCTACCTCCCTTTGTTGTGT T	требуется отдельная очистка
1913-CoVInst9 FWD	126	TCAGGTGGTCTCCTACTTGC ACTGTTATCCGA	
1914-CoVInst9 REV	127	TCAGGTGGTCTCCGGTGGGA ACACTGTAGAGAATAAAAC	Линейный фрагмент 9

		ATTAAAGTT	
1915- CoVInst10 FWD	128	TCAGGTGGTCTCGCACCTAC AAGTTTTGGACC	Линейный фрагмент 10 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка
1916- CoVInst10 REV	129	TCAGGTGGTCTCGTCATAAG TGTACCATCTGTTTTACGA	
1917- CoVInst11 FWD	130	TCAGGTGGTCTCCATGATTG AACGGTTCGTGT	Линейный фрагмент 11
1918- CoVInst11 REV	131	TCAGGTGGTCTCCACCAAAG CACTCACAGTGTCА	
1919- CoVInst12 FWD	132	TCAGGTGGTCTCGTGGTTТА TGATAATAAGCTTAAAGCAC	Линейный фрагмент 12
1920- CoVInst12 REV	133	TCAGGTGGTCTCGCAATTCC AAAATAGGCАTACAC	
1921- CoVInst13 FWD	134	TCAGGTGGTCTCCATTGCAA TGTCGATAGATATCCTGCTA A	Линейный фрагмент 13
1922- CoVInst13 REV	135	TCAGGTGGTCTCCGCGACAT TCATCATTATGCC	
1923- CoVInst14 FWD	136	TCAGGTGGTCTCGTCGCAAA ATATACTCAACTGTGTCAAT ATTTAAACAC	Линейный фрагмент 14 - с версиями WT и Min, требуется отдельная очистка
1924- CoVInst14 REV	137	TCAGGTGGTCTCGTCATTAT ATTTТАATAGAAAAGTCCTA GGTTGA	
1925- CoVInst15 FWD	138	TCAGGTGGTCTCGATGAAAA TGGAACCATTACAGAT	Линейный фрагмент 15 - с версиями WT и Min, требуется отдельная

1926- CoVInst15 REV	139	TCAGGTGGTCTCGTGCTTGG TTTTGATGGATCTGG	очистка
1927- CoVInst16 FWD	140	TCAGGTGGTCTCGAGCAAGA GGTCATTTATTGAAGATCT	Линейный фрагмент 16 - с версиями WT и Min,
1928- CoVInst16 REV	141	TCAGGTGGTCTCGTTTTTGA GGGTTATGATTTTGA	требуется отдельная очистка
1929- CoVInst17 FWD	142	TCAGGTGGTCTCCAAAAGAG ATGGCAACTAGCACTCTCCA AGGG	Линейный фрагмент 17
1930- CoVInst17 REV	143	TCAGGTGGTCTCCTGTCACT TACTGTACAAGCAAAGC	
1931- CoVInst18 FWD	144	TCAGGTGGTCTCGGACAACA GATGTTTCATCTCGTTGACTT	Линейный фрагмент 18
1932- CoVInst18 REV	145	TCAGGTGGTCTCGTCTGCTC CCTTCTGCGTAGAAG	
1933- CoVInst19 FWD	146	TCAGGTGGTCTCGCAGAGGC GGCAGTCAAGC	Линейный фрагмент 19
1934- CoVInst19 REV	147	TCAGGTGGTCTCGtcctccttcagc aaaaaaccc	

[00264] Стадия 2. Сборка полного вирусного генома в векторе pCC1BAC в соответствии с меню набора для сборки NEB Golden gate

Сборка ДНК NEBuilder HiFi

[00265] Стадия 1: ПЦР и очистка гелем. Так же, как в примере 1. Для фрагмента 0 и фрагмента 19 необходимо использовать альтернативный праймер для ПЦР и для 5'- и 3'-концов pCC1BAC.

[00266] Для пересечения между pCC1BAC и вирусным геномом

5'-пересечение

1935-CoVfrag0-F2	GTCCGAGCTCATCGCTAATAACgctttccc gaattcgagc (SEQ ID NO:148)	Прямой праймер для фрагмента 0, для NEBuilder
1936-pCC1-R2	gctcgaattcgggaaagcGTTATTAGCGATGAG CTCGGAC (SEQ ID NO:149)	Замените № 1861 при изменении pCC1 для NEBuilder.

3'-пересечение

1937-CoVfrag19-R2	CTGTCAAACATGAGAATTGGTTCG Agaagacttggtacacttgagacg (SEQ ID NO:47)	Последние 23 нуклеотида во фрагменте 19, первые 24 нуклеотида в pCC1 для NEBuilder
1938-pCC1-F2	cgtctcaagtgtagcaagctcttcTCGACCAAT TTCATGTTTGACAG (SEQ ID NO:150)	Последние 23 нуклеотида во фрагменте 19, первые 24 нуклеотида в pCC1 для NEBuilder

[00267] Стадия 2. Сборка в соответствии с меню NEBuilder HiFi

[00268] Модификация вектора pCC1BAC. Основу pCC1BAC получают из плазмиды pCC1-CysS-CD. Она содержит внутренние сайты Bsa I и Bsm BI. Эта модификация предназначена для удаления этих сайтов. Она также удаляет область между двумя сайтами Not I и нуклеотидами 8104-8139(?).

[00269] Стадия 1: ПЦР и очистка гелем

SEQ

ID NO:

1851-pCC1-NotI-F	151	AAGGAAAAAAGCGGCCGCccgggccg	
1852-pCC1-NotI-F2	152	AAGGAAAAAAGCGGCCGCctcgaccaatt ctcatgtttgacagc	pCC1 создал новый сайт Not I
1853-BsmBI-mut1-F	153	ctcaccagggttggtTGAtACGaaaaacatattc tc	pCC1-мутантный BsmBI
1854-BsmBI-mut1-R	154	gagaatatgttttCGTaTCagccaatccctgggtga g	pCC1-мутантный BsmBI
1855-BsmBI-mut2-F	155	cttacgtgccgatcaaCGaCTCAtttcgccaaaagt tgg	pCC1-мутантный BsmBI
1856-BsmBI-mut2-R	156	ccaacttttggcgaaaaTGAGtCGttgatcggcacg taag	pCC1-мутантный BsmBI
1857-BsmBI-mut3-	157	ggatggctcaggcatCGTgTCTctgaaaatcgactg	pCC1-мутантный

F		gatc	BsmBI
1858-BsmBI-mut3-		gatccagtcgattttcagAGAcACGatgcctgagcc	pCC1-мутантный
R	158	atcc	BsmBI
1859-BsaI-mut-F	159	cttaacctggacaGGTCaCgtgtccaactgagtgtat	pCC1-мутантный
		ag	BsaI
1860-BsaI-mut-R	160	ctatacactcagttggaacacGtGACCtgccaggtt	pCC1-мутантный
		aag	BsaI
1861-pCC1-ZraI-R	161	aatTTTGACGTCgttattagc gatgagctcggacttcc	

Rxn	Праймер F/R	Матрица
1	*1851/1854 ИЛИ *1852/1854	pCC1-CysS-CD, вырезание Cys-CD с расщеплением Not I, очистка позвоночника.
2	1853//1856	
3	1855/1858	
4	1857/1860	
5	1859/*1861	

[00270] * Для облегчения следующего этапа сборки можно использовать 1893 вместо 1851 или 1852, использовать 1894 вместо 1861.

[00271] Стадия 2. Перекрывающаяся ПЦР. Для этого метода - NEBuilder, используйте альтернативные праймеры.

Пример 2

Процедуры

ОТ-ПЦР

[00272] Штамм коронавируса 2019-nCoV/USA-WA1/2020 («WA1») (BEI Resources NR-52281, партия 70034262) был распространен BEI Resources после 3 пассажей на Vero (CCL81) в CDC и одного пассажира на Vero E6 в BEI Resources. Полная последовательность генома вируса после 4 пассажей была определена CDC и не содержала нуклеотидных различий (Harcourt et al., 2020) по сравнению с клиническим образцом, из которого он был получен (номер доступа GenBank MN985325). При получении WA1 и амплифицировали еще двумя пассажирами на клетках Vero E6 в среде DMEM, содержащей 2% FBS, при 37°C.

[00273] Вирус WA1 пассажира 6 использовали для очистки РНК вирусного генома путем экстракции реагентом Trizol (Thermo Fisher) в соответствии со стандартными протоколами. Вкратце, 0,5 мл образца вируса с титром 1×10^7 БОЕ/мл экстрагировали равным объемом Trizol. Процедура ранее была проверена в четырех отдельных экспериментах по полной инаktivации инфекционности вируса SARS-CoV2. После разделения фаз добавлением 0,1 мл хлороформа РНК в водной фазе осаждали равным объемом изопропанола. Осажденную РНК промывали 70% этанолом, сушили и ресуспендировали в 20 мкл воды, не содержащей РНКазы.

Генерация вирусной кДНК

[00274] кДНК дикого типа синтезировали с использованием системы SuperScript IV First Strand Synthesis. В каждой реакции общий реакционный объем 13 мкл для пробирки № 1 устанавливали следующим образом:

1. 50 мкМ Oligo d(T)20: 1 мкл
2. 50 нг/мкл случайного гексамера: 1 мкл
3. 10 мМ dNTP: 1 мкл
4. РНК дикого типа: 2-10 мкл
5. H₂O: добавить в 13 мкл

[00275] Образец перемешивали и инкубировали при 65°C в течение 5 минут, затем сразу же помещали на лед на 1 минуту. Была подготовлена другая пробирка (пробирка № 2) с общим реакционным объемом 7 мкл:

1. 5x буфер: 4 мкл
2. 100 мМ DTT: 1 мкл
3. Ингибитор РНКазы (40 ед./мкл): 1 мкл
4. Фермент SuperScript IV: 1 мкл

[00276] Мы смешали пробирку № 1 и пробирку № 2 до общего реакционного объема 20 мкл и инкубировали при 23°C в течение 10 минут, затем при 50°C в течение 50 минут и при 80°C в течение 10 минут для получения кДНК.

Перекрывающаяся полимеразная цепная реакция

[00277] Мастер-микс Q5 High-Fidelity 2x (NEB, Ипсвич, Массачусетс) использовали для амплификации фрагментов генома из кДНК.

[00278] Реакционная смесь объемом 20 мкл, содержащая 1 мкл свежеприготовленной кДНК, 1 мкл прямого и обратного праймеров (подробно описанных в таблице 4) при концентрации 0,5 мкМ, 10 мкл мастер-микса 2x Q5 и H₂O. Параметры реакции были следующими: 98°C в течение 30 секунд для инициирования реакции, затем 30 циклов: 98°C в течение 10 секунд, 60°C в течение 30 секунд и 65°C в течение 1 минуты и окончательное удлинение при 65°C в течение 5 минут. Всего было получено 19 фрагментов генома, все размером около 1,8 т.п.н., за исключением фрагмента 19 (около 1,2 т.п.н.), которые охватывают весь вирусный геном с перекрывающейся областью 200 п.н. между любыми двумя из них с использованием специфических праймеров (табл. 4). Ампликоны были проверены с помощью электрофореза в агарозном геле (фиг. 2А) и очищены с использованием набора для очистки ПЦР QIAquick (Qiagen). Элюирования количественно оценивали с помощью Nanodrop.

[00279] Для реконструкции всего генома COVID-19 использовали ДНК-полимеразу Q5® High-Fidelity (NEB, Ипсвич, Массачусетс).

[00280] Во-первых, все 19 фрагментов генома были использованы в перекрывающейся реакции для реконструкции полного генома. Вкратце, получили смесь из 30-40 нг каждого фрагмента ДНК (молярное соотношение между всеми фрагментами составляет 1:1), 10 мкл пятикратного реакционного буфера, 1 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл

полимеразы Q5 и H₂O до конечного объема 50 мкл. Реакцию проводили при следующих условиях: 98°C в течение 30 сек и 72°C в течение 16 мин 30 сек в течение 10 циклов.

[00281] Затем 2 мкл перекрывающегося продукта реакции смешивали с 4 мкл 5-кратного реакционного буфера, 1 мкл 10 mM dNTP, 1 мкл каждого фланкирующего праймера в концентрации 0,5 мкМ, 0,2 мкл полимеразы Q5 и H₂O до конечного объема 20 мкл и проводили ПЦР следующим образом: 98°C 30 секунд для начала реакции, затем 15 циклов 98°C в течение 10 секунд, 60°C в течение 45 секунд и 72°C в течение 16 минут 30 секунд, и окончательное удлинение при 65°C в течение 5 минут. Для проверки результатов 5 мкл продукта ПЦР визуализировали на 0,4% агарозном геле (фиг. 2B).

Таблица 4.

Праймеры для ОТ-ПЦР

SEQ ID NO:	№	Название	олиго-последовательность 5'-3'
164	2312	2312-Fr1-T7G-F3	GAtaatacgactcactatagATTAAAGGTTTATACCTTCCCAG ГТААС
10	1786	1786-COV-2	GATGCCAAAATAATGGCGATCTC
11	1787	1787-COV-3	GTTGGTTGCCATAACAAGTGTG
12	1788	1788-COV-4	СТААТТGAGGTTGAACCTCAACAATTG
13	1789	1789-COV-5	GAGTATGGTACTGAAGATGATTACCAAG
14	1790	1790-COV-6	СТАGGTGGAAATGTGGTAGGATTAC
15	1791	1791-COV-7	GCTGTTACAGCGTATAATGGTTATCTTAC
16	1792	1792-COV-8	GCTGGTTTAAGTATAATGTCTCCTACAAC
17	1793	1793-COV-9	GCACAAAACCAGTTGAAACATCAAATTC
18	1794	1794-COV-10	GCAACTAGTGTTTTGAGTTTTTCCATTG
19	1795	1795-COV-11	GTGAAGAATCATCTGCAAAATCAGC
20	1796	1796-COV-12	CAAATGATATAAGCAATTGTTATCCAGAAAGG
21	1797	1797-COV-13	GCSTTTAATACTTTACTATTCCSTTATGTCATTAC
22	1798	1798-COV-14	CCAGACAAACTAGTATCAACCATATCC
23	1799	1799-COV-15	GCTATGGGTATTATTGCTATGTCTG
24	1800	1800-COV-16	CCTACAAGGTGGTTCCAGTTC
25	1801	1801-COV-17	CGACAGATGTCTTGTGCTG
26	1802	1802-COV-18	GGTATCCAGTTGAAACTACAAATGG

27	1803	1803-COV-19	GATCAGACATACCACCCAAATTG
28	1804	1804-COV-20	CTTATGTATTGTAAGTACAAATGAAAGACATCAG
29	1805	1805-COV-21	GGTGATGATTATGTGTACCTTCCTTAC
30	1806	1806-COV-22	CTGTTAATTGCAGATGAAACATCATGC
31	1807	1807-COV-23	GTGTGTAGACTTATGAAAACATAGGTCC
32	1808	1808-COV-24	CATACAAACTGCCACCATCAC
33	1809	1809-COV-25	CCTTGTAGTGACAAAGCTTATAAAATAGAAG
34	1810	1810-COV-26	CTGGTGCAACTCCTTTATCAG
35	1811	1811-COV-27	GCAAAGAATGCTATTAGAAAAGTGTGAC
36	1812	1812-COV-28	GATAGATTCCTTTTTCTACAGTGAAGGATTC
37	1813	1813-COV-29	GACTCCTGGTGATTCTTCTTCAG
38	1814	1814-COV-30	CTCTAGCAGCAATATCACCAAGG
39	1815	1815-COV-31	GCACAAGTCAAACAAATTTACAAAACAC
40	1816	1816-COV-32	CAAAAGGTGTGAGTAAACTGTTACAAAC
41	1817	1817-COV-33	CTCACTCCCTTTCGGATGG
42	1818	1818-COV-34	GAGGTTTATGATGTAATCAAGATTCCAAATGG
43	1819	1819-COV-35	GCTACAGGATTGGCAACTATAAATTAAC
44	1820	1820-COV-36	CCATTCTAGCAGGAGAAGTTCC
45	1821	1821-COV-37	GCAATCCTGCTAACAATGCTG
46	1822	1822-COV-38	tttTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTCATTCTCCTAAGA AGCTATTAAAATC

Транскрипция in vitro

[00282] Матрицы ДНК, амплифицированные в результате полноразмерной ПЦР, очищали с использованием обычной экстракции фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом в присутствии 3М ацетата натрия перед работой с РНК. Транскрипты РНК синтезировали *in vitro* с использованием набора для транскрипции HiScribe T7 (New England Biolabs) по инструкции производителя с некоторыми модификациями. 20 мкл реакционной смеси устанавливали путем добавления 500 нг матрицы ДНК и 2,4 мкл 50 мМ GTP (соотношение кэп-аналога и GTP составляет 1:1). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 3 часов. Затем РНК осаждали и очищали осаждением хлоридом лития и один раз промывали 70% этанолом. Матрицу ДНК гена N также получали с помощью ПЦР из кДНК с использованием специфического прямого праймера (2320-N-F:

GAAtaatcagactcactataggGACGTTTCGTGTTGTTTTAGATTTTCATCTAAACG (SEQ ID NO:162), последовательность нижнего регистра представляет промотор T7; подчеркнутая последовательность представляет собой 5'-NTR выше ORF гена N), и обратного праймера (2130-N-R, ttttttttttttttttttttGTCATTCTCCTAAGAAGCTATTAATAATCACATGG (SEQ ID NO:163)).

Трансфекция клеток Vero E6 электропорацией РНК

[00283] Клетки Vero E6 получали от ATTC (CRL-1586) и поддерживали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10% FBS. Для трансфекции вирусной РНК 10 мкг очищенных полноразмерных транскриптов геномной РНК вместе с 5 мкг кэпированной мРНК WA1-N электропорировали в клетки Vero E6 с использованием системы Maxcyte ATX в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, $3-4 \times 10^6$ клеток Vero E6 один раз промывали в буфере для электропорации Maxcyte и ресуспендировали в 100 мкл того же самого. Суспензию клеток осторожно смешивали с образцом РНК, и смесь РНК/клетки переносили в блоки обработки Maxcyte OC-100. Электропорацию проводили с использованием предварительно запрограммированного протокола электропорации клеток Vero. После 30-минутного восстановления трансфицированных клеток при 37°C/5%CO₂ клетки ресуспендировали в теплой DMEM/10% FBS и распределяли по трем колбам T25 с различной плотностью посева (1/2, 1/3, 1/6 от общего количества клеток). Трансфицированные клетки инкубировали при 37°C/5%CO₂ в течение 6 дней или до появления CPE. Инфекционную среду собирали на 2, 4 и 6 день с полной заменой среды на 2 и 4 день (DMEM/5%FBS). Сгенерированные вирусы обнаруживались с помощью анализа бляшек уже через 2 дня после трансфекции с пиком образования вируса между 4-6 днями.

Пассирование исходного вируса и титрование бляшек SARS-CoV-2 в клетках Vero E6

[00284] Получали серийные 10-кратные разведения в среде DMEM/2%FBS. 0,5 мл каждого разведения добавляли в 12-луночные ячейки Vero E6, конфлюэнтность которых составляла 80%. После 1 часа инкубации при 37°C инокулят удаляли и добавляли 2 мл полутвердого покрытия на лунку, содержащее 1x DMEM, 0,3% трагакантовой камеди, 2% FBS и 1x пенициллин/стрептомицин. Через 3 или 4 дня инкубации при 37°C/5%CO₂ покрытие удаляли, лунки осторожно промывали PBS с последующей фиксацией и окрашиванием Crystal Violet.

[00285] РНК, полученную в результате транскрипции *in vitro*, использовали для трансфекции клеток Vero E6 с помощью WA1 *дикого типа* и CDX-005 и выделения живого вируса, который титровали в клетках Vero E6. После инкубации в течение 3 дней образцы бляшек окрашивали.

Кинетика многоступенчатого роста вируса

[00286] Клетки Vero (WHO 10-87) выращивали в течение 3 дней в 12-луночных планшетах, содержащих 1 мл DMEM с 5% фетальной телячьей сывороткой (FBS), до тех пор, пока они не достигли почти полного слияния. Перед инфицированием отработавшую

среду для культивирования клеток заменяли 0,5 мл свежей DMEM, содержащей 1% FBS и 30 БОЕ указанных вирусов (0,0001 MOI). После 1-часовой инкубации при 33°C или 37°C/5% CO₂ инокулят удаляли, клеточные монослои однократно промывали 1 мл PBS Дульбекко с последующим добавлением 1 мл DMEM, содержащей 1% FBS. Зараженные клетки инкубировали при 33°C или 37°C в течение 0, 6, 24, 48 или 72 часов. В указанные моменты времени собирали клетки и супернатанты (по одной лунке на момент времени), однократно замораживали при -80°C и оттаивали. Инфекционные титры вируса в лизатах определяли анализом бляшек на Vero E6 при 37°C.

Результаты

[00287] Образование отдельных фрагментов генома 1-19 и всей геномной ДНК, полученной с помощью перекрывающейся ПЦР, прошло успешно, с четкими полосами, видимыми на 0,4% агарозных гелях (фиг. 2А).

[00288] *Транскрипция in vitro* продуцировала РНК, используемую для трансфекции клеток Vero E6 с помощью S-WWW (WT) и S-WWD и выделения живого вируса, который титровали в клетках Vero E6. После инкубации в течение 3 дней анализы бляшек были окрашены, и мы наблюдали меньшие бляшки, наблюдаемые у кандидата S-WWD с частичной деоптимизацией шиповидного белка (фиг. 3), и снижение конечного титра на 40%.

Пример 3

[00289] Предварительный главный посевной вирусный материал CDX-005 (preMVS) был разработан следующим образом: РНК SARS-COV-2 BetaCoV/USA/WA1/2020 (GenBank: MN985325.1) экстрагировали из инфицированных, охарактеризованных клеток Vero E6 (ATCC CRL-1586 партия № 70010177) и преобразовывали в 19 перекрывающихся фрагментов ДНК с помощью RT-PCR с использованием коммерчески доступных реагентов и наборов. Перекрывающаяся ПЦР была использована для сшивания вместе 19 фрагментов генома размером 1,8 т.п.н. вместе с одной деоптимизированной кассетой гена шиповидного белка. В частности, 1272 нуклеотида ORF шиповидного белка представляли собой деоптимизированную кодоновую пару человека из положения генома 24115-25387, что привело к 283 молчащим изменениям мутаций по сравнению с исходным вирусом WA1/2020. Полученную полноразмерную кДНК транскрибировали *in vitro* для получения полноразмерной вирусной РНК. Восстановление вируса проводилось в новой лаборатории BSL-3 в Университете Stony Brook (Нью-Йорк), которая впервые была введена в эксплуатацию в апреле 2020 года, и наш проект был единственным проектом, когда-либо проводившимся в лаборатории. Затем эту вирусную РНК подвергали электропорации в охарактеризованных клетках Vero E6 (партия № 70010177). В результате был получен вирус CDX-005 (фиг. 3), который затем дополнительно пассировали на клетках Vero E6 с получением пассажа 1, P1 (партия № 1-060820-9-1). Материал P1 использовали в исследовании на хомячках, описанном ниже.

Пример 4

[00290] Для получения посевного вируса (preMVS), подходящего для включения в GMP, партию P1 пассировали в Codagenix в охарактеризованных нами клетках 10-87 WHO Vero (партия: 563173-MCB1, COA и характеристическое тестирование) с добавлением квалифицированной 2% фетальной телячьей сыворотки (FBS), полученной из Новой Зеландии. Полученный вирус очищали центрифугированием, стерильно фильтровали и помещали в криобирки объемом 2 мл с получением preMVS (партия № 1-061720-1) с титром 5×10^5 $2,6 \times 10^6$ БОЕ/мл. PreMVS должен быть отправлен в BioReliance (Глазго, Великобритания) для тестирования на стерильность и микоплазму в соответствии с BSL3. Кроме того, культуре Vero, которая продуцировала 1-061720-1, давали расти в течение дополнительных двух дней до полного цитопатического эффекта, а затем помещали в флаконы для проведения всестороннего молекулярного тестирования адвентивных вирусов, включая вирусы обезьян, человека, свиньи и крупного рогатого скота, в Charles River Laboratories, Малверн, Пенсильвания, США (таблица 5).

Таблица 5. Панель тестирования случайных вирусов для CDX-005 preMVS.

Человек	Обезьяна	Свинья	Крупный рогатый скот
Аденовирус Адено-ассоциированный вирус (AAV) Цитомегаловирус (CMV) Вирус Эпштейна-Барра (EBV) Гепатит А, В и С Герпес 6, 7 и 8 Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) Т-лимфотрофический вирус человека (HTLV-1 и HTLV-2) Спумавирус человека (HFV)	Ретровирус беличьей обезьяны (SMRV) Обезьяний Т-лимфотропный вирус (STLV) Вирус иммунодефицита обезьян (SIV) Спумавирус обезьяны (SFV) Обезьяний вирус 40 (SV40) Ретровирус обезьян -1, -2 и -3 (SRV -1, -2 и -3)	Цирковирус типа 1 и 2	Вирус полиомы крупного рогатого скота Цирковирус крупного рогатого скота

[00291] Исходный вакцинный вирус (MSV) используется в качестве пробного материала фазы I и производится сGMP. CDX-005 будет производиться в клеточной линии Vero (ATCC CCL-81), тестироваться с использованием квалифицированных методов и выпускаться для клинических испытаний. Состав CDX-005 в настоящее время используется для их интраназальной живой ослабленной противогриппозной вакцины в испытаниях фазы III, которая показала стабильность и безопасность. Процесс изготовления показан ниже.

[00292] Процесс производства CDX-005

Расширение клеточной культуры Vero

↓

Инфицирование CDX-005 pre MVS

↓

Сбор вируса

↓

Осветление сбора путем фильтрации

↓

Очистка вируса

Нуклеазная обработка осветленного сбора.

Концентрация по TFF

Добавление стабилизатора

Стерильная фильтрация.

↓

CDX-005 Нерасфасованная лекарственная субстанция (BDS) - для замораживания

Пример 5А

[00293] Специальная рабочая группа экспертов ВОЗ по моделированию COVID-19 пришла к выводу, что как макаки-резусы, так и хорьки, по-видимому, воспроизводят заболевание человека от легкой до средней степени тяжести, но более поздняя работа (Chan, Sia) предполагает, что сирийские золотые хомячки могут быть более полезной моделью для воспроизведения более тяжелых легочных проявлений этой инфекции.

[00294] Для исследования свойств CDX-005 in vivo мы обратились к сирийским золотым хомячкам. Недавний обзор существующих моделей животных показывает, что эти хомячки лучше всего повторяют характеристики болезни человека COVID-19. SARS-CoV-2 эффективно размножается в легких хомячка, вызывая тяжелые патологические поражения после интраназального заражения. Вирусные антигены присутствуют в слизистой оболочке носа, бронхиальном эпителии и участках консолидации легких на 2-й и 5-й дни после прививки SARS-CoV-2, которые исчезают на 7-й день. Клинические признаки включают учащенное дыхание, потерю веса, гистопатологические изменения в легких/дыхательных путях, поражение кишечника, атрофию селезенки и лимфоидной ткани, а также активацию цитокинов в течение одной недели после инфицирования вирусом. Зараженные хомячки могут заразить других хомячков, содержащихся в той же клетке, и нейтрализующие антитела (Ab) обнаруживаются на 14-й день после заражения.

[00295] Авторы изобретения оценили ослабление CDX-005 P1 (партия № 1-060820-9-1) по сравнению с BetaCoV/USA/WA1/2020 дикого типа на модели хомячка в

соответствии с BSL-3. Кроме того, в нашем контрольном заражении диким типом через 14 дней после вакцинации будет изучено наличие/отсутствие усиления вакцины.

[00296] Тридцати шести самцам хомячков в возрасте 5-8 недель в день 0 интраназально через пипетку (по 12 в группе) вводили 0,05 мл либо номинальных доз 5×10^4 БОЕ/мл, либо 5×10^3 БОЕ/мл WA1/2020 SARS-CoV-2 дикого типа или 5×10^4 БОЕ/мл CDX-005 и затем в течение 2, 4, 14 и 16 дней. Конечные результаты включают наблюдение сбоку клетки два раза в день, ежедневное взвешивание и температуру два раза в день в течение 5-го дня, а затем ежедневно в течение 14-го дня. Вирусная нагрузка будет измеряться с помощью количественной ПЦР и TCID₅₀ в смыве из носа, легочной ткани, головном мозге и почках на 2, 4 и 6 дни после введения дозы. Правое легкое, правая почка и правое полушарие головного мозга будут зафиксированы для гистопатологического исследования в одни и те же моменты времени. На 14-й день оставшиеся 3 животных, которым вводили CDX-005, будут заражены 5×10^4 БОЕ/мл WA1/2020 дикого типа, и на 16-й день будут измерены вирусная нагрузка в смывах из носа, легких, головном мозге и почках вместе с гистопатологией этих же органов.

Таблица 6. Оценка CDX-005 у сирийских золотых хомячков.

Оценка CDX-005 у сирийских золотых хомячков

Группа	Вирус	N	БОЕ/мл дозы	Заражение (День)	Органы/NW n=3 (день)	Тело Температура/ Массы (Дни)
1	CDX-005 1-060820-9-1	12	5×10^4	14	2,4,6, 16	0-16
2	WA1/2020	12	5×10^4	n/a	2,4,6	0-14
3	WA1/2020	12	5×10^3	n/a	2,4,6	0-14

[00297] Исходные данные измерения потери веса через 6 дней после прививки из этого исследования показаны на фиг. 4. CDX-005, по-видимому, значительно ослаблен по сравнению с диким типом. У хомячков, получавших номинальную дозу 5×10^4 CDX-005, наблюдалось увеличение веса в среднем на 4,1%, тогда как у хомячков, которым вводили дикий тип SARS-CoV-2 в номинальных дозах 5×10^4 и 5×10^3 , наблюдалось снижение веса в среднем на -2,5%. Продолжается обратное титрование доз для определения точных доз, введенных в этом исследовании.

[00298] Учитывая примерный вес хомячка 0,1 кг, экстраполяция дозы вакцины для хомячка 5×10^4 на человека весом 70 кг будет эквивалентна дозе $3,5 \times 10^7$, что выше вероятной максимальной клинической дозы, подлежащей испытанию.

[00299] Кроме того, в нашем контрольном заражении диким типом через 14 дней после вакцинации исследуется наличие/отсутствие усиления вакцины.

[00300] Наконец, мы ценим небольшой размер выборки; однако неотложный характер пандемии в сочетании с нехваткой места BSL-3 и эта демонстрация заметного ослабления должны поддерживать тестирование CDX-005 у здоровых взрослых с низким уровнем риска, у которых часто бывает бессимптомная инфекция даже с SARS-CoV-2 дикого типа.

[00301] Одна доза $5,0 \times 10^4$ БОЕ CDX-005 защищала от заражения диким типом через 16 дней после введения. Эта фармакологическая доза привела к отсутствию распределения в головном мозге или почках и ограниченному распределению в легкие с минимальными гистопатологическими данными.

[00302] Поскольку заболевание COVID-19 связано с легочной, обонятельной и нервной дисфункцией, мы измерили вирусную нагрузку в гомогенизированных легких, обонятельных луковицах и головном мозге. Общая вирусная РНК, измеренная с помощью количественной ПЦР, была близка или ниже предела обнаружения в легких, обонятельных луковицах и головном мозге на 2-й и 4-й дни после инокуляции (PI) у хомячков, инокулированных CDX-005. Напротив, вирусная РНК была обнаружена у хомячков, инфицированных WA1 *дикого типа*, во всех трех тканях в оба раза (фиг. 6а-с). Чтобы проверить наличие инфекционного вируса, мы провели анализы TCID₅₀ на гомогенатах легких на 2, 4 и 6 дни PI (фиг. 6d). К 4-му дню инфекционная вирусная нагрузка была почти в 10 000 раз ниже в легких животных, инокулированных CDX-005, по сравнению с животными, инфицированными WA1 *дикого типа* при любой дозе (N=3/группа; P<0,01 по факторному ANOVA для независимых образцов) (фиг. 6d). Таким образом, CDX-005 сильно ослаблен по сравнению с WA1 *дикого типа* in vivo.

[00303] Для оценки безопасности CDX-005 изменение веса хомячков отслеживали в течение девяти дней после инокуляции. У хомячков, инокулированных CDX-005, наблюдалось увеличение веса в течение этого периода, тогда как у хомячков, инокулированных WA1 *дикого типа* в любой дозе, наблюдалось снижение веса (фиг. 7а). Только на 9-й день PI животные, получавшие WA1 *дикого типа*, вернулись к своему исходному весу (фиг. 7а). Смешанная модель ANOVA показала, что изменения значительно различались между группами, получавшими CDX-005 и WA1 *дикого типа* (P<0,001).

[00304] Мы также провели гистологическое исследование легких, головного мозга и почек. Фиксированные в формалине парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, и ветеринарный патологоанатом, сертифицированный министерством здравоохранения, работающий с обезличенными данными, проводил световую микроскопию (N=3 на группу). Множественные параметры оценивались по шкале оценки патологии от 0 до 5. В срезах головного мозга и почек хомячков, которым вводили WA1 *дикого типа* или CDX-005, не было отмечено никаких изменений. Однако в соответствии с патологической клеточной инфильтрацией, обнаруженной в легких людей с COVID-19, альвеолярные и/или периваскулярные, или перибронхиолярные смешанные клеточные инфильтраты, некроз бронхиолярного или бронхиального эпителия с нейтрофильной

инфильтрацией в просвете и периваскулярный отек, иногда сопровождающийся гиперплазией бронхиолярного или бронхиального эпителия наблюдали у хомячков, инфицированных WA1 *дикого типа* (фиг. 7b-c). Напротив, легочная патология ограничивалась минимальными альвеолярными или легкими периваскулярными или перибронхиолярными смешанно-клеточными инфильтратами на 6-й день PI у хомячков, инокулированных CDX-005 (фиг. 7b-c).

[00305] Чтобы оценить эффективность CDX-005 в качестве вакцины, мы измерили ее способность индуцировать антитела против WA1 *дикого типа*. Во-первых, мы провели ИФА для определения титров IgG против SARS-CoV-2 Spike S1 в сыворотке от не получавших лечение(ложных) хомячков и хомячков, инокулированных WA1 *дикого типа* или CDX-005. Как и WA1 *дикого типа*, инокуляция CDX-005 индуцировала сильный ответ антител против Spike S1 (фиг. 8a). Затем мы проверили наличие нейтрализующих антител против вируса WA1 *дикого типа* в сыворотке инокулированных хомячков с помощью титров нейтрализации уменьшения бляшек (PRNT) на 16-й день PI. Мы рассчитали 50-, 80- и 90-процентную нейтрализацию (ингибирование образования бляшек) при разведении сыворотки до 1280-кратного (фиг. 8a). Все хомячки, инокулированные CDX-005, продуцировали титры нейтрализующих антител на уровнях, сходных с теми, которые индуцируются при инокуляции WA1 *дикого типа* (фиг. 8b).

[00306] Наконец, мы измерили эффективность CDX-005 в исследовании с контрольным заражением. Хомячков вакцинировали интраназально (IN) однократной дозой 5×10^4 БОЕ CDX-005, а затем инъекционно заражали 5×10^4 БОЕ WA1 *дикого типа* на 16-й день PI. Легкие собирали на 18-й день (2-й день после заражения) и измеряли вирусную нагрузку с помощью qRT-PCR. Вирусная нагрузка контрольного вируса WA1 *дикого типа* была снижена более чем в 10 000 раз в легких вакцинированных CDX-005 по сравнению с невакцинированными хомячками, что свидетельствует об эффективности вакцины (фиг. 8c). В то время как вирус SARS-CoV-2 был обнаружен в головном мозге зараженных ложных инокулированных хомячков, он не был обнаружен у животных, защищенных CDX-005 (фиг. 8c). Уровни в обонятельных луковицах статистически не различались в двух группах (фиг. 8c). Таким образом, CDX-005 обеспечивал защиту, и не было доказательств усиления вакцино-индуцированного заболевания при контрольном заражении. Мы также обнаружили, что уровни антител IgG оставались высокими у хомячков, инокулированных CDX-005, на 2-й день после заражения (фиг. 8a).

Пример 5B

Исследования хомячков

[00307] Специальная *рабочая* группа экспертов ВОЗ по моделированию COVID-19 пришла к выводу, что как макаки-резусы, так и хорьки, по-видимому, воспроизводят заболевание человека от легкой до средней степени тяжести, но более поздняя работа предполагает, что сирийские золотые хомячки могут быть более полезной моделью для воспроизведения более тяжелых легочных проявлений этой инфекции. 1-3 Таким образом, Codagenix в настоящее время оценивает ослабление CDX-005 P1 (партия № 1-060820-9-1)

по сравнению с WA1 в модели хомяка в соответствии с BSL-3. Все исследования на животных проводились в соответствии с протоколами, утвержденными ПТ Research Institute IACUC.

[00308] В исследовании использовали 36 самцов сирийских хомячков (Charles Rivers) в возрасте 5-6 недель. Для контрольного заражения хомячков анестезировали кетаминном (100 мг/кг) и ксилазином (10 мг/кг) посредством внутривентриальной инъекции и инокулировали интраназально в День 0 (по 12 в группе) 0,05 мл либо номинальных доз 5×10^4 БОЕ/мл, либо 5×10^3 БОЕ/мл WA1 SARS-CoV-2 *дикого типа* или 5×10^4 БОЕ/мл CDX-005. Животных наблюдали два раза в день, и массу тела измеряли ежедневно в течение 8-го дня, а затем ежедневно с 16-го по 18-й день. На 16-й день трех инокулированных CDX-005 животных интраназально заражали 5×10^4 БОЕ/мл WA1 *дикого типа*. Шесть хомячков, не получавших лечение, инокулированных либо 5×10^4 БОЕ/мл (N=3), либо 5×10^3 БОЕ/мл (N=3) WA1 *дикого типа*, служили в качестве контроля. Мы объединили эти две группы, так как титры перекрывались при двух дозах инокуляции.

Масса

[00309] Эти 36 хомячков и еще 58 (половина самок/половина самцов) 5-6-недельных сирийских золотистых хомячков (Чарльз Риверс) использовались для изучения влияния прививки CDX-005 и WA1 *дикого типа* на здоровье хомячков, оцениваемое по потере массы. (Эти дополнительные хомячки в настоящее время оцениваются на предмет других эффектов, опосредованных CDX-005 и WA1 *дикого типа*). Всего ежедневно в течение девяти дней взвешивали сорок 5×10^4 БОЕ CDX-005, сорок 5×10^4 БОЕ WA1 *дикого типа* и двенадцать 5×10^3 БОЕ WA1 *дикого типа*. N уменьшалось с течением времени для каждой группы, так как животных умерщвляли по другим конечным точкам в разные дни PI. Минимальное значение N для 5×10^4 БОЕ CDX-005 и 5×10^4 БОЕ WA1 *дикого типа* составляло 10 и 3 для 5×10^3 БОЕ WA1 *дикого типа*.

Сбор тканей

[00310] На 2, 4, 6 день после инокуляции по три хомячка из каждой группы и по три хомячка на 18 день из животных, зараженных на 16 день, подвергали эвтаназии внутривенной инъекцией Veutanasia в дозе 150 мг/кг. Левое легкое брали для определения вирусной нагрузки. Для измерения вирусной нагрузки легкие гомогенизировали в 10% масс./об. в среде DMEM с антибиотиками с использованием гомогенизатора тканей (гомогенизатор Omni) на 18-й день у животных, зараженных на 16-й день. Мы попытались провести промывание носа, но не смогли получить воспроизводимые промывания у этих мелких животных.

Гистопатология

[00311] Гистопатологию проводил работающий с обезличенными данными лицензированный ветеринарный патологоанатом. Легкие, головной мозг и почки фиксировали в формалине, обезживали, заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином. Оценка световой микроскопии проводилась работающим с обезличенными данными сертифицированным ветеринарным патологоанатомом. Каждая

ткань оценивалась по нескольким патологическим параметрам, а срезы оценивались как 0=нормальная, 1=минимальная, 2=легкая, 3=умеренная, 4=выраженная или 5=тяжелая. Оценка всех тканей включала оценку клеточной инфильтрации. Для каждого органа исследовали по меньшей мере пять срезов и усредняли оценки.

Вирусная нагрузка

[00312] Вирусную нагрузку измеряли с помощью количественной ПЦР и TCID₅₀ в собранной ткани. Для измерения вирусной нагрузки ткань гомогенизировали в 10% масс./об. в среде DMEM с антибиотиками с использованием гомогенизатора с бисерной мельницей (Omni). Инфекционные титры вируса определяли с помощью анализа инфекционной дозы 50% тканевой культуры (TCID₅₀), титруя 10-кратные серийные разведения гомогената легких на клетках Vero E6, и выражали в log₁₀ единиц TCID₅₀ на мл. РНК экстрагировали из 100 мкл гомогената головного мозга с использованием набора Quick-RNA Viral (Zymo Research) в соответствии с протоколом производителя. qRT-PCR проводили с использованием одноэтапного набора универсальных зондов iTaq (Bio-Rad) при следующих условиях цикла ПЦР: 40 циклов по 15 с при 95°C, 15 с при 60°C и 20 с при 72°C.

Антитела - Титр нейтрализации уменьшения бляшек

[00313] Сыворотку хомячков, собранную на 16-й день PI, инактивировали нагреванием в течение 30 минут при 56°C. Двукратные серийные разведения по 50 мкл выполняли в среде DMEM/1% FBS в 96-луночных планшетах с U-образным дном, начиная с исходного разведения 1:5. Приблизительно 30 БОЕ SARS-CoV-2 Washington/1/2020 в 50 мкл DMEM/1% FBS добавляли к разведениям сыворотки и перемешивали, доводя конечный объем в лунках для нейтрализации до 100 мкл, а общее начальное разведение сыворотки до 1:10. Планшеты для разведения инкубировали в течение одного часа при 37°C/5% CO₂.

[00314] Среду для выращивания клеток на 24-луночных планшетах, содержащих конфлюэнтные монослои клеток Vero E6 (засеянных за день до этого в DMEM/5% FBS), удаляли и добавляли 150 мкл свежей DMEM/1% FBS, а затем по 100 мкл каждой реакции нейтрализации. После адсорбции вируса в течение одного часа при 37°C/5% CO₂ в 24-луночные планшеты добавляли 0,75 мл полутвердого слоя для получения конечной концентрации 1 x DMEM, 1,75% FBS, 0,3% трагакантовой камеди, 1 x пенициллин+стрептомицин в общий объем 1 мл. 24-луночные планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37°C для образования бляшек. Бляшки визуализировали путем фиксации и окрашивания монослоев клеток 1% кристаллическим фиолетовым в 50% метаноле/4% формальдегиде. Титр нейтрализации уменьшения бляшек (PRNT)₅₀, 80, 90 определяли как обратную величину последнего разведения сыворотки, которое уменьшило количество бляшек на заранее заданное пороговое значение (50%, 80%, 90%) по отношению к количеству бляшек в ненейтрализованных лунках (содержащие сыворотку хомячка, не получавшего лечение). Сыворотке, которая не нейтрализовала при наименьшем разведении (1:10), присваивали титр 5, а сыворотке, которая нейтрализовала

при самом высоком разведении тестируемой сыворотки (1:1280), присваивали титр ≥ 1280 .

Антитела - ИФА IgG

[00315] 96-луночные планшеты покрывали шиповидным белком SARS-CoV-2 (2019-nCoV) S1-His (Sino Biological) в количестве 30 нг/лунку в 50 нг/мл BSA/0,05 М карбонатного/бикарбонатного буфера с pH 9,6 в течение ночи при 4°C. Планшеты блокировали 10% козьей сывороткой в PBS в течение 2 ч при 37°C, промывали четыре раза промывочным буфером (0,1% Tween 20 в PBS), затем инкубировали с серийно разбавленной сывороткой (начальное разведение 1:10 и последующее двукратное разведение) в 10% козьей сыворотки/0,05% Tween-20 в PBS и инкубировали 1 час при 37°C. Планшеты промывали четыре раза промывочным буфером, затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) 1:10000 аффинным чистым козьим IgG против сирийского хомячка (H & L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) в течение 1 часа при 37°C. После инкубации планшеты четыре раза промывали промывочным буфером и добавляли Thermo Scientific OPD (о-фенилендиамин дигидрохлорид) для колориметрической реакции. После 10 мин инкубации в темноте при 25°C реакцию останавливали добавлением 50 мл 2,5 М раствора серной кислоты и определяли полученную оптическую плотность на считывающем устройстве для микропланшетов при 490 нм. Регистрировали относительные уровни IgG среди разных групп и сравнивали как логарифм разведения, при котором интенсивность колориметрического продукта реакции OPD достигала пятикратного превышения фоновой (без сыворотки) контрольной интенсивности.

Пример 6

Характеристики CDX-005

[00316] CDX-005 содержит 283, а CDX-007 содержит 149 молчащих мутаций в гене шиповидного белка относительно вируса WA1 *дикого типа*. Полученную полноразмерную WA1 *дикого типа* и деоптимизированную кДНК транскрибировали *in vitro* с получением полноразмерной вирусной РНК, которую электропорировали в клетки Vero E6. Трансфицированные клетки инкубировали в течение 6 дней или до появления CPE. Инфекционную среду собирали на 2-й, 4-й и 6-й дни. Титр вируса определяли анализом бляшек на клетках Vero E6. Бляшки были видны уже на 2-й день после трансфекции с пиковым образованием вируса на 4-6 дни. Хотя бляшки, образованные CDX-005 и CDX-007, меньше, чем *дикого типа*, оба они интенсивно растут в клетках Vero E6, что указывает на их пригодность для масштабного производства. Таким образом, как и в случае с другими нашими вакцинами SAVE, мы смогли быстро создать несколько вакцин-кандидатов с разной степенью ослабления.

[00317] Поскольку CDX-005 более деоптимизирован и более ослаблен, чем CDX-007, но растет достаточно быстро, чтобы его можно было производить в больших масштабах, чтобы максимизировать безопасность *in vivo*, мы выбрали его для дальнейшего изучения. В CDX-005 1272 нуклеотида ORF шиповидного белка были деоптимизированы для клеток человека, что привело к 283 молчащим мутациям. Сайт

расщепления многоосновным фурином был удален из шиповидного белка для дополнительного ослабления и безопасности.

[00318] Мы провели исследования по оптимизации роста для CDX-005 в наших клетках Vero (WHO-10-87) без животного происхождения (AOF), охарактеризованных согласно GMP, чтобы мы могли начать крупномасштабное производство вакцины к четвертому кварталу 2020 года. Рост при 33°C приводит к более высоким титрам как CDX-005, так и WA1 *дикого типа*, чем при 37°C. Вирус достигает пика до того, как наблюдается цитопатический эффект (CPE), при этом 80-90% вируса ассоциировано с клеткой на пике. Хотя кинетика различается, одинаковые титры вируса могут быть достигнуты при 0,01 MOI и 0,0001 MOI.

[00319] Мы также исследовали оптимальные условия для сбора вируса. Клетки Vero WHO 10-87 выращивали в среде DMEM с 5% фетальной бычьей сывороткой (FBS) при 37°C/5% CO₂. Через 48 часов после инфицирования CDX-005 в культуре при 33°C клетки и супернатант собирали, используя схемы, описанные на фиг. 11.

[00320] Данные показывают, что через 48 часов после инфицирования 0,01 MOI при 33°C большая часть CDX-005 является клеточно-ассоциированной (~80-90%), но выделение вируса из клеток Vero является прямым. Гипотонический лизис является эффективным средством для сбора CDX-005, и широкое окно лизиса предполагает, что этот метод будет осуществим в больших партиях, где может быть полезна некоторая гибкость.

[00321] Лизис замораживанием/оттаиванием также эффективен, а FBS не является ни необходимым, ни полезным. Это желательно как потому, что FBS во время инфекции может привести к избыточному росту клеток Vero, снижая выход вируса, так и FDA предпочитает производство без сыворотки. Также следует отметить, что CDX-005 оказался стабильным при замораживании в простой DMEM, поскольку FBS практически не стабилизировался, по меньшей мере, после двух циклов замораживания/оттаивания. Таким образом, при оптимальных сроках сбора урожая, независимо от того, выращивали ли они при 33°C или 37°C, обычно наблюдаются объемные титры 2-3×10⁷ БОЕ/мл CDX-005 или около 10⁶ БОЕ/см² площади поверхности роста.

[00322] На основании этих исследований в настоящее время мы выращиваем CDX-005 путем инокуляции клеток Vero (WHO-10-87) с 0,01 MOI при 33°C. Мы выбрали и протестировали состав вакцины DMEM с 5% сахарозой и 5% глицином для наших первых исследований на людях в Великобритании. В этом составе CDX-005 стабилен, по меньшей мере, в течение трех циклов замораживания-оттаивания и одного месяца при температуре -80°C (на данный момент это самый длительный протестированный срок хранения).

[00323] Наконец, в качестве первого шага в оценке геномной стабильности CDX-005 мы секвенировали вирусные пассажи 1-6 после размножения вируса на клетках Vero (WHO 10-87). Данные показывают, что вирус чрезвычайно стабилен. Секвенирование пассажи 6 не выявило субпопуляций. Мы вырастили и собрали девять пассажей и в настоящее время секвенируем пассаж 9. Мы завершим сбор и секвенирование пассажи 10

к началу описанной в данном документе работы.

Пример 7

Оцените иммуногенность SARS-CoV-2 (WA1 дикого типа) и CDX-005 с помощью ИФА сывороточного антитела IgG и анализов PRNT.

[00324] **Th1/Th2:** Т-клетки, специфичные для SARS-CoV-2, присутствуют относительно рано и со временем увеличиваются у инфицированных людей. Наиболее сильные ответы Т-клеток, по-видимому, направлены на поверхностный гликопротеин шиповидного белка (S), а специфичные для SARS-CoV-2 Т-клетки преимущественно продуцируют эффекторные цитокины и цитокины Th1, хотя обнаруживаются цитокины Th2 и Th17. Было высказано предположение, что Th1- и Т-цитотоксические лимфоциты являются иммунными клетками, наиболее пораженными SARS-CoV-2, и что ответы Т-клеток и баланс Th1/Th2 могут частично определять тяжесть течения COVID-19. У пожилых людей, которые обычно имеют ослабленные Th1-ответы, иммунная система может быть вынуждена перейти в Th2-ответ, чтобы противодействовать вирусной нагрузке, вызывая все негативные эффекты Th2-ответа, серьезно усугубляя клиническую картину. Интересно, что ответы Т-клеток на SARS-CoV-2 также различаются у взрослых и детей. У взрослых, но не у детей, у которых развился COVID-19, наблюдается повышенное количество активированных клеток CD4 и CD8, экспрессирующих D-родственный антиген (DR), и уровни IL-12, IL-1β и CXCL9 в плазме. Это предполагает выраженную поляризацию Th1 иммунного ответа против SARS-CoV-2 у инфицированных взрослых по сравнению с детьми. Поскольку CDX-005 представляет собой живой вирус, который, в отличие от других классов вакцин, может усиливать иммунный ответ, индуцируя ответы Т-клеток, изучение баланса Th1/Th2 в соответствии с указаниями FDA является особенно актуальным.

[00325] Как указано FDA, мы будем измерять уровни мРНК в ткани легких для факторов Th1/Th2, интерферона гамма (IFN γ), интерлейкина 12 (IL-12), фактора некроза опухоли альфа (TNF β), IL4, IL10 и трансформирующего фактора роста бета. (TGF β). Гомогенаты тканей будут проанализированы с помощью количественной ПЦР с использованием опубликованных специфичных для хомячков праймеров и условий. Анализы будут проводиться в Bioqual с использованием стандартных внутренних процедур.

[00326] Мы ожидаем, что инокуляция как WA1 *дикого типа*, так и CDX-005 будет индуцировать преимущественно ответ Th1, поскольку они будут молодыми (но не ювенильными животными). Мы ожидаем, что реакция на первоначальную прививку будет отличаться от реакции на заражение, и что эти различия могут дать представление о природе иммунного ответа, вызванного SARS-CoV-2.

Пример 8

Оцените влияние SARS-CoV-2 (WA1 дикого типа) и CDX-005 на баланс Th1/Th2 с помощью количественной ПЦР.

[00327] *Эффективность* Мы проведем стандартное контрольное исследование для оценки эффективности вакцины CDX-005 на позднем пассаже. Хомячки, инокулированные либо 5×10^4 БОЕ CDX-005, либо носителем, будут заражены $\sim 1,0 \times 10^5$ TCID₅₀ WA1 *дикого типа* на 27-й день. День 27 был выбран на основании других исследований на хомячках и наших собственных данных. Три ложно зараженных животных будут включены в качестве одновременных отрицательных контролей, по одному для каждого из трех моментов времени, в которые мы будем умерщвлять зараженных животных. Опять же, выбор жертвы на 2-й и 4-й день после заражения основан на опубликованных и наших собственных данных. Мы включили более позднюю временную точку по предложению FDA и для лучшего понимания иммунных реакций, вызванных SARS-CoV-2. Анализ сыворотки и ткани хомячка будет включать те же анализы с использованием тех же протоколов, что и для хомячков, которым вводили только инокулят.

[00328] Мы ожидаем, что прививка CDX-005 на позднем пассаже обеспечит защиту от заражения, подобную защите от вируса раннего пассажа. Данные свидетельствуют о том, что вакцинация CDX-005 является высокоэффективной, снижая титры в легких на 2-й день количественной ПЦР по меньшей мере в 5000 раз. Более чем 100-кратная потеря эффективности или значительные различия в показателях безопасности (т. е. биораспределение, гистопатология или ослабление) позднего пассажа по сравнению с ранним пассажем CDX-005 требуют дальнейшего изучения. **Мы проинформируем FDA и будем работать с ними, чтобы принять решение о следующих шагах.**

Пример 9

[00329] В качестве прелюдии к переносу CDX-005 на первые клинические испытания на людях мы изучили реакцию приматов, отличных от человека, на вакцину. Мы инокулировали интраназально пятнадцать африканских зеленых мартышек, шесть с помощью 10^6 БОЕ WA1 *дикого типа*, шесть с помощью 10^6 БОЕ CDX-005 и трое с помощью PBS Дульбекко. Наши результаты показывают, что, хотя титры вируса в промывной жидкости животных, инокулированных WA1 *дикого типа* и CDX-005, были одинаковыми на 4-й день PI, титры вируса оставались высокими у WA1 *дикого типа*, но резко упали до неопределяемого у обезьян, инокулированных CDX-005. Эти данные дополнительно демонстрируют потенциал CDX-005 в качестве вакцины против SARS-CoV-2.

Пример 10

Первое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование с увеличением дозы на здоровых подростков с оценкой безопасности и иммуногенности COVID-VAC

[00330] COVI-VAC - это живая ослабленная вакцина с CDX-005 для предотвращения COVID-19. Ослабленный вирус несет 283 сконструированных молчащих мутации с деоптимизированной по кодоновой паре последовательностью нуклеиновой

кислоты человека в гене, кодирующем шиповидный белок вируса, и делецией сайта расщепления фурином в гене шиповидного белка. Кроме того, он несет 2 молчащие и 5 немолчащих мутаций, которые были отобраны в процессе восстановления вируса в клетках Vero.

[00331] Основная цель исследования - оценить безопасность и переносимость COVI-VAC при 1 или 2 дозах примерно 5×10^4 , 5×10^5 и 5×10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ), вводимых в виде капель в нос. Конечными результатами являются: события реактогенности в течение 14 дней после каждой дозы; нежелательные явления (АЕ) с 1 по 57 день; АЕ, требующие оказания медицинской помощи (МААЕ), впервые возникшие хронические заболевания (NCI), серьезные АЕ (SAE) с 1-го по 400-й день.

[00332] Вторичная цель исследования - оценить гуморальную иммуногенность COVI-VAC, вводимой в виде капель в нос. Конечными результатами являются: титр иммуноглобулина G (IgG), измеренный с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке, собранной в дни 1, 15, 29, 43, 57, 120, 210 и 400; уровень нейтрализующих антител, измеренный с помощью анализа микронейтрализации в сыворотке, собранной в дни 1, 15, 29, 43, 57, 120, 210 и 400.

[00333] Исследовательские цели и конечные результаты включают:

для измерения величины и продолжительности выделения вакцинного вируса после введения капель в нос COVID-VAC: количество копий/мл, оцененное с помощью количественного анализа полимеразной цепной реакции (qPCR) в образцах мазков из носоглотки; результаты посева образцов стула, собранных на 4/5 и 14/15 дни;

для оценки клеточной иммуногенности COVI-VAC, вводимого в виде капель в нос; для оценки иммуногенности слизистой оболочки COVI-VAC, вводимого в виде капель в нос: Пятнообразующие единицы (SFU)/ 10^6 клеток, измеренные с помощью иммуноферментного точечного анализа с интерфероном-гамма (IFN- γ) (ELISpot) в цельных убитых вирус-стимулированных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), собранных в дни 1, 8, 29 и 36;

для оценки иммуногенности слизистой оболочки COVI-VAC, вводимого в виде капель в нос: титр иммуноглобулина А (IgA), измеренный с помощью ИФА в образцах назального тампона, собранных в дни 1, 15, 29, 43 и 57;

для измерения заболеваемости респираторными заболеваниями, в том числе вызванными инфекцией SARS-CoV-2, после введения капель в нос COVI-VAC: Результаты мультиплексной ПЦР респираторной панели (включая SARS-CoV-2); Результаты мультиплексной ПЦР респираторной панели (включая SARS-CoV-2) у субъектов с респираторными МААЕ; и

для оценки генетической стабильности вакцинного вируса: Анализ последовательности вакцинного вируса из образцов мазка из носоглотки

[00334] Это исследование представляет собой рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование фазы 1 с повышением дозы для оценки безопасности и иммуногенности COVI-VAC у здоровых взрослых в возрасте от 18

до 30 лет. Потенциальные субъекты будут проверены с использованием общего процесса проверки на сайте, и лица, прошедшие этот отбор, будут помещены в карантинное отделение за 1-2 дня до введения дозы (день -2/-1) и предоставят информированное согласие. Затем они будут проверены на соответствие требованиям для этого исследования перед рандомизацией в день 1. Приблизительно 48 субъектов, которые соответствуют всем критериям включения в исследование и критериям исключения, будут включены в 3 когорты с нарастающими дозами и рандомизированы в каждой когорте в соотношении 3:3:2 для получения 2 доз COVI-VAC/плацебо (физиологический раствор), как показано в таблице ниже.

Когорта	COVI-VAC	COVI-VAC дни 1 и 29	COVI-VAC Всего	Плацебо Дни 1 и 29	Всего
	День 1 Плацебо день 29				
1 (5×10^4 БОЕ)	6	6	12	4	16
2 (5×10^5 БОЕ)	6	6	12	4	16
3 (5×10^6 БОЕ)	6	6	12	4	16
Всего	18	18	36	12	48
Сокращения: БОЕ=бляшкообразующие единицы					

[00335] Когорта 1 будет включать дозорную группу из 3 субъектов (2 активных, 1 плацебо). Комитет по обзору безопасности (SRC) рассмотрит обезличенные данные по безопасности для этих 3 субъектов до 8-го дня, прежде чем остальные субъекты в когорте 1 получат дозу.

[00336] Субъекты будут оставаться в карантинном отделении до 14 дней после введения дозы 1 (и дозы 2, если она вводится в стационарных условиях) и будут выписаны на 15-й день (и 43-й, если применимо), если только у субъекта не появятся клинически значимые симптомы или признаки продолжающейся вирусной инфекции или отделение карантина было проинформировано лабораторным подразделением о том, что субъект выделяет вакцинный вирус на уровне с более чем низким риском передачи, как указано в Плана управления рисками (на основе образца мазка из носоглотки на 14/42 день). Эти субъекты будут по-прежнему находиться в карантинном отделении до тех пор, пока результаты количественной ПЦР не будут соответствовать низкому риску передачи (образцы будут собираться два раза в день).

[00337] SRC также рассмотрит обезличенные данные по безопасности в течение 15-го дня и обезличенные данные выделения мазка из носоглотки в течение по меньшей мере 8-го дня, чтобы определить, будет ли группа субъектов помещена в карантинное

отделение на 14 дней после дозы 2 или будет выписана на 29-й день и впоследствии наблюдаться амбулаторно. Если субъекты должны рассматриваться как амбулаторные пациенты, SRC также решит, используя эти данные, в течение каких 2 дней в первую неделю после дозы 2 субъекты вернутся в отделение для посещений. Если субъекты будут рассматриваться как стационарные пациенты, SRC также определит частоту сбора образцов мазков из носоглотки (не чаще двух раз в день).

[00338] Каждый субъект будет записывать реактогенность (локальные явления, системные явления и температуру) в дневник ежедневно в течение 14 дней после дозы COVI-VAC/плацебо.

[00339] Все нежелательные явления и сопутствующие лекарства будут регистрироваться с момента подписания формы информированного согласия (ICF) до 57-го дня. После этого до конца исследования (день 400) будут регистрироваться только МAAE, NCI, SAE, иммунодепрессанты, продукты крови и вакцины. Образцы для лабораторных тестов на безопасность (гематология, биохимия, коагуляция, анализ мочи) будут собираться перед дозой 1 и в дни 8, 36 и 57. Полное медицинское обследование будет проведено в день 2/1, а целевое и основанное на симптомах медицинское обследование будет выполнено перед введением дозы в день 1 и день 29; через 2 часа после каждой дозы; в дни 2/30, 4/32, 8/36 и 15/43 пребывания в карантинном отделении и при каждом амбулаторном посещении в период введения дозы. Пиковая скорость выдоха (PEF) и показатели жизнедеятельности (включая насыщение кислородом) будут измеряться до введения дозы в дни 1 и 29; через 2 часа после каждой дозы; в дни 2/30, 4/32, 8/36 и 15/43 пребывания в карантинном отделении; и при каждом амбулаторном посещении в период введения дозы. Электрокардиограмма (ЭКГ) будет выполняться перед дозой 1 и в дни 2, 8 и 57. Рентген грудной клетки будет выполнен через 14-22 дня после введения дозы 1 (между 15-м и 22-м днем).

[00340] Образец сыворотки будет взят у каждого субъекта для оценки титра IgG, измеренного с помощью ИФА, и уровня нейтрализующих антител, измеренного с помощью предварительной дозы микронеutralизации в дни 1 и 29, а также в дни 15, 43, 57, 120, 210 и 400. Образец цельной крови будет взят у каждого субъекта и обработан для выделения РВМС для оценки ответа Т-клеток с помощью IFN- γ ELISpot перед введением дозы в дни 1 и 29, а также в дни 8 и 36.

[00341] Образец мазка из носоглотки будет браться у каждого субъекта два раза в день (частота может быть уменьшена после дозы 2), когда он находится в карантинном отделении (за исключением только после введения дозы в день 1, до введения дозы только в день 29, если субъекты госпитализируются амбулаторно для получения дозы 2, и 1 образец только на 15/43 день) и при амбулаторных визитах, как определено после дозы 2, для измерения концентрации вакцинного вируса для оценки выделения с помощью анализа количественной ПЦР. После получения отрицательного результата для отдельного субъекта последующие образцы для этого субъекта не могут быть протестированы. Образцы с признаками выделения вируса вакцины будут сохранены для

возможного секвенирования вируса. Образец мазка из стула будет взят на 4-й или 5-й и 14-й или 15-й дни для определения титра вакцинного вируса.

[00342] Образец назального тампона будет взят у каждого субъекта для измерения IgA с помощью ИФА для оценки иммунного ответа слизистой оболочки до введения дозы в дни 1 и 29, а также в дни 15, 43 и 57.

[00343] Если у субъекта возникают острые симптомы, характерные для вирусной респираторной инфекции, образцы мазка из носоглотки будут взяты для проведения мультиплексной ПЦР респираторной панели (включая SARS-CoV-2).

[00344] Любой образец, положительный на SARS-CoV-2, будет сохранен для анализа, чтобы определить, является ли он SARS-CoV-2 дикого типа или вакцинным вирусом.

[00345] Каждый субъект будет участвовать в исследовании в течение примерно 13 месяцев, включая период скрининга. Окончание исследования определяется как дата последнего визита последнего субъекта, участвующего в исследовании. Ожидаемая продолжительность проведения исследования составляет примерно 17 месяцев, при условии, что для набора субъектов потребуется 4 месяца.

[00346] COVI-VAC вводят в виде капель в нос, до 2 доз с интервалом в 28 дней. Минимальная инфекционная доза для SARS-CoV-2 неизвестна, но модели на животных приводят к воспроизводимой инфекции при дозах от 10^4 до 10^6 БОЕ. Экстраполяция дозы COVI-VAC на основе веса, которая хорошо переносилась в модели сирийского хомячка, дает дозу приблизительно $3,5 \times 10^7$ БОЕ для человека массой 70 кг. Уровни доз, выбранные для этого исследования, вероятно, будут хорошо переносимыми и достаточными для оценки активности COVI-VAC.

Анализы

[00347] *Безопасность*: Количество (процент) субъектов с НЯ (включая МААЕ, NCI и SAE) с 1-го по 57-й день будет суммировано для каждого класса системы органов Медицинского словаря регуляторной деятельности (MedDRA) и предпочтительного термина, а также по группам. Количество (процент) субъектов с МААЕ, с NCI и с SAE с 1-го по 400-й день будет суммировано аналогичным образом. Также будет суммировано количество (процент) субъектов с НЯ по степени тяжести и по отношению к исследуемому лекарственному средству (ИМР). Будут предоставлены списки НЯ, МААЕ, NCI и SAE. Количество (процент) субъектов с локальными и системными явлениями реактогенности после каждой дозы будет суммировано по группам. События реактогенности также будут обобщены по тяжести.

[00348] Сводные статистические данные для непрерывных параметров (лабораторные тесты безопасности, PEF и показатели жизнедеятельности) будут представлены по группам следующим образом: оценка до введения дозы, оценка после введения дозы и переход от оценки до введения дозы к оценке после введения дозы. Количество и процент субъектов с лабораторными показателями безопасности после вакцинации или показателями жизненно важных функций, зарегистрированными как

новые отклонения от нормы (т. е. событие с повышением степени токсичности по сравнению с исходным значением и со степенью тяжести умеренной или более высокой) после вакцинации в исследовании будут сведены в таблицу. Будут подготовлены таблицы сдвига, в которых представлены лабораторные значения безопасности до и после введения дозы для каждого субъекта по степени тяжести.

[00349] Будут представлены сводки количества и процента субъектов с нормальными, аномальными, не клинически значимыми и аномальными, клинически значимыми интерпретациями физических осмотров, ЭКГ и рентгенографии грудной клетки.

[00350] *Иммуногенность*: Основными переменными, представляющими интерес для оценки гуморального иммунного ответа на COVI-VAC, являются титр IgG и уровень нейтрализующих антител. Следующие показатели и их 95% CI будут обобщены по группам:

Среднее геометрическое на исходном уровне и в дни 15, 29, 43, 57, 120, 210 и 400.

Доля ответивших на лечение в дни 15, 29, 43, 57, 120, 210 и 400

[00351] Данные о клеточном и слизистом иммунном ответе будут обобщены таким же образом в соответствующие моменты времени сбора образцов.

[00352] *Выделение*: Данные о выделении вакцинного вируса из образцов мазков из носоглотки и кала будут суммированы по подсчету и проценту положительных результатов по моменту времени вместе со средними значениями. Медианный, межквартильный диапазон, минимальная и максимальная продолжительность выделения вакцинного вируса будут представлены по группам для результатов мазка из носоглотки.

[00353] *Заболееваемость респираторным вирусом*: Будут перечислены результаты респираторной панели мультиплексной ПЦР (включая SARS-CoV-2) у субъектов с симптомами и сопутствующие симптомы.

Визит, предусмотренный исследованием	Период введения дозы											Период наблюдения			
	Доза 1 и доза 2 (в стационарных условиях ^a)						Доза 2 (в амбулаторных условиях ^a)								
	День от -2 до -1/ День 27-28	День 1/29	День 2/30	День 4/32	8/36 День 15/43	22/50	День 29 ^b	После введения дозы 2 ^a	День 36	День 43	День 50	57/ET ^c	День 120	День 210	День 400
Окно (дни)						± 1	± 3	± 1	±	±	±	± 3	±	±	±

											1	1	1		7	7	1	
		До	Пос ле							До	П ос ле							
Карантин в отделении клинических исследований																		
Выписка из отделения клинических исследований							X ^d			X								
Информированное согласие	X ^e																	
Демографические данные	X ^e																	
Медицинский анамнез	X ^e																	
Запись препаратов сопутствующей терапии (все)	X			X				X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Регистрация иммунодепрессант ов, продуктов крови и вакцин (только)																X	X	X
Оценка АЕ (все)	X			X				X	X	X	X	X	X	X	X			
Оценка ММАЕ/NCI/SAE (только)																X	X	X
Полный РЕ	X ^e																	
Целенаправленное и		X	X ^f	X	X	X	X	X	X	X ^f	X	X	X	X	X			

VAC/плацебо																		
Дневник: распределение (D)/обзор (R)			D	R	R	R	R					D	R	R	R			
<p>НЯ=нежелательное явление; ЭКГ=электрокардиограмма; ЕТ=досрочное прекращение; ВИЧ=вирус иммунодефицита человека; IgA=иммуноглобулин А; МААЕ=нежелательное явление, требующее медицинского вмешательства; NCI=впервые выявленное хроническое заболевание; РВМС=моноклеарные клетки периферической крови; ПЦР=полимеразная цепная реакция; РЕ=медицинское обследование; До=до введения дозы; после=после введения дозы; SAE=серьезное нежелательное явление; SRC=Комитет по рассмотрению вопросов безопасности.</p> <p>^a SRC рассмотрит обезличенные данные по безопасности (НЯ, реактогенность и лабораторные данные по безопасности) до 15-го дня и данные выделения мазка из носоглотки в течение по меньшей мере 8-го дня (обезличенные индивидуальные данные, день максимального выделения и диапазон продолжительности) для всех субъектов в каждой когорты, чтобы определить, будет ли когорта субъектов помещена в карантинное отделение на 14 дней после введения дозы 2 или будет выписана на 29-й день и впоследствии будет рассматриваться как амбулаторная. Если субъекты должны рассматриваться как амбулаторные пациенты, SRC также решит, используя эти данные, в течение каких 2 дней в первую неделю после дозы 2 субъекты вернутся в отделение для посещений.</p> <p>^b Визит на 29-й день может быть отложен на срок до 2 недель, чтобы избежать введения дозы в периоды больших праздников и оптимизировать расписание пациентов. Если это так, последующие посещения будут соответствующим образом сдвинуты, но сохранят исходную систему нумерации посещений.</p> <p>^c Если субъект преждевременно прекращает исследование до 57-го дня, то следует выполнить процедуры, перечисленные для 57-го дня/посещения ЕТ.</p> <p>^d За исключением случаев, когда у субъекта наблюдаются клинически значимые симптомы или признаки продолжающейся вирусной инфекции, или отделение карантина не было проинформировано лабораторным подразделением о том, что выделение субъектом вакцинного вируса находится на уровне с более чем низким риском передачи (на основании образца мазка из носоглотки в день 14/42). Любой субъект, чьи результаты анализа ПЦР показывают продолжающееся выделение вируса на уровне с более чем низким риском передачи, будет по-прежнему находиться в карантинном</p>																		

отделении до тех пор, пока результаты анализа кПЦР не будут соответствовать низкому риску передачи (образцы будут собираться два раза в день) и любые клинически значимые симптомы или признаки продолжающейся вирусной инфекции исчезли.

^e Процедуры скрининга - ТОЛЬКО при первом поступлении (от дня -2 до дня -1)

^f через 2 часа после введения дозы

^g ТОЛЬКО после дозы 1. Выполняется с 15-го по 22-й день включительно.

^h ТОЛЬКО день 2 и день 8

ⁱ Измеряется перед любым забором крови

^j Требуется для всех женщин, не подвергшихся хирургической стерилизации

^k Симптомы 3 степени в течение 14 дней после каждой дозы (с 1 по 15 и с 29 по 43 дни) и симптомы любой степени в другое время

^l До введения дозы ТОЛЬКО на 29-й день; если субъекты должны рассматриваться как стационарные пациенты для дозы 2, SRC также определит частоту сбора образцов носоглоточных мазков (не чаще двух раз в день).

^m День 4 или 5 ТОЛЬКО

ⁿ День 14 или 15 ТОЛЬКО

^o День 1 ТОЛЬКО

Оценки

безопасности

[00354] Оценка безопасности является основной целью данного исследования. Оценка безопасности является стандартной для ранних фаз клинических испытаний и соответствует руководству FDA по профилактическим клиническим испытаниям вакцин [FDA 2007]. Кроме того, из-за воспалительных последствий и гиперкоагуляции, наблюдаемых при инфекции дикого типа, лабораторные исследования безопасности также будут включать С-реактивный белок, IL-6 и TNF, d-димер и высокочувствительный тропонин-Т.

[00355] Оценки основных показателей жизнедеятельности будут включать пульсоксиметрию, а пиковый расход также будут регистрировать для оценки субклинических нарушений дыхания.

[00356] Кроме того, через 2-3 недели после приема первой дозы CodaVax-COVID/плацебо будет проведено рентгенологическое исследование грудной клетки для наблюдения за субъектами на наличие субклинического воспаления легких. Появляются данные о полезности визуализации органов грудной клетки для раннего выявления COVID-19. Рентгеновский скрининг грудной клетки у бессимптомных лиц и лиц с симптомами с низким клиническим подозрением на COVID-19 сразу после строгого местного карантина в Италии показал высокий уровень аномальных результатов. В недавнем метаанализе клинических исследований, оценивающих долю положительных

результатов визуализации грудной клетки у бессимптомных лиц с SARS-COV-2, авторы пришли к выводу, что бессимптомные случаи могут иметь положительные результаты визуализации грудной клетки и что тщательный клинический мониторинг бессимптомных лиц с рентгенологическими данными необходимо, потому что у значительного процента из них развиваются симптомы.

Иммуногенность

[00357] Связывающие и нейтрализующие сывороточные антитела являются наиболее часто оцениваемыми биомаркерами вакцин, но клеточный иммунитет и иммунитет слизистых оболочек могут играть равную или даже более важную роль в предотвращении инфекции и заболевания и в снижении риска продолжающейся передачи. В этом исследовании антитела, связывающие сыворотку, и нейтрализующие антитела будут измеряться как вторичные конечные результаты, а IgA- и Т-клеточный ответ слизистых оболочек, измеряемый с помощью IFN- γ ELISpot, как исследовательские конечные результаты.

Выделение

[00358] Результаты исследования на хомячках показывают, что носительство вакцинного вируса будет преходящим. Образцы мазка из носоглотки будут получены для количественной ПЦР, чтобы определить, как долго вектор сохраняется в месте введения. Данные, опубликованные на сегодняшний день, показывают, что выделение желудочно-кишечного тракта начинается позже и длится дольше, чем выделение из верхних дыхательных путей, хотя значение этого неясно. В этом исследовании будут взяты образцы ректального мазка для анализа бляшек для оценки выделения инфекционного вируса из желудочно-кишечного тракта.

Популяция субъектов

[00359] Для целей настоящего исследования критерии включения и критерии исключения установлены следующим образом. Фактические критерии для введения населению в целом могут отличаться. Эти критерии включения и исключения не следует интерпретировать как ограничивающие формулу изобретения, если только это специально не предусмотрено в формуле изобретения.

Критерии включения

[00360] В исследование могут быть включены субъекты, отвечающие всем следующим критериям:

1. Мужчины и женщины в возрасте от 18 до 30 лет включительно на день подписания ICF
2. В хорошем состоянии, без анамнеза или текущих данных о клинически значимых заболеваниях, особенно, но не ограничиваясь, гипертонией, диабетом, тромбозом, тромбоэмболическими нарушениями, ишемической болезнью сердца, хронической обструктивной болезнью легких и без клинически значимых отклонений от нормы, которые будут вмешиваться в безопасность субъекта, как определено историей болезни, физическим осмотром, жизненно важными показателями (включая насыщение

кислородом), ЭКГ, спирометрией и лабораторными тестами безопасности, как определено исследователем

3. Общая масса тела ≥ 50 кг и индекс массы тела (ИМТ) $\geq 18,0$ кг/м² и $\leq 28,0$ кг/м² (верхний предел ИМТ может быть увеличен до ≤ 30 кг/м² по усмотрению исследователя в случае здоровых мышц субъекта, для которого ИМТ может быть смещен вверх)

4. Отрицательный тест на наркотики, котинин и алкоголь (если это не объясняется назначенными лекарствами)

5. Отрицательный тест на беременность для женщин, которые не подвергались хирургической стерилизации

6. Отрицательный тест на COVID

7. Готовность соблюдать условия для снижения риска передачи вакцинного вируса (следующие условия являются минимальным стандартом, но могут быть увеличены, если органы общественного здравоохранения рекомендуют более высокий стандарт для снижения риска передачи SARS-CoV-2):

Гигиенические меры, направленные на предотвращение межличностной передачи исследуемого препарата, включая, помимо прочего, частое мытье рук с мылом или дезинфицирующим средством для рук, респираторную гигиену и соблюдение правил поведения при кашле в течение по меньшей мере 14 дней после каждой дозы IMP

Ношение хирургической маски в общественных местах или при контакте с другими людьми в течение по меньшей мере 14 дней после каждой дозы IMP

Запечатывание всех тканей и материалов, используемых для сбора респираторных выделений, в первичный контейнер и размещение во вторичном контейнере, недоступном для детей или животных, в течение по меньшей мере 14 дней после каждой дозы IMP

Не допускать тесных контактов с уязвимыми лицами в течение по меньшей мере 14 дней после каждой дозы IMP. К уязвимым лицам относятся, помимо прочего, следующие лица:

Лица ≥ 65 лет

Дети ≤ 1 года

Постояльцы и работники домов престарелых

Лица любого возраста со значительными хроническими заболеваниями, такими как:

Хроническое заболевание легких (например, тяжелая астма, хроническая обструктивная болезнь легких)

Хронические сердечно-сосудистые заболевания (например, кардиомиопатия, застойная сердечная недостаточность, кардиохирургия, ишемическая болезнь сердца, известные анатомические дефекты)

Патологическое ожирение

Инсулинозависимый или сахарный диабет 2 типа

Медицинское наблюдение или госпитализация в течение последних 5 лет из-за хронического нарушения обмена веществ (например, почечная дисфункция,

гемоглобинопатии)

Иммуносупрессия

Рак

Неврологические заболевания и нарушения развития нервной системы (например, церебральный паралич, эпилепсия, инсульт, судороги)

Женщины, которые беременны или пытаются забеременеть

Любое другое лицо, определенное как уязвимое во время пандемии COVID-19.

8. Субъекты женского пола детородного возраста должны использовать одну из форм высокоэффективной контрацепции. Использование контрацепции должно продолжаться не менее 90 дней после последней дозы ИМР. Высокоэффективная контрацепция описана ниже:

Установленное использование гормональных методов контрацепции, описанных ниже (в течение ≥ 14 дней до дня 1). При использовании гормональных методов контрацепции партнеры-мужчины должны использовать презерватив со спермицидом:

Комбинированные (содержащие эстрогены и прогестагены) гормональные контрацептивы, связанные с угнетением овуляции:

Перорально

Вагинально

Трансдермально

Гормональная контрацепция, содержащая только прогестаген, связанная с подавлением овуляции:

Перорально

Путем инъекции

Путем имплантации

Внутриматочное устройство

Внутриматочная гормон-высвобождающая система

Двусторонняя перевязка маточных труб

Мужская стерилизация (с соответствующей документацией об отсутствии сперматозоидов в эякуляте после вазэктомии), когда мужчина, подвергшийся вазэктомии, является единственным партнером этой женщины.

Истинное воздержание - половое воздержание считается высокоэффективным методом только в том случае, если оно определяется как воздержание от гетеросексуальных контактов в течение всего периода риска, связанного с изучаемым лечением. Надежность сексуального воздержания необходимо оценивать в зависимости от продолжительности клинического исследования и предпочтительного и обычного образа жизни субъекта.

9. Субъекты мужского пола должны согласиться с приведенными ниже требованиями к контрацепции, продолжая их использование в течение по меньшей мере 90 дней после последней дозы ИМР:

Использование презерватива со спермицидом для предотвращения беременности у

партнерши или для предотвращения воздействия IMP на любого партнера (мужчину и женщину).

Мужская стерилизация с соответствующим документальным подтверждением отсутствия сперматозоидов в эякуляте после вазэктомии (обратите внимание, что использование презерватива со спермицидом по-прежнему необходимо для предотвращения контакта с партнером). Это относится только к мужчинам, участвующим в исследовании.

Кроме того, для женщин-партнеров детородного возраста этот партнер должен использовать другую форму контрацепции, такую как один из высокоэффективных методов, упомянутых выше для женщин-субъектов.

Истинное воздержание - половое воздержание считается высокоэффективным методом только в том случае, если оно определяется как воздержание от гетеросексуальных контактов в течение всего периода риска, связанного с изучаемым лечением. Надежность сексуального воздержания необходимо оценивать в зависимости от продолжительности клинического исследования и предпочтительного и обычного образа жизни субъекта.

10. В дополнение к вышеуказанным требованиям к контрацепции, субъекты мужского пола должны согласиться не сдавать сперму в течение как минимум 90 дней после последней дозы IMP.

11. Готовность участвовать и соблюдать все аспекты исследования в течение всего периода исследования, включая все посещения исследовательского подразделения

12. Предоставление письменного информированного согласия

Критерии невключения

[00361] Субъекты, которые соответствуют любому из следующих критериев, будут исключены из исследования:

1. Гемоглобин A1c $\geq 6,0\%$ или 42 ммоль/моль
2. Объем форсированного выдоха за 1 секунду (FEV₁) <80% от прогнозируемого значения
3. Признаки или симптомы, указывающие на инфекцию верхних или нижних дыхательных путей (включая лихорадку или постоянный кашель) в течение 28 дней после 1-го дня
4. Беременные, возможно беременные или кормящие женщины
5. Женщины, которые были беременны в течение третьего триместра или рожали в течение последних 6 месяцев.
6. Планирование беременности (субъект или партнер) в течение 90 дней после последней дозы IMP
7. Ненадлежащий венозный доступ для повторной флеботомии
8. Подтвержденная или подозреваемая инфекция SARS-CoV-2 в анамнезе
9. Контакт с любым человеком, у которого впоследствии было подтверждено наличие SARS-CoV-2, в течение 14 дней после контакта.

10. Свистящее дыхание в анамнезе лечили ингалятором(-ами)
11. Респираторные симптомы, включая хрипы, которые когда-либо приводили к госпитализации
12. Известная бронхиальная гиперреактивность к вирусам
13. Любая значительная аномалия, существенно изменяющая анатомию носа или носоглотки, которая может помешать достижению целей исследования, и, в частности, любая из назальных оценок или вирусной инфекции (могут быть включены носовые полипы в анамнезе, но большие носовые полипы, вызывающие исключение текущих и выраженных симптомов и/или требующие регулярного лечения в течение последнего месяца)
14. Любые клинически значимые носовые кровотечения в анамнезе (большие носовые кровотечения) в течение последних 3 месяцев до 1-го дня или госпитализации в анамнезе из-за носовых кровотечений в любом предыдущем случае.
15. Любая операция на носу или околоносовых пазухах в течение 3 месяцев до 1-го дня
16. Назальная хирургия или прижигание носа в анамнезе
17. Аутоиммунные или демиелинизирующие заболевания в анамнезе
18. Паралич Белла в анамнезе
19. Психоз в анамнезе, госпитализация по поводу психического заболевания, клинически значимая депрессия или попытка самоубийства за последние 10 лет
20. Судороги в анамнезе (кроме детских фебрильных судорог), деменция или прогрессирующее неврологическое заболевание
21. Постинфекционные или поствакцинальные неврологические осложнения в анамнезе, включая синдром Гийена-Барре.
22. Тяжелая реакция на иммунизацию в анамнезе
23. Анафилаксия в анамнезе или тяжелая аллергическая реакция в анамнезе или выраженная непереносимость какого-либо продукта питания или лекарства по оценке исследователя.
24. Известное или подозреваемое злокачественное новообразование, за исключением немеланомного рака кожи и других хирургически удаленных злокачественных новообразований ранней стадии, рецидив которых, по мнению исследователя, крайне маловероятен.
25. Иммунодефицит, включая использование кортикостероидов (включая интраназальные стероиды), алкилирующие препараты, антимаболиты, облучение, иммуномодулирующие биологические препараты или другие иммуномодулирующие методы лечения в течение 90 дней до 1-го дня или запланированное использование любого из них во время исследования (допускается использование местных стероидных кремов на коже от легкой до умеренной эффективности)
26. Любое другое хроническое заболевание, которое не является стабильным или требует замены лекарств в течение 30 дней до 1-го дня.

27. Получение любой лицензированной или исследуемой коронавирусной вакцины или прививки от SARS-CoV-2
28. Получение ≥ 3 IMP в течение 12 месяцев до дня 1
29. Участие в исследовании вирусной нагрузки с респираторным вирусом в течение 90 дней или 5 периодов полураспада (в зависимости от того, что дольше) до 1-го дня.
30. Получение IMP в течение 90 дней или 5 периодов полувыведения (в зависимости от того, что больше) до 1-го дня.
31. Получение переливания крови или продуктов крови в течение 90 дней до 1-го дня или запланированное использование во время исследования.
32. Получение интраназальной вакцины в течение 90 дней до 1-го дня
33. Получение любой вакцины, кожного теста на туберкулез или прививки антигена аллергии в течение 30 дней до 1-го дня или запланированное получение до 57-го дня.
34. Прием интраназальных стероидов в течение 30 дней до 1-го дня или любых других интраназальных препаратов (включая лекарства, отпускаемые без рецепта, но исключая физиологический раствор) в течение 7 дней до 1-го дня.
35. Текущее использование любых лекарств для профилактики или лечения COVID-19
36. Запланированная госпитализация или хирургическое вмешательство до 57-го дня
37. Регулярное или текущее употребление интраназальных запрещенных наркотиков
38. Анамнез или наличие алкогольной зависимости или чрезмерное употребление алкоголя (еженедельное потребление > 28 единиц алкоголя; 1 единица - полстакана пива, небольшой бокал вина или мера крепкого алкоголя)
39. Чрезмерное потребление веществ, содержащих ксантин (например, ежедневное потребление > 5 чашек напитков с кофеином, например, кофе, чая, колы).
40. Нынешние курительщики любого типа (например, сигареты, электронные сигареты, марихуана)
41. Курение в анамнезе ≥ 5 пачек/лет или любое курение за последние 30 дней до 1-го дня.
42. Интенсивные физические упражнения в течение 48 часов до госпитализации в день 2 или день 1
43. Сдача крови ≥ 470 мл в течение 90 дней до дня 1
44. Клинически значимая аномалия ЭКГ, определенная исследователем
45. Положительный результат на ВИЧ, вирус гепатита В или вирус гепатита С или активную инфекцию вируса гепатита А
46. Любое медицинское, психиатрическое или социальное состояние или профессиональная или иная ответственность, которые, по мнению исследователя, могут

помешать или служить противопоказанием для соблюдения протокола, оценки безопасности (включая реактогенность) или способности субъекта дать информированное согласие.

47. Любая причина, которая, по мнению исследователя, вызывает опасения, что субъект не сможет справиться с карантинными требованиями

48. Сотрудник или ближайший родственник сотрудника Codagenix, поставщиков или исследовательских центров, связанных с исследованием.

[00362] Субъекты, которые не соответствуют критериям включения и исключения, могут быть повторно обследованы по усмотрению исследователя после консультации со спонсором и могут участвовать в исследовании, если они будут соответствовать критериям включения и исключения позднее.

Критерии временной задержки

[00363] Введение COVI-VAC/плацебо будет отложено для любого субъекта, который соответствует любому из следующих критериев:

1. Эпистаксис (носовое кровотечение) в течение последних 3 дней
2. Симптомы инфекции верхних дыхательных путей или лихорадка (субъективная или объективная) или недомогание в течение последних 3 дней

[00364] Любые признаки симптомов, которые могут препятствовать правильному введению IMP или интерпретации данных дневника (например, температура $\geq 38^{\circ}\text{C}$, заложенность носа, ринорея)

[00365] Различные варианты осуществления изобретения описаны выше в подробном описании. Хотя в этих описаниях непосредственно описываются приведенные выше варианты осуществления, следует понимать, что специалисты в данной области техники могут представить модификации и/или варианты конкретных вариантов осуществления, показанных и описанных в данном документе. Любые такие модификации или вариации, попадающие в сферу охвата настоящего описания, также должны быть включены в него. Если специально не указано иное, намерением изобретателей является придание словам и фразам в описании и формуле изобретения обычных и общепринятых значений для специалистов в соответствующей области техники.

[00366] Приведенное выше описание различных вариантов осуществления изобретения, известных заявителю на момент подачи заявки, было представлено и предназначено для целей иллюстрации и описания. Настоящее описание не претендует на то, чтобы быть исчерпывающим и не ограничивает изобретение точной раскрытой формой, и в свете вышеприведенных идей возможны многие модификации и вариации. Описанные варианты осуществления служат для объяснения принципов изобретения и его практического применения, а также для того, чтобы позволить другим специалистам в данной области техники использовать изобретение в различных вариантах осуществления и с различными модификациями, подходящими для конкретного предполагаемого использования. Следовательно, предполагается, что изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, раскрытыми для осуществления изобретения.

[00367] Несмотря на то, что были показаны и описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что, основываясь на приведенных в данном документе идеях, могут быть сделаны изменения и модификации, не отступая от этого изобретения и его более широких аспектов и, следовательно, прилагаемая формула изобретения должна охватывать все такие изменения и модификации, которые находятся в пределах истинной сущности и объема настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что термины, используемые в данном документе, как правило, подразумеваются как «открытые» термины (*например*, термин «включая» следует интерпретировать как «включая, но не ограничиваясь этим», термин «имеющий» следует толковать как «имеющий по меньшей мере», термин «включает» следует толковать как «включает, но не ограничивается» и т. д.).

[00368] Используемый в данном документе термин «содержащий» или «содержит» используется в отношении композиций, способов и их соответствующего компонента(-ов), которые применимы для варианта осуществления, но открыты для включения неуказанных элементов, независимо от того, являются ли они полезными или нет. Специалистам в данной области техники будет понятно, что термины, используемые в данном документе, как правило, подразумеваются как «открытые» термины (*например*, термин «включая» следует интерпретировать как «включая, но не ограничиваясь этим», термин «имеющий» следует толковать как «имеющий по меньшей мере», термин «включает» следует толковать как «включает, но не ограничивается» и т. д.). Хотя открытый термин «содержащий» как синоним таких терминов, как «включающий», «содержащий» или «имеющий», используется в данном документе для описания и утверждения изобретения, настоящее изобретение или его варианты осуществления могут быть описаны с использованием альтернативных терминов, таких как «состоящий из» или «состоящий в основном из».

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, кодирующий один или несколько вирусных белков или один или несколько их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2:

при этом полинуклеотид перекодирован по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2, и

при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемая полинуклеотидом, остается неизменной, или

при этом аминокислотная последовательность одного или нескольких вирусных белков или одного или нескольких их фрагментов исходного коронавируса SARS-CoV-2, кодируемая полинуклеотидом, включает до 20 аминокислотных замен, добавлений или делеций.

2. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой SARS-CoV-2 дикого типа.

3. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой природный изолят SARS-CoV-2.

4. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вашингтонский изолят коронавируса SARS-CoV-2, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты с регистрационным номером GenBank MN985325.1.

5. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой изолят коронавируса SARS-CoV-2 BetaCoV/Wuhan/IVDC-HB-01/2019 (SEQ ID NO:1).

6. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вариант SARS-CoV-2.

7. Полинуклеотид по п. 1, отличающийся тем, что исходный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой вариант SARS-CoV-2, выбранный из группы, состоящей из британского варианта, южноафриканского варианта и бразильского варианта.

8. Полинуклеотид по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид перекодирован путем уменьшения отклонения в частоте использования кодонов (СРВ) или уменьшения предпочтения кодонов по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

9. Полинуклеотид по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид перекодирован путем увеличения количества динуклеотидов CpG или UpA по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

10. Полинуклеотид по любому из вышеуказанных пунктов, отличающийся тем, что каждый из одного или нескольких перекодированных вирусных белков или каждый из одного или нескольких его перекодированных фрагментов имеет отклонение в частоте использования кодонов менее -0,05, менее -0,1, менее -0,2, менее -0,3 или менее -0,4.

11. Полинуклеотид по любому из вышеуказанных пунктов, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид является деоптимизированным по СРВ по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

12. Полинуклеотид по любому из вышеуказанных пунктов, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид является деоптимизированным по кодонам по сравнению с полинуклеотидом исходного коронавируса SARS-CoV-2.

13. Полинуклеотид по любому из пп. 11-12, где деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ у людей.

14. Полинуклеотид по любому из пп. 11-12, при этом деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе.

15. Полинуклеотид по любому из пп. 11-12, при этом деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2.

16. Полинуклеотид по любому из пп. 11-12, при этом деоптимизированный по кодонам или деоптимизированный по СРВ основан на часто используемых кодонах или СРВ в коронавирусе SARS-CoV-2 дикого типа.

17. Полинуклеотид по любому из вышеуказанных пунктов, содержащий перекодированную нуклеотидную последовательность, выбранную из РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRP - англ.: RNA-dependent RNA polymerase), фрагмента RdRP, шиповидного белка, фрагмента шиповидного белка и их комбинаций.

18. Полинуклеотид по любому из вышеуказанных пунктов, содержащий по меньшей мере одну деоптимизированную по СРВ область, выбранную из 11294-12709 п.н., 14641-15903 п.н., 21656-22306 п.н., 22505-23905 п.н. и 24110-25381 п.н. SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

19. Полинуклеотид по любому из вышеуказанных пунктов, содержащий перекодированный шиповидный белок или фрагмент шиповидного белка, в котором удален сайт расщепления фурином.

20. Полинуклеотид по п. 1, имеющий SEQ ID NO:4, нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:7.

21. Полинуклеотид по п. 20, дополнительно содержащий один или несколько последовательных аденинов на 3'-конце.

22. Полинуклеотид по п. 1, имеющий SEQ ID NO: 3.

23. Бактериальная искусственная хромосома (BAC - англ.: bacterial artificial chromosome), содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-22.

24. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 1-22.

25. Клетка, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-22, BAC по п. 23 или вектор по п. 24.

26. Клетка по п. 25, отличающаяся тем, что клетка представляет собой клетку Vero или клетку почки детеныша хомячка (ВНК- англ.: baby hamster kidney).

27. Полипептид, кодируемый полинуклеотидом по любому из пп. 1-22.

28. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 1-22.

29. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2, содержащий полипептид, кодируемый полинуклеотидом по любому из пп. 1-22.

30. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по п. 28 или п. 29, при этом экспрессия одного или нескольких его вирусных белков снижена по сравнению с исходным коронавирусом SARS-CoV-2.

31. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по любому из пп. 28-30, при этом снижение экспрессии одного или нескольких его вирусных белков снижается в результате перекодирования области, выбранной из RdRP, шиповидного белка и их комбинаций.

32. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2, содержащий полинуклеотид, имеющий SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и один или более последовательных аденинов на 3'-конце.

33. Модифицированный коронавирус SARS-CoV-2, содержащий полипептид, кодируемый полинуклеотидом, имеющим SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4, или нуклеотиды 1-29834 SEQ ID NO:4 и один или более последовательных аденинов на 3'-конце.

34. Композиция вакцины для индуцирования защитного иммунного ответа у субъекта, содержащая:

модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по любому из пп. 28-33.

35. Композиция вакцины по п. 34, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество,

36. Иммунная композиция для вызова иммунного ответа у субъекта, содержащая:

модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 по любому из пп. 28-33.

37. Иммунная композиция по п. 36, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

38. Способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий:

введение субъекту дозы:

модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по любому из пп. 28-33, или

композиции вакцины по п. 34 или п. 35, или

иммунной композиции по п. 36 или п. 37.

39. Способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий:

введение субъекту примирующей дозы модифицированного коронавируса SARS-CoV-2 по любому из пп. 28-33, или композиции вакцины по п. 34 или п. 35, или иммунной композиции по п. 36 или п. 37; и

введение субъекту одной или нескольких бустерных доз модифицированного

коронавируса SARS-CoV-2 по любому из пп. 28-33, или композиции вакцины по п. 34 или п. 35, или иммунной композиции по п. 36 или п. 37.

40. Способ по любому из пп. 38-39, при этом иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

41. Способ по любому из пп. 38-40, при этом доза представляет собой профилактически эффективную или терапевтически эффективную дозу.

42. Способ по любому из пп. 38-41, при этом введение осуществляют интраназальным путем.

43. Способ по любому из пп. 38-41, при этом введение осуществляют посредством назальных капель.

44. Способ по любому из пп. 38-41, при этом введение осуществляют посредством назального спрея.

45. Способ по любому из пп. 38-45, где доза составляет около 10^4 - 10^6 БОЕ, или примиряющая доза составляет около 10^4 - 10^6 БОЕ, и одна или несколько бустерных доз составляют 10^4 - 10^6 БОЕ.

46. Способ получения модифицированного коронавируса SARS-CoV-2, включающий:

получение нуклеотидной последовательности, кодирующей один или несколько белков исходного коронавируса SARS-CoV-2 или один или несколько его фрагментов;

перекодирование нуклеотидной последовательности для уменьшения экспрессии одного или нескольких белков или одного или нескольких их фрагментов; и

замену нуклеиновой кислоты, имеющей перекодированную нуклеотидную последовательность, в геноме исходного коронавируса SARS-CoV-2 для создания модифицированного генома коронавируса SARS-CoV-2,

при этом экспрессия перекодированной нуклеотидной последовательности снижена по сравнению с исходным вирусом.

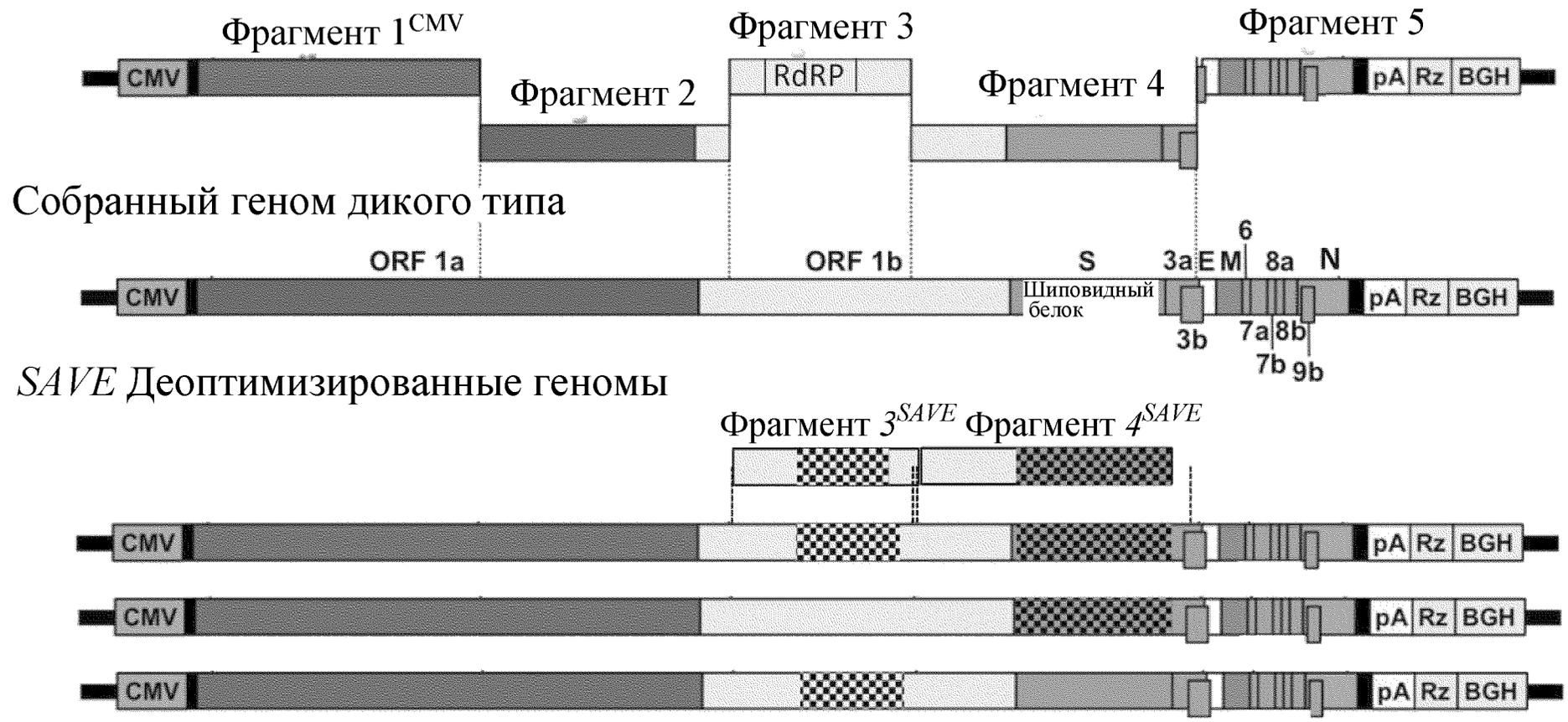
47. Способ по п. 46, при этом последовательность исходного коронавируса SARS-CoV-2 представляет собой вирусную нуклеиновую кислоту дикого типа (wt - англ.: wild-type).

48. Способ по п. 46, в котором модифицированный коронавирус SARS-CoV-2 представляет собой любой из заявленных в пунктах формулы изобретения 28-33.

По доверенности

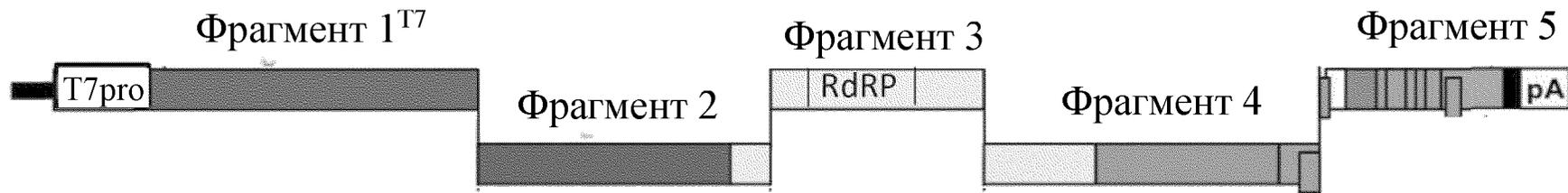
Синтетические фрагменты генома

ФИГ. 1.

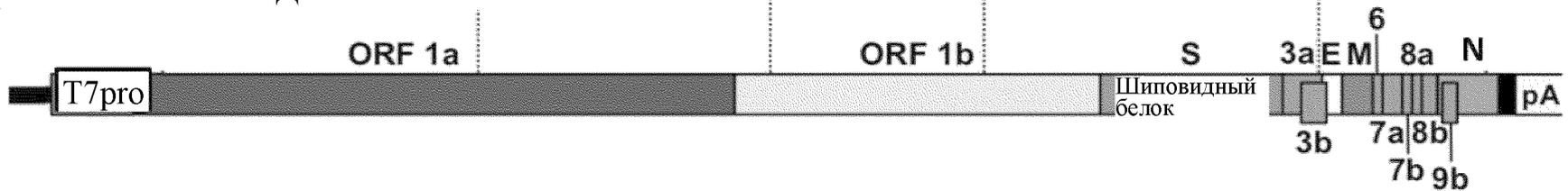


ФИГ. 2

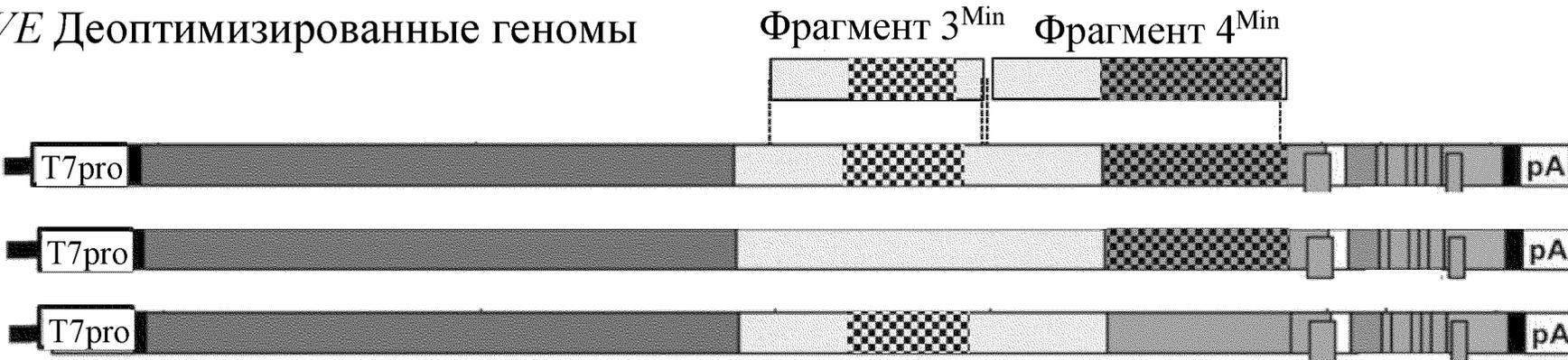
Синтетические фрагменты генома



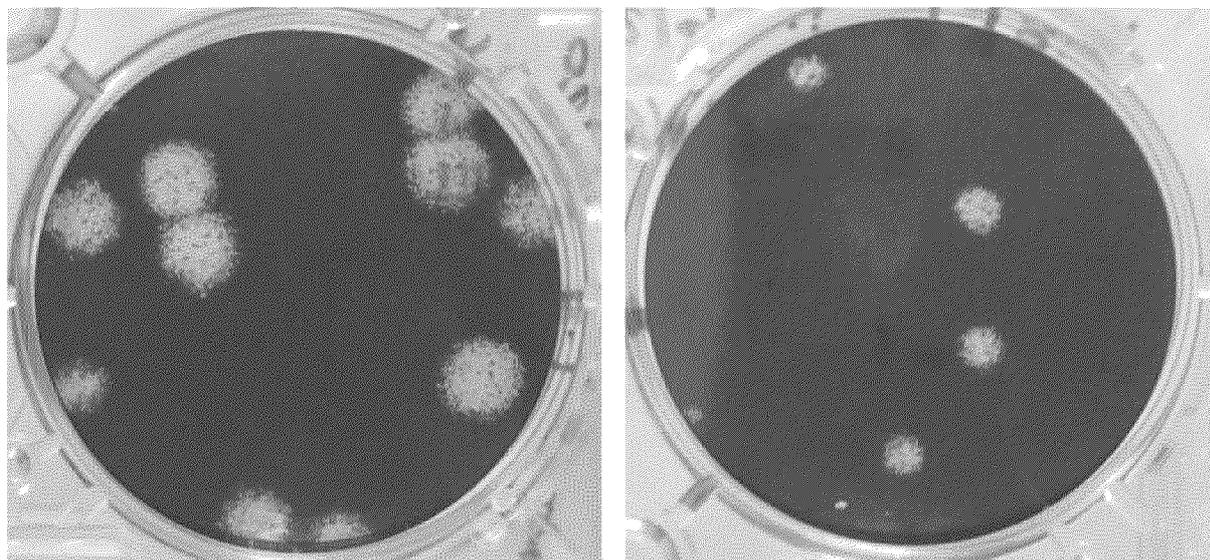
Собранный геном дикого типа



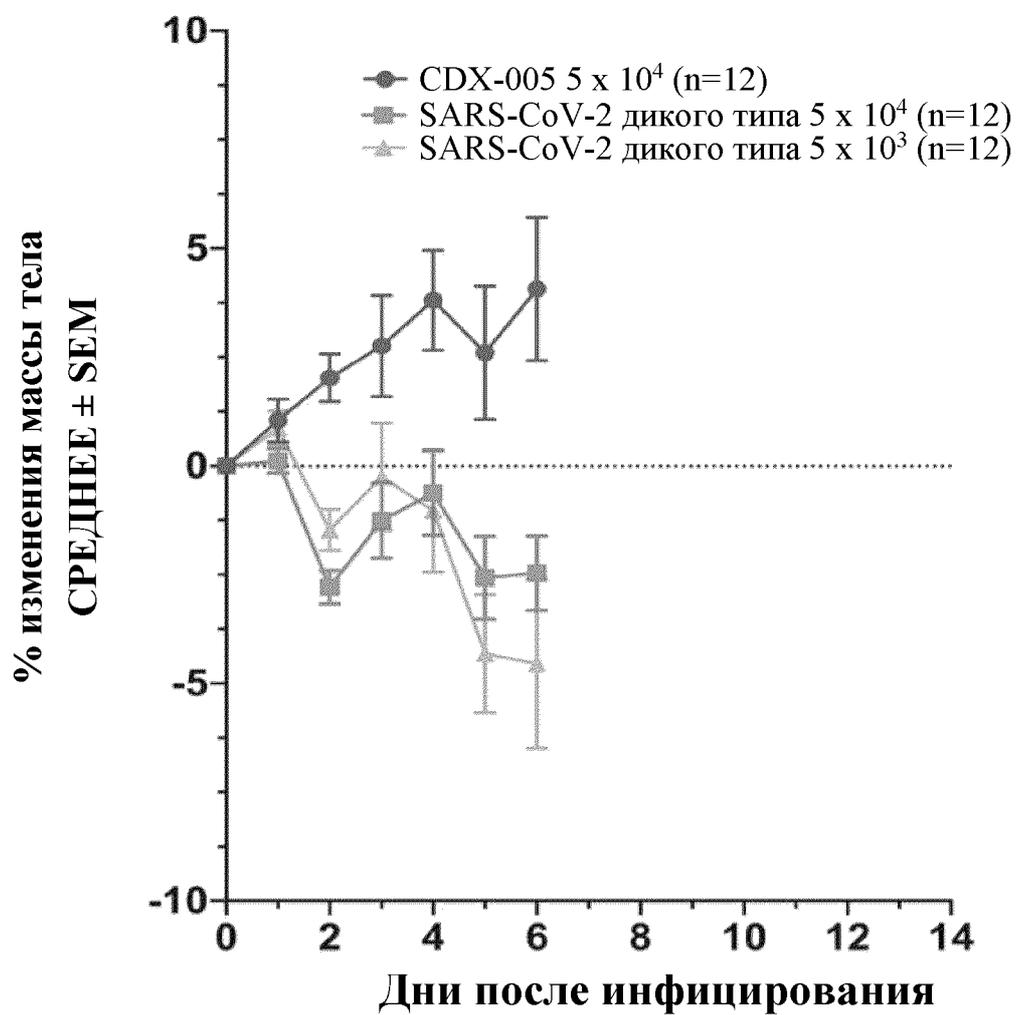
SAVE Деоптимизированные геномы



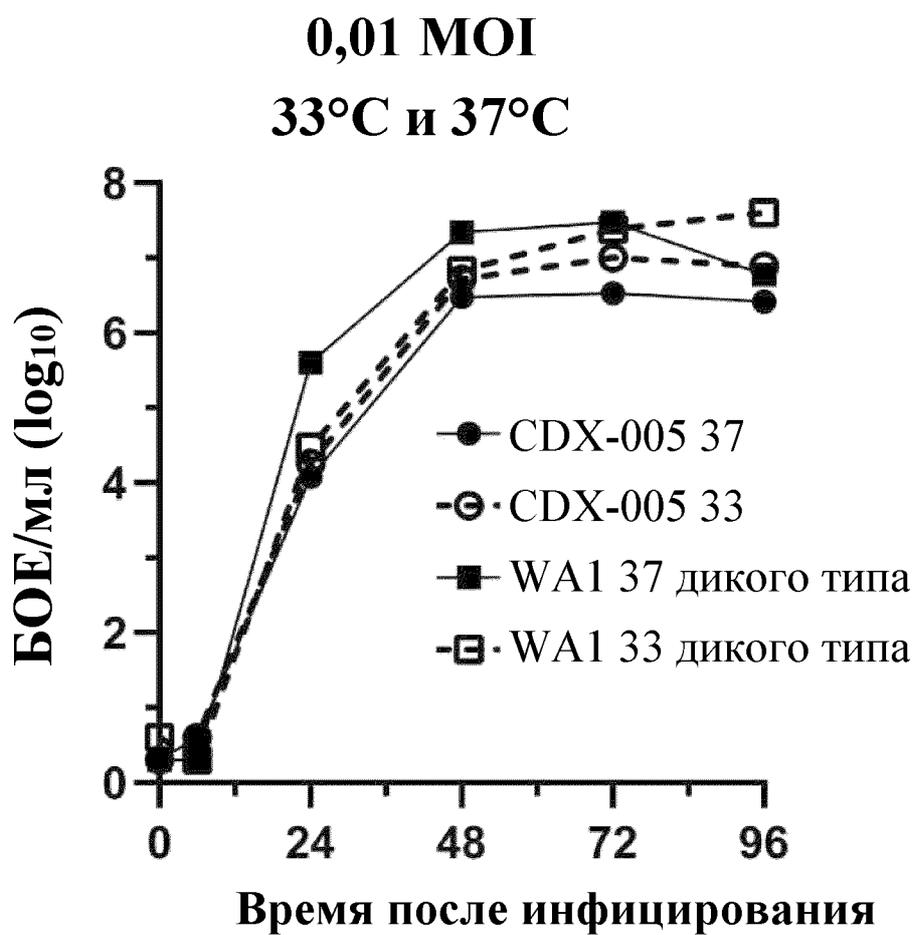
ФИГ. 3



ФИГ. 4

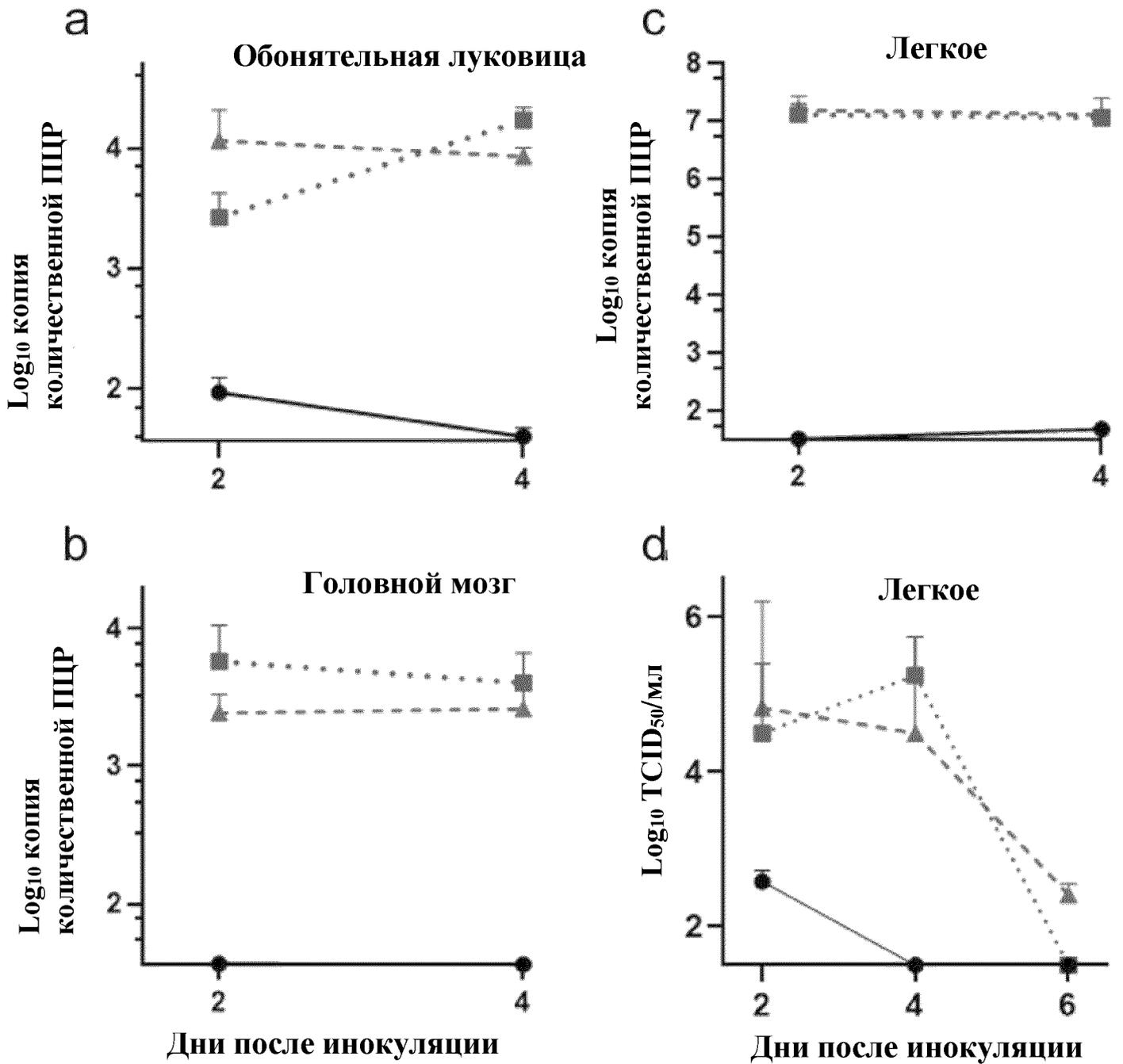


ФИГ. 5

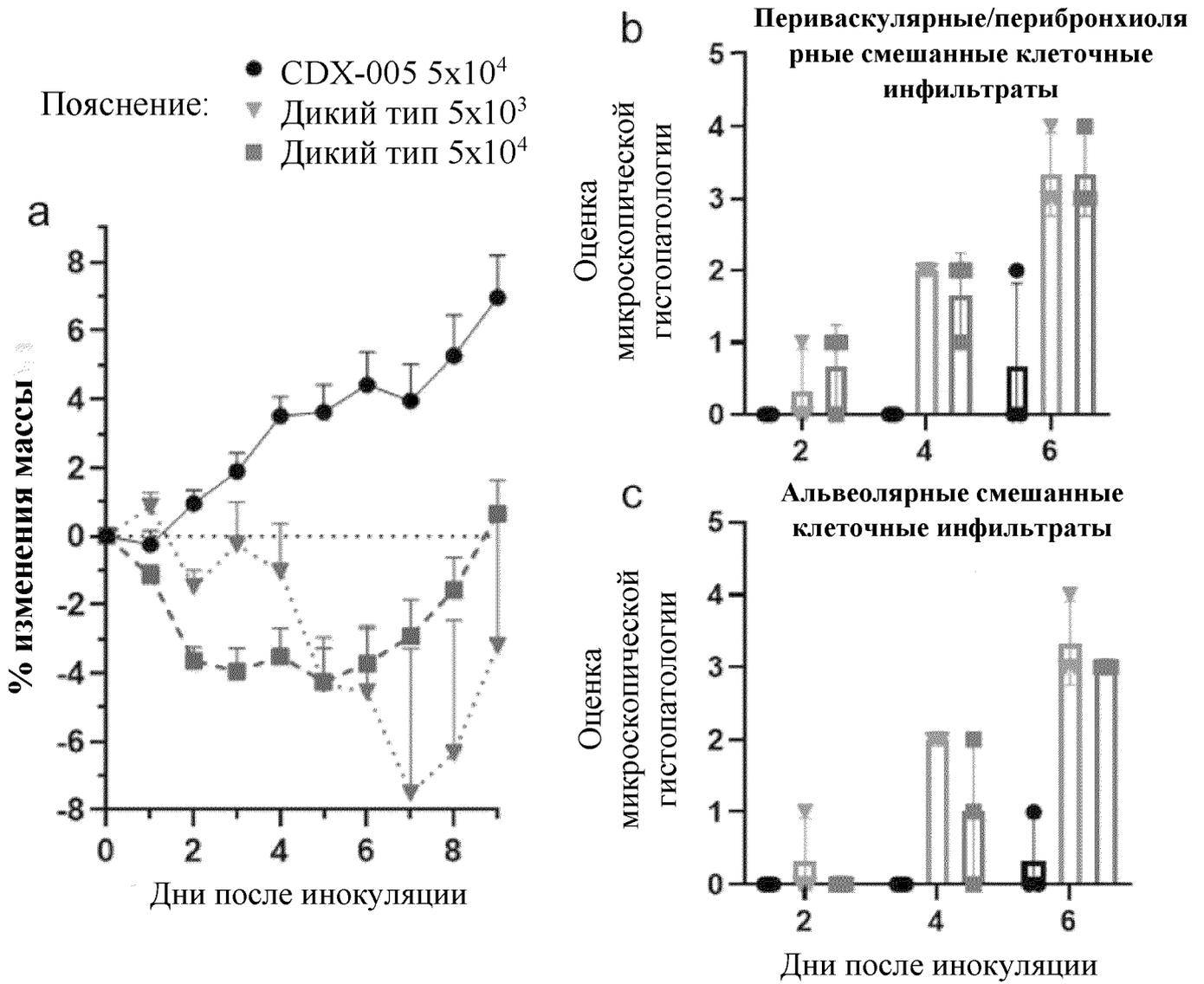


ФИГ. 6a-6d

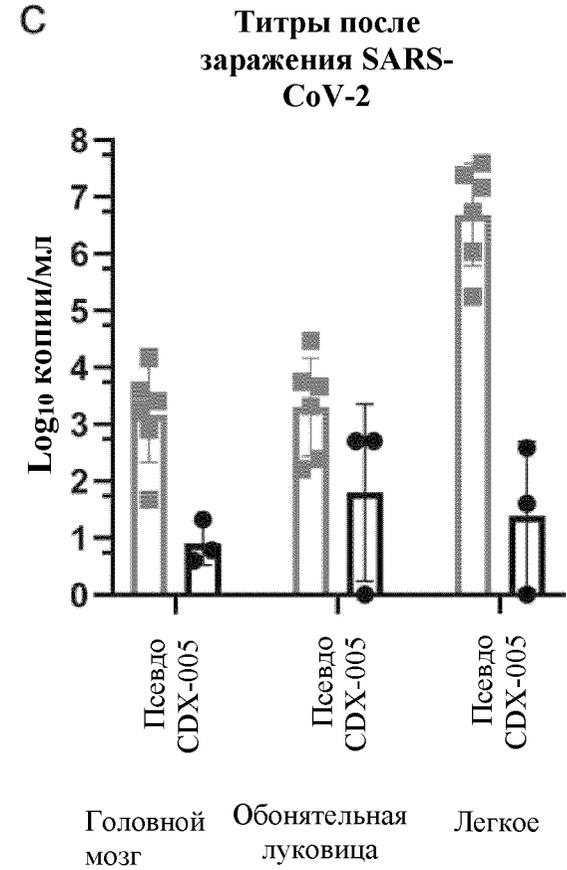
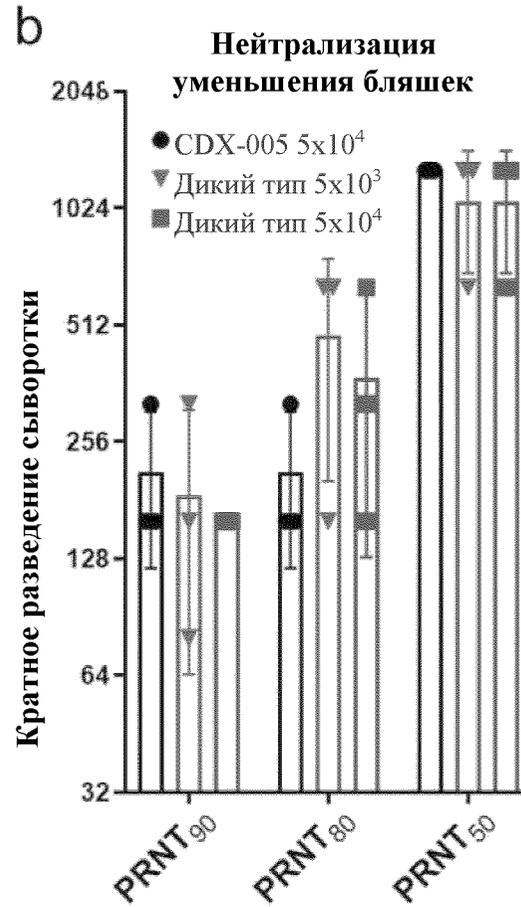
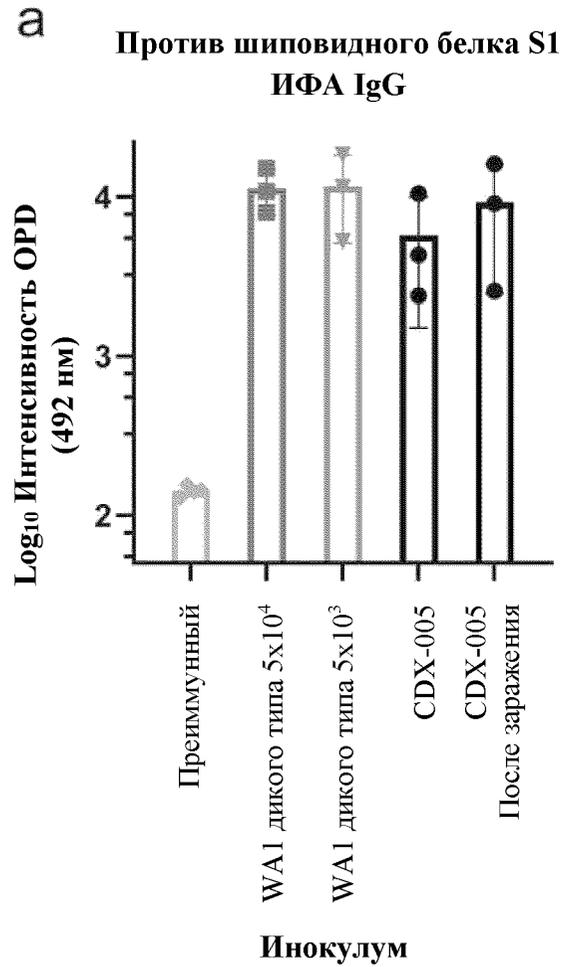
● CDX-005 5×10^4 ■ Дикий тип 5×10^4 ▲ Дикий тип 5×10^3



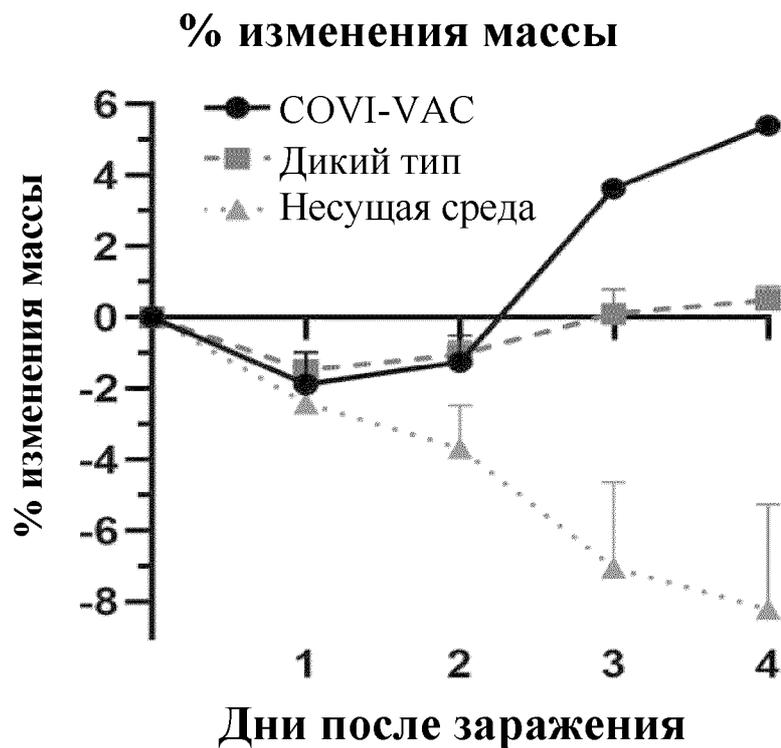
ФИГ. 7a-7c



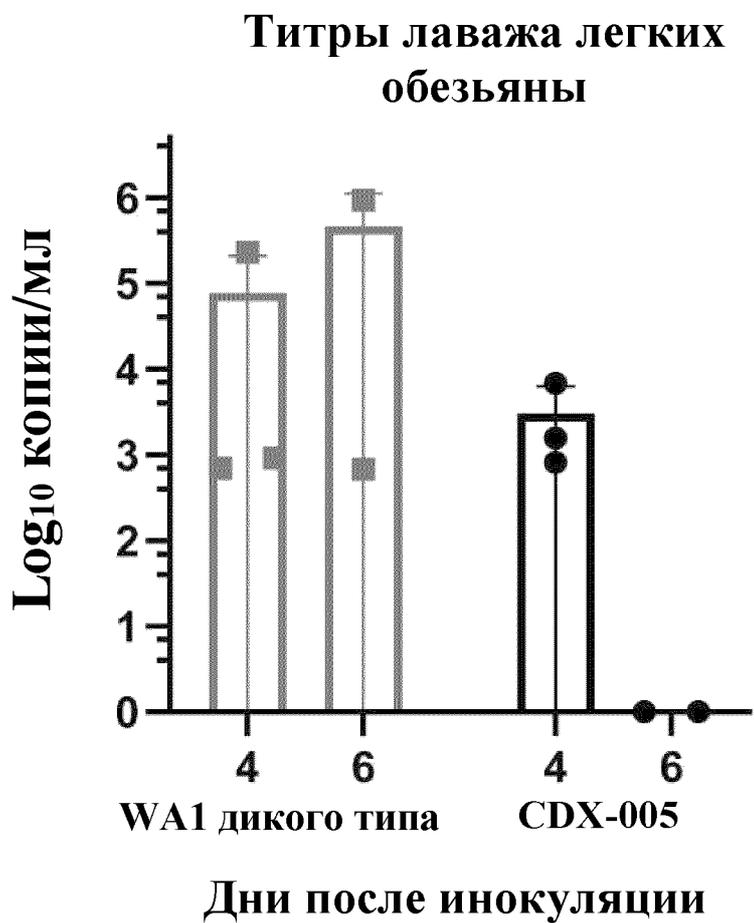
ФИГ. 8а-8с



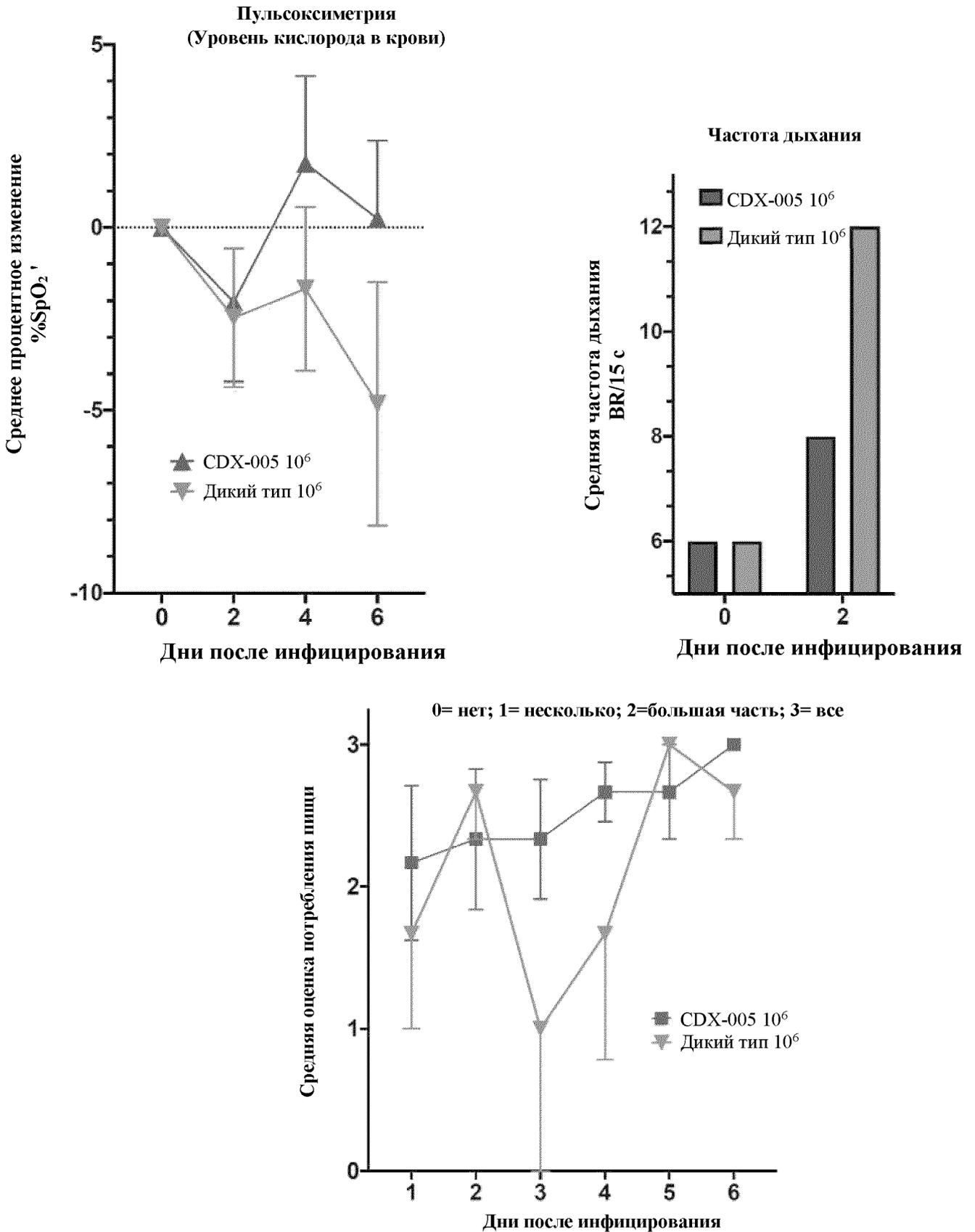
ФИГ. 8d



ФИГ. 9



ФИГ. 10



ФИГ. 11

