

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042634**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.07

(21) Номер заявки
202290517

(22) Дата подачи заявки
2021.04.30

(51) Int. Cl. **C12N 15/50** (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)

(54) СРЕДСТВО ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА SARS-CoV-2 В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ФОРМЕ (ВАРИАНТЫ)

(31) **2021103101**

(32) **2021.02.10**

(33) **RU**

(43) **2022.09.15**

(86) **PCT/RU2021/000182**

(87) **WO 2022/086364 2022.04.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ
ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.
ГАМАЛЕИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

**Должикова Инна Вадимовна,
Попова Ольга, Щебляков Дмитрий
Викторович, Гроусова Дарья
Михайловна, Джаруллаева Алина
Шахмировна, Тухватулин Амир
Ильдарович, Тухватулина Наталья
Михайловна, Щербинин Дмитрий
Николаевич, Есмагамбетов Ильяс
Булатович, Токарская Елизавета
Александровна, Ботиков Андрей
Геннадьевич, Ерохова Алина
Сергеевна, Ижаева Фатима
Магомедовна, Никитенко Наталья
Анатольевна, Лубенец Надежда
Леонидовна, Семихин Александр
Сергеевич, Борисевич Сергей
Владимирович, Народицкий Борис
Савельевич, Логунов Денис Юрьевич,
Гинцбург Александр Леонидович (RU)**

(72) Изобретатель:
**Зубкова Ольга Вадимовна,
Ожаровская Татьяна Андреевна,**

(56) **WO-A1-2020243719
CN-B-111217917**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. В изобретении описано средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3. Также представлен вариант средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащего в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3. Кроме того, описан вариант средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащего в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3. При этом в частном случае его выполнения буферный раствор средства для восстановленной лиофилизированной формы содержит, мас. %: трис от 0,0180 до 0,0338; хлорид натрия от 0,1044 до 0,1957; сахара от 5,4688 до 10,2539; магния хлорида гексагидрат от 0,0015 до 0,0028; ЭДТА от 0,0003 до 0,0005; полисорбат-80 от 0,0037 до 0,0070; вода - остальное. При этом средство предназначено для применения

B1**042634****042634****B1**

интраназально или внутримышечно. Также средство может быть введено совместно и одновременно интраназально и внутримышечно. Изобретение обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у широких слоев населения.

042634 B1

042634 B1

Область техники

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

Уровень техники

В конце 2019 г. в Китайской Народной Республике (КНР) произошла вспышка новой инфекции с эпицентром в городе Ухань (провинция Хубэй). Через некоторое время был обнаружен возбудитель данной инфекции, которым оказался неизвестный ранее коронавирус, получивший название SARS-CoV-2. В течение нескольких месяцев SARS-CoV-2 распространился по всему миру, став причиной пандемии, затронувшей более 200 стран. К 1 февраля 2021 г. количество заболевших превысило 103 млн человек, а количество погибших превысило 2 млн человек.

Основные механизмы передачи коронавирусной инфекции - воздушно-капельный (или воздушно-пылевой) и контактный путь. Инкубационный период составляет в среднем 5-6 дней, после чего развиваются первые симптомы заболевания. Для COVID-19 характерными симптомами являются повышение температуры тела, сухой кашель, одышка, утомляемость. Реже встречаются - боль в горле, в суставах, насморк, головная боль. При этом тяжесть заболевания может варьироваться от бессимптомной инфекции до тяжелого острого респираторного синдрома и смерти.

Быстрое распространение SARS-CoV-2 и высокий процент смертности создали острую необходимость в разработке эффективных средств профилактики заболеваний, вызываемых данным вирусом. Разработка безопасной и эффективной вакцины против SARS-CoV-2 в настоящее время является важнейшим глобальным приоритетом.

В течение года после начала пандемии различные фармацевтические компании предложили свои варианты кандидатной вакцины против COVID-19.

Фармацевтическая компания Pfizer при сотрудничестве с биотехнологической компанией BioNTech разработала вакцину BNT162b2 (tozinameran). Данная вакцина представляет собой липидные наночастицы, внутрь которых инкапсулирована модифицированная мРНК, кодирующая мутантную форму S белка SARS-CoV-2. Схема вакцинации предполагает двукратную иммунизацию с интервалом в 21 день (F.P. Polack et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. N Engl J Med 2020; 383:2603-2615).

Фармацевтическая компания Moderna в сотрудничестве с Национальным Институтом здоровья (США) разработала вакцину mRNA-1273. Активным компонентом данной вакцины является мРНК, кодирующая S белок SARS-CoV-2, которая окружена липидной оболочкой. Схема вакцинации предполагает двукратную иммунизацию с интервалом в 28 дней (L.A. Jackson et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 -Preliminary Report. N Engl J Med 2020; 383:1920-1931).

Оксфордский университет в сотрудничестве с фармацевтической компанией AstraZeneca разработал векторную вакцину ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222). Активным компонентом данной вакцины является аденовирус шимпанзе ChAdOx1, содержащий кодон-оптимизированную кодирующую последовательность полноразмерного S белка вируса SARS-CoV-2 (GenBank MN908947) с лидерной последовательностью тканевого активатора плазминогена. Схема вакцинации предполагает двукратную иммунизацию с интервалом в 28 дней (M. Voysey et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. The Lancet. Vol. 397, Issue 10269, P99-111, 2021).

Компания CanSino разработала векторную вакцину против COVID-19, в основе которой репликативно-дефектный аденовирус человека 5 серотипа (Ad5), экспрессирующий полноразмерный S гликопротеин SARS-CoV-2. Схема вакцинации предусматривает однократную иммунизацию. (GenBankYP_009724390) (Feng-Cai Zhu et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. The Lancet. Vol. 369, Issue 10249, P479-488, 2020).

Исследовательские группы Johnson and Johnson и Janssen Pharmaceutical в сотрудничестве с Медицинским центром Beth Israel Deaconess, с помощью технологии Janssen AdVac® создали несколько кандидатных вакцин. После проведенных исследований безопасности и эффективности была выбрана кандидатная вакцина Ad26.COV2.S (Ad26COVS1). Активным компонентом данной вакцины является рекомбинантный аденовирусный вектор 26 серотипа с делецией E1 и E3 области, содержащий ген S белка SARS-CoV-2, с мутацией сайта расщепления фурина и с двумя пролин-стабилизирующими мутациями. В настоящий момент исследуются две схемы вакцинации: однократная и двукратная с интервалом 8 недель (J. Sadoff et al. Interim Results of a Phase 1-2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. N Engl J Med, 2021 Jan 13. DOI: 10.1056/NEJMoa2034201).

Таким образом, можно отметить, что большая часть вакцин против COVID-19 предполагают двукратную вакцинацию.

Каждая из представленных вакцин имеет свои сильные стороны и недостатки. Так, вакцины на основе РНК обладают менее выраженными побочными эффектами, но по сравнению с векторными вакцинами обладают меньшей иммуногенностью. Кроме того, РНК более хрупкая, чувствительная к условиям хранения.

Вакцины, основанные на рекомбинантных вирусных векторах, обладают высокой иммуногенностью. Однако недостатком данного типа вакцин является возможность формирования иммунного ответа на векторную часть, что затрудняет ревакцинацию. Также за счет того, что аденовирусы циркулируют в популяции человека, часть населения может иметь предсуществующий иммунитет против данных вирусов. Экспрессионные векторы, основанные на аденовирусах других млекопитающих, позволяют решить проблему с предсуществующим иммунитетом, однако, такие векторы хуже проникают в клетки человека, а за счет этого снижается эффективность вакцин.

Техническое решение согласно патенту РФ № 2731342 (опубликован 01.09.2020), выбрано авторами заявляемого изобретения за прототип. Из данного патента известны варианты фармацевтического средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2:

содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3;

содержащее компонент 1, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, а также содержащее компонент 2, представляющий собой средство в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3;

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

Кроме того, в данном патенте раскрыто применение указанных вариантов средств для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, включающее использование компонента 1 и 2 в эффективном количестве последовательно с интервалом не менее 1 недели.

Нужно отметить, что такой способ применения имеет ряд недостатков. Так, например, каждый из компонентов фармацевтического средства может вызывать побочные эффекты и аллергические реакции, следовательно при двукратной схеме вакцинации, количество таких явлений будет возрастать. Также такая схема иммунизации имеет ряд практических трудностей, заключающихся в том, что необходимо обеспечить явку пациентов с определенным интервалом времени. Кроме того, имеется ряд логистических трудностей, связанных со своевременной доставкой нужных компонентов средства.

Таким образом, в области техники существует потребность в расширении арсенала фармацевтических средств, способных индуцировать иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2 у широких слоев населения.

Технической задачей заявленной группы изобретений является создание средств, содержащих один активный компонент, и при этом обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у широких слоев населения.

Раскрытие сущности изобретения

Решением технической задачи является вариант средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащего в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Также создан вариант средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащего в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Кроме того, заявлен вариант средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащего в

качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

При этом, частном случае его выполнения, буферный раствор средства для восстановленной лиофилизированной формы содержит, мас. %:

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

Каждый вариант средства применяют для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

При этом средство предназначено для применения интраназально или внутримышечно. Также средство может быть введено совместно и одновременно интраназально и внутримышечно.

Причем в частном случае выполнения средство интраназально вводят в дозе от $5 \cdot 10^{10}$ до $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц, внутримышечно в дозе от $5 \cdot 10^{10}$ до $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц. А совместное введение интраназально и внутримышечно осуществляют в дозе от $5 \cdot 10^{10}$ до $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц внутримышечно, в дозе от $5 \cdot 10^{10}$ до $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц интраназально.

Совместное введение предусматривает интраназальное и внутримышечное введение в рамках одной процедуры вакцинации.

Технический результат заключается в разработке средства, обеспечивающего развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у широких слоев населения.

Основная цель вакцинации - обеспечить эффективную и долгосрочную защиту от патогена. Одним из вариантов достижения этой цели является многократная вакцинация. Когда организм человека впервые встречает вакцинный антиген, это приводит к активации двух основных компонентов адаптивного иммунного ответа: В-лимфоцитов и эффекторных Т-лимфоцитов. Активированные В-лимфоциты трансформируются в плазматические клетки, способные к продукции антител, а также превращаются в В-клетки памяти. Эффекторные Т-лимфоциты делятся на два основных типа: Т-хелперы (CD4+) и Т-киллеры (CD8+). Главной функцией Т-хелперов является поддержка в развитии гуморального или клеточного иммунного ответа. Основной функцией Т-киллеров является уничтожение поврежденных клеток собственного организма. Т-киллеры являются одним из главных компонентов противовирусного иммунитета. Однако через некоторое время после вакцинации, количество антиген-специфичных иммунных клеток в организме начинает уменьшаться, тогда вводят бустерную дозу вакцины, которая позволяет поддерживать количество антиген-специфичных Т- и В-клеток на должном уровне (обеспечивающем протекцию организма от патогена).

Разработка однокомпонентного средства, которое будет вызывать стойкий иммунный ответ после однократной иммунизации, является сложной научно-практической задачей. При этом значимость такой разработки сложно переоценить. Однократное введение способно обеспечить более быстрые темпы массовой вакцинации, что в условиях пандемии имеет критическое значение. Также данное средство может быть полезно для экстренной вакцинации, для иммунизации мобильных групп граждан (кочевые народы и пр.) и др. Кроме того, можно отметить, что при однократном введении снижается неблагоприятное воздействие на человека: травматичность, количество побочных эффектов и аллергических реакций.

Преимуществами разработанного средства также является то, что лиофилизированная форма позволяет хранить его при температуре 2 и 8°C (в отличие от жидкой формы, которая хранится при отрицательных температурах), что обеспечивает удобство хранения и транспортировки.

Краткое описание фигур

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

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

Ось абсцисс - дни.

○ титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 у каждого добровольца участвующего в исследовании, на 14 день.

□ титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 у каждого добровольца участвующего в исследовании, на 21 день.

▲ титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 у каждого добровольца участвующего в исследовании, на 28 день.

Среднее геометрическое значение титра антител представлено в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 14, 21 и 28 дней обозначена скобкой, над которой указано значение p по Т- критерию Вилкоксона.

На фиг. 2 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у добровольцев, иммунизированных лиофилизированной формой разработанного средства по варианту 2,

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

Ось абсцисс - дни.

○ титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 у каждого добровольца участвующего в исследовании, на 14 день.

□ титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 у каждого добровольца участвующего в исследовании, на 21 день.

△ титр IgG к RBD домену гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 у каждого добровольца участвующего в исследовании, на 28 день.

Среднее геометрическое значение титра антител представлено в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями 14, 21 и 28 дней обозначена скобкой, над которой указано значение p по Т- критерию Вилкоксона.

На фиг. 3 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев лиофилизированной формой разработанного средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD8+ (А) и CD4+ (Б) лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - обозначена доля пролиферирующих CD8+ у каждого добровольца на 0 день.

■ - обозначена доля пролиферирующих CD8+ у каждого добровольца на 14 день.

▲ - обозначена доля пролиферирующих CD8+ у каждого добровольца на 28 день.

● - обозначена доля пролиферирующих CD4+ у каждого добровольца на 0 день.

■ - обозначена доля пролиферирующих CD4+ у каждого добровольца на 14 день.

▲ - обозначена доля пролиферирующих CD4+ у каждого добровольца на 28 день.

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

На фиг. 4 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев лиофилизированной формой разработанного средства по варианту 2 по оценке доли пролиферирующих CD8+ (А) и CD4+ (Б) лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - дни.

● - обозначена доля пролиферирующих CD8+ у каждого добровольца на 0 день.

■ - обозначена доля пролиферирующих CD8+ у каждого добровольца на 14 день.

▲ - обозначена доля пролиферирующих CD8+ у каждого добровольца на 28 день.

● - обозначена доля пролиферирующих CD4+ у каждого добровольца на 0 день.

■ - обозначена доля пролиферирующих CD4+ у каждого добровольца на 14 день.

▲ - обозначена доля пролиферирующих CD4+ у каждого добровольца на 28 день.

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

Осуществление изобретения

Активным компонентом разработанного средства является экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма аденовируса, со встроенной экспрессионной кассетой, содержащей ген антигена вируса SARS-CoV-2.

Аденовирусные векторы способны проникать в различные типы клеток человека, обеспечивают высокие уровни экспрессии целевого антигена, приводят к индукции как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. В ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России было разработано 3 варианта экспрессионных векторов на основе аденовирусов млекопитающих:

экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5;

экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области;

экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

В качестве антигена был выбран S белок SARS-CoV-2, который находится на поверхности вирусной частицы. Это один из наиболее перспективных антигенов, позволяющих индуцировать мощный и

длительный иммунный ответ. Также было показано, что антитела к S белку SARS-CoV-2 являются вирус-нейтрализующими.

Для достижения максимально эффективной индукции иммунных реакций авторы разработали различные варианты экспрессионных кассет, содержащих ген S белка.

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

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

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. Промотор EF1 - промотор человеческого эукариотического фактора элонгации трансляции 1α (EF- 1α). Промотор является конститутивно активным в широком диапазоне типов клеток [Wang X., Xu Z., Tian Z., Zhang X., Xu D., Li Q., Zhang J., Wang T. The EF- 1α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. J Cell Mol Med. 2017 Nov; 21(11):3044-3054. doi: 10.1111/jcmm.13216. Epub 2017 May 30. PMID: 28557288; PMCID: PMC5661254.]. Ген EF- 1α кодирует фактор элонгации- 1α , который является одним из наиболее распространенных белков в эукариотических клетках и экспрессируется почти во всех типах клеток млекопитающих. Данный промотор EF- 1α часто активен в клетках, в которых вирусные промоторы не способны экспрессировать контролируемые гены, и в клетках, в которых вирусные промоторы постепенно заглушаются.

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

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

1) Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делегированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

2) Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делегированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

3) Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делегированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Осуществление изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1. Получение активного компонента средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа.

На первом этапе работы был разработан дизайн 3 вариантов экспрессионных кассет:

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

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

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

Синтез гена S белка вируса SARS-CoV-2 осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Для получения рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа было использовано две плазмиды, полученные в ФГБУ "НИЦЭМ им Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России: плазида pAd26-Ends, несущая плечи гомологии генома аденовируса 26-го серотипа, и плазида pAd26-too, несущая геном рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа с открытой рамкой считывания ORF6 аденовируса человека 5-го серотипа и с делецией E1 и E3-областей.

На первом этапе работы, с помощью методов генной инженерии на основе плазмиды pAd26-Ends, были получены плазмиды pAd26-Ends-CMV-S-CoV2, pAd26-Ends-CAG-S-CoV2, pAd26-Ends-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, соответственно, а также несущие плечи гомологии генома аденовируса 26-го серотипа. Далее полученные плазмиды линеаризовали по уникальному сайту гидролиза и каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pAd26-too. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd26-too-CMV-S-CoV2, pAd26-too-CAG-S-CoV2, pAd26-too-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа с открытой рамкой считывания ORF6 аденовируса человека 5-го серотипа и с делецией E1 и E3-областей, с экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, соответственно.

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

В результате проведенной работы были получены рекомбинантные штаммы human adenovirus 26-го серотипа: Ad26-too-CMV-S-CoV2, Ad26-too-CAG-S-CoV2, Ad26-too-EF1-S-CoV2. По аналогичной схеме был получен контрольный штамм human adenovirus 26-го серотипа: Ad26-too, не содержащий гена S белка вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, был получен экспрессионный вектор, содержащий геном рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, который является активным компонентом разработанного средства.

Пример 2. Получение активного компонента средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа.

В данной работе также использовали 3 варианта экспрессионных кассет:

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

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

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

Синтез гена S белка вируса SARS-CoV-2 осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Для получения рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа было использовано две плазмиды, полученные в ФГБУ "НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России:

плазида pAd5-Ends, несущая плечи гомологии генома аденовируса 5-го серотипа (одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса человека 5-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую pIX белок; второе плечо гомологии содержит последовательность нуклеотидов после ORF3 E4-области до конца генома) плазида pAd5-too, несущая геном рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа с делецией E1 и E3-областей.

На первом этапе работы, с помощью методов генной инженерии на основе плазмиды pAd5-Ends, были получены плазмиды pAd5-Ends-CMV-S-CoV2, pAd5-Ends-CAG-S-CoV2, pAd5-Ends-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, соответственно, а также несущие плечи гомологии генома аденовируса 5-го серотипа. Далее полученные плазмиды линеаризовали по уникальному сайту гидролиза и каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pAd5-too. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-CAG-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса человека 5-го с делецией E1 и E3-областей, с экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, соответственно.

На следующем этапе плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-CAG-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2 гидролизировали специфическими эндонуклеазами рестрикции для удаления векторной части. Полученными препаратами ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293.

В результате проведенной работы были получены рекомбинантные штаммы human adenovirus 5-го серотипа: Ad5-too-CMV-S-CoV2, Ad5-too-CAG-S-CoV2, Ad5-too-EF1-S-CoV2. По аналогичной схеме был получен контрольный штамм human adenovirus 5-го серотипа: Ad5-too, не содержащий гена S белка вируса SARS-CoV-2.

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

human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, который является активным компонентом разработанного средства.

Пример 3. Получение активного компонента средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа.

В данной работе использовали 3 варианта экспрессионных кассет:

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

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

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

Синтез гена S белка вируса SARS-CoV-2 осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

Для получения рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа было использовано две плазмиды, полученные в ФГБУ "Н ИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России:

плазида pSim25-Ends, несущая плечи гомологии генома аденовируса обезьян 25-го серотипа.

плазида pSim25-null, несущая геном рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа с делецией E1- и E3-областей.

На первом этапе работы, с помощью методов генной инженерии на основе плазмиды pSim25-Ends, были получены плазмиды p-Sim25-Ends-CMV-S-CoV2, p-Sim25-Ends-CAG-S-CoV2, p-Sim25-Ends-EF1-S-CoV2, содержащие экспрессионные кассеты SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, соответственно, а также несущие плечи гомологии генома аденовируса обезьян 25-го серотипа. Далее полученные плазмиды линейаризовали по уникальному сайту гидролиза и каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pSim25-too. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pSim25-too-CMV-S-CoV2, pSim25-too-CAG-S-CoV2, pSim25-too-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го с делецией E1 и E3-областей, с экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, соответственно.

На следующем этапе плазмиды pSim25-too-CMV-S-CoV2, pSim25-too-CAG-S-CoV2, pSim25-too-EF1-S-CoV2 гидролизировали специфическими эндонуклеазами рестрикции для удаления векторной части. Полученными препаратами ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293.

В результате проведенной работы были получены рекомбинантные штаммы simian adenovirus 25-го серотипа: simAd25-too-CMV-S-CoV2, simAd25-too-CAG-S-CoV2, simAd25-too-EF1-S-CoV2. По аналогичной схеме был получен контрольный штамм simian adenovirus 25-го серотипа: simAd25-too, не содержащий гена S белка вируса SARS-CoV-2.

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

Пример 4. Разработка буферного раствора.

Авторами изобретения был подобран буферный раствор на водной основе (т.е. средство в лиофилизированной форме при восстановлении водой содержит буферный раствор), обеспечивающий стабильность рекомбинантных аденовирусных частиц. Для поддержания pH раствора в буфер добавили трис-(гидроксиметил)аминометан (трис). Для достижения необходимой ионной силы и осмолярности был добавлен хлорид натрия. Для криопротекции в буфер добавили сахарозу. Магния хлорида гексагидрат добавили в качестве источника двухвалентных катионов, ЭДТА - в качестве ингибитора свободно-радикального окисления, полисорбат-80 - в качестве поверхностно-активного вещества, этанол 95% - в качестве ингибитора свободно-радикального окисления.

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

экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1 (Ad26-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц).

экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1 (Ad5-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц).

экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 4 (simAd25-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц).

Полученные средства лиофилизировали и хранили при температуре 2 и 8°C в течение 3 месяцев, затем оценивали изменение титра рекомбинантных аденовирусов.

Таблица 1

Состав экспериментальных буферных растворов

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

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

Таким образом, разработанный буферный раствор для лиофилизированной формы вакцины обеспечивает стабильность всех компонентов разработанного средства в следующем диапазоне действующих веществ:

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

Пример 5. Получение средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме.

Для получения лиофилизированной лекарственной формы разработанного фармацевтического средства с возможностью длительного хранения при температурном режиме от 2 до 8°C, использовали буферный раствор, подобранный в примере 4, который смешивали с соответствующим активным компонентом.

С указанным составом были проведены три независимых цикла лиофилизации с использованием подобранной ранее программы лиофилизации (табл. 2).

Таблица 2

Программа лиофилизации

Фаза	Время, мин	T, °C	Давление, мТор	Примечание
1	300	-70.0	-	Замораживание продукта
2	10	-40.0	300	Включение конденсора, набор вакуума
3	1950	-40.0	200	Постепенный нагрев в течении фазы
4	1950	-30.0	100	Постепенный нагрев в течении фазы
5	1550	-20.0	100	Постепенный нагрев в течении фазы
6	30	-10.0	100	Постепенный нагрев в течении фазы
7	30	+0.0	100	Постепенный нагрев в течении фазы
8	10	От +0.0 до +15.0	100	Досушка

Критериями приемлемости для лиофилизированного препарата были выбраны внешний вид - сухая пористая масса в виде таблетки, цельная или раскрошенная, белого или почти белого цвета; потеря в массе при высушивании (остаточная влажность) - не более 5%, время восстановления (не более 5 мин), значение специфической активности в готовой лекарственной форме.

В результаты лиофильного высушивания были получены показатели, соответствующие критериям приемлемости.

Таким образом, были получены:

1) средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3;

2) средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3;

3) средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

Пример 6. Токсичность разработанного средства при однократном введении (острая токсичность) на мышах при внутривенном и внутримышечном введении.

В данном исследовании оценивали острую токсичность

средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3;

средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3;

средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

В исследовании были использованы аутбредные мыши, обоих полов, массой 18-20 г, возрастом 6-8 недель.

Расчет дозы средства проводили исходя из иммунизирующей дозы (10^8 в.ч.), полученной в предварительном эксперименте на чувствительном виде животных - сирийских хомячках. Расчет доз для мышей проводили исходя из массы тела. Минимальной дозой для токсикологических экспериментов была выбрана доза для мыши 10^8 в.ч., как наиболее близкая к терапевтической. Для пересчета доз не использовался коэффициент межвидового пересчета, дозы получены путем прямого пересчета на массу тела, согласно рекомендации ВОЗ для вакцинных препаратов.

В результате, для введения мышам в данном эксперименте выбрали следующие дозы средства:

- 10^8 в.ч. - близкая к эффективной дозе (ЭД) для мышей;
- 10^9 в.ч. - увеличенная ЭД для мышей в 20 раз;
- 10^{10} в.ч. - увеличенная ЭД для мышей в 200 раз;
- 10^{11} в.ч. - увеличенная ЭД для мышей в 2000 раз.

Таким образом, были получены следующие экспериментальные группы животных:

- 1) Ad26-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^8$ в.ч., 20 мышей;
- 2) Ad26-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^9$ в.ч., 20 мышей;
- 3) Ad26-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{10}$ в.ч., 20 мышей;
- 4) Ad26-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{11}$ в.ч., 20 мышей;
- 5) Ad5-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^8$ в.ч., 20 мышей;
- 6) Ad5-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^9$ в.ч., 20 мышей;
- 7) Ad5-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{10}$ в.ч., 20 мышей;
- 8) Ad5-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{11}$ в.ч., 20 мышей;
- 9) simAd25-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^8$ в.ч., 20 мышей;
- 10) simAd25-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^9$ в.ч., 20 мышей;
- 11) simAd25-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{10}$ в.ч., 20 мышей;
- 12) simAd25-too-CMV-S-CoV2, $1 \cdot 10^{11}$ в.ч., 20 мышей;
- 13) плацебо (буферный раствор), 20 мышей.

Клинический осмотр каждого животного проводили ежедневно в течение 14 дней, регистрируя признаки интоксикации и число павших животных.

Фиксировали следующие параметры функционального состояния лабораторных животных: активность, передвижение, внешний вид, состояние шерсти, глаз, ушей, зубов, конечностей. Физиологические функции: дыхание, слюноотделение, слюна, моча, экскрет. На протяжении эксперимента все животные оставались живы. Во всех группах животные выглядели здоровыми, активно поедали корм, адекватно реагировали на раздражители, проявляли исследовательский интерес. Шерстный покров густой, ровный и блестящий, плотно прилегал к поверхности тела, выпадения или ломкости шерсти не выявлено. Мышечный тонус не отличался повышенной возбудимостью. Ушные раковины без корок, не воспалены, подергиваний не замечено. Зубы обычного цвета, без поломок. Мыши были средней упитанности, истощением не страдали. Область живота в объеме не увеличена. Дыхание ровное, незатрудненное. Слюноотделение в норме. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, мышечный тонус, рефлексы соответствовали физиологической норме. Поведение опытных животных не отличалось от контрольных.

На 14 сутки от начала эксперимента, осуществляли запланированную эвтаназию мышей методом дислокации шейных позвонков. В ходе проведения исследования животные в тяжелом состоянии с признаками неминуемой смерти не наблюдались, гибели животных не было.

Проводили полную некропсию тел всех животных. При некропии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями и скелетно-мышечную систему.

При макроскопическом исследовании не обнаружено влияния средства на состояние внутренних органов мышей, различий между контрольными и опытными группами не найдено. Статистически достоверных различий в массе органов между опытными и контрольной группами не обнаружено. Набор массы животных в опытных и контрольных группах не отличался.

Пример 7. Определение эффективности иммунизации разработанным средством по оценке гуморального иммунного ответа.

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

В эксперименте использовали млекопитающие - мыши линии BALB/c, самки 18 г. Все животные были разделены на 13 групп по 5 животных, которым внутримышечно вводили варианты разработанного средства в лиофилизированной форме. Во флакон, содержащий разработанное средство в лиофилизированной форме 10^{11} вирусных частиц/флакон, добавляли 1,0 мл воды для инъекций. В результате получили восстановленное лиофилизированное средство. Далее флакон встряхивали до полного растворения лиофилизата и вводили животным по 200 мкл внутримышечно.

Были получены следующие группы животных:

- 1) Ad26-too-CMV-S-CoV2,
- 2) Ad26-too-CAG-S-CoV2,
- 3) Ad26-too-EF1-S-CoV2,
- 4) Ad26-too,
- 5) Ad5-too-CMV-S-CoV2,
- 6) Ad5-too-CAG-S-CoV2,
- 7) Ad5-too-EF1-S-CoV2,
- 8) Ad5-too,
- 9) simAd25-too-CMV-S-CoV2,
- 10) simAd25-too-CAG-S-CoV2,
- 11) simAd25-too-EF1-S-CoV2,
- 12) simAd25-too,
- 13) плацебо (буфер).

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

- 1) Антиген адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 ч при температуре 4°C.
- 2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществлялась "забивка" планшета 5% молоком, растворенном в буфере для блокирования неспецифического сигнала в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении 1 ч.
- 3) Образцы сывороток иммунизированных мышей разводили вначале в 100 раз, а затем делали серию двукратных разведений.
- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C.
- 6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
- 7) Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.
- 8) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C.
- 9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
- 10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМБ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 мин добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

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

Таблица 3

Титр антител к S белку SARS-CoV-2 в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител)

№	Название группы животных	Титр антител
1	Ad26-too-CMV-S-CoV2,	2111
2	Ad26-too-CAG-S-CoV2,	1838
3	Ad26-too-EF1-S-CoV2	2111
4	Ad26-too	0
5	Ad5-too-CMV-S-CoV2,	38802
6	Ad5-too-CAG-S-CoV2,	33779
7	Ad5-too-EF1-S-CoV2	25600
8	Ad5-too	0
9	simAd25-too-CMV-S-CoV2,	12800
10	simAd25-too-CAG-S-CoV2,	11143
11	simAd25-too-EF1-S-CoV2	14703
12	simAd25-too	0
13	плацебо (буфер)	0

Таким образом, результаты эксперимента показывают, что все разработанные средства вызывают гуморальный иммунный ответ против SARS-CoV-2.

Пример 8. Изучение иммуногенности разработанного средства путем оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV-2 в крови добровольцев в различные сроки после вакцинации.

Цель данного эксперимента заключалась в определении напряженности иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 у добровольцев в различные сроки после их иммунизации различными вариантами разработанного средства.

В исследование включили здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет. Все участники исследования были разделены на несколько групп.

1) Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, 10^{11} вирусных частиц/дозу, 9 человек.

2) Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, 10^{11} вирусных частиц/дозу, 9 человек.

Во флакон, содержащий разработанное средство в лиофилизированной форме, добавляли 1,0 мл воды для инъекций. Далее флакон встряхивали до полного растворения лиофилизата. Разработанное средство вводили внутримышечно в дельтовидную мышцу (верхнюю треть наружной поверхности плеча). При невозможности введения в дельтовидную мышцу - средство вводили в латеральную широкую мышцу бедра.

Перед иммунизацией, а также через 14, 21, 28 и 42 дней, у пациентов отбирали образцы крови. Из полученных образцов выделяли сыворотку крови, которую в дальнейшем использовали для определения титра антител к S антигену вируса SARS-CoV-2.

Титр антител определяли с помощью тест-системы для иммуноферментного анализа, разработанной в ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России (ПЗН 2020/10393 2020-05-18), которая позволяет определять титр IgG к RBD домену S антигена вируса SARS-CoV-2.

Планшеты с предварительно адсорбированным RBD (100 нг/лунку) промывали 5 раз промыточным буфером. Далее в лунки планшета вносили в 2 повторах по 100 мкл положительного контроля, а также в 2 повторах по 100 мкл отрицательного контроля. В остальные лунки планшета добавляли серию двукратных разведений исследуемых образцов (по два повтора на каждый образец). Планшет заклеивали пленкой и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C при перемешивании со скоростью 300 об/мин. Далее лунки промывали 5 раз рабочим раствором буфера для промывания. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюгата моноклональных антител, планшет закрывали липкой пленкой и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C при перемешивании со скоростью 300 об/мин. Далее лунки промывали 5 раз рабочим раствором буфера для промывания. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл хромоген-субстратного раствора и инкубировали в течение 15 мин в темном месте при температуре от 20°C. После этого останавливали реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента (1 М раствор серной кислоты). Результат учитывали в течение 10 мин после остановки реакции путем измерения на спектрофотометре оптической плотности при длине волны 450 нм.

Титр IgG определяли как максимальное разведение сыворотки, при котором значение OD450 сыворотки иммунизированного участника превышает значение контрольной сыворотки (сыворотка участника до иммунизации) более чем в 2 раза.

Результаты анализа титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови добровольцев после введения различных вариантов разработанного средства представлены на фиг. 1, 2.

Как видно из представленных данных, иммунизация добровольцев обоими вариантами разработанного средства позволяет сформировать выраженный (статистически достоверно отличный от показателей контрольной не иммунизированной группы добровольцев) гуморальный иммунитет, характеризующийся повышением титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2. При этом рост напряженности гуморального иммунного ответа отмечается с увеличением дней после иммунизации.

Пример 9. Изучение иммуногенности разработанного средства путем оценки клеточного иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV-2 в крови добровольцев в различные сроки после вакцинации.

Цель данного эксперимента заключалась в определении напряженности клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 у добровольцев после их иммунизации различными вариантами разработанного средства.

В исследование включили здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет. Все участники исследования были разделены на несколько групп.

1) Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovi-

гус 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, 10^{11} вирусных частиц/дозу, 9 человек.

2) Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой SEQ ID NO: 1, 10^{11} вирусных частиц/дозу, 9 человек.

Добровольцы были однократно внутримышечно иммунизированы соответствующим средством. Во флакон, содержащий разработанное средство в лиофилизированной форме, добавляли 1,0 мл воды для инъекций. Далее флакон встряхивали до полного растворения лиофилизата. Разработанное средство вводили внутримышечно в дельтовидную мышцу (верхнюю треть наружной поверхности плеча). При невозможности введения в дельтовидную мышцу - средство вводили в латеральную широкую мышцу бедра.

Перед иммунизацией, а также через 14 и 28 дней, у пациентов отбирали образцы крови, из которых выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколла (1,077 г/мл; ПанЭко). Далее выделенные клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE (InvivoGen, США) и высевали на лунки 96л планшета ($2 \cdot 10^5$ кл/лунку). Затем проводили повторную стимуляцию лимфоцитов в условиях *in vitro* добавлением в культуральную среду S белка коронавируса (конечная концентрация белка 1 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 ч после добавления антигена проводили измерение % пролиферирующих клеток, а культуральную среду отбирали для измерения количества гамма-интерферона.

Для определения % пролиферирующих клеток проводили их окрашивание антителами против маркерных молекул Т-лимфоцитов CD3, CD4, CD8 (anti-CD3 Pe-Cy7 (BDBiosciences, клон SK7), anti-CD4 APC (BDBiosciences, клон SK3), anti-CD8 PerCP-Cy5.5 (BDBiosciences, клон SK1)). Пролиферирующие (с меньшим количеством красителя CFSE клеток) CD4+ и CD8+ Т лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлюориметра BD FACS AriaIII (BDBiosciences, США).

Результирующий процент пролиферирующих клеток в каждом образце определяли путем вычитания результата, полученного при анализе интактных клеток их результата, полученного при анализе клеток рестимулированных антигеном S коронавируса. Полученные результаты представлены на фиг. 3, 4.

Результаты проведенного исследования показали, что рост напряженности клеточного иммунитета, вызванного иммунизацией добровольцев различными вариантами средства, согласно медиане значений пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, отмечается с увеличением дней после иммунизации. Во всех группах максимальные значения, пролиферирующих как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов наблюдаются на 28 день после иммунизации. Между 0 и 28 днем исследования наблюдается максимальная статистически достоверная разница в значениях, пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов - $p < 0,001$.

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

Пример 10. Оценка нежелательных явлений у добровольцев после однократной и двукратной иммунизации вариантами разработанного средства.

Цель данного эксперимента заключалась в определении побочных эффектов у добровольцев после их иммунизации различными вариантами разработанного средства.

В исследование включили здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет. Все участники исследования были разделены на несколько групп.

1) Однократное внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, 10^{11} вирусных частиц/дозу, 9 человек.

2) Однократное внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, 10^{11} вирусных частиц/дозу, 9 человек.

3) Двукратная схема иммунизации, при которой вначале вводят средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме 10^{11} вирусных частиц/дозу, а через 21 день вводят средство на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме 10^{11} вирусных частиц/дозу, 20 человек.

В табл. 4 включены данные об основных нежелательных явлениях, зарегистрированных с момента начала исследования и вплоть до визита (телефонного контакта) 180-го дня в рамках исследования.

Таблица 4

Основные нежелательные явления, наблюдаемые после однократного введения разработанного препарата по сравнению с двукратным введением

	Кол-во субъектов (%) Кол-во событий		
	26	5	26+5
Лабораторные и инструментальные данные			
Снижение числа естественных клеток-киллеров	4 (44.44%) 6	3 (33.33%) 4	4 (20.00%) 6
Повышение числа Т-лимфоцитов	2 (22.22%) 2	4 (44.44%) 4	10 (50.00%) 10
Увеличение количества CD4-лимфоцитов	1 (11.11%) 1	4 (44.44%) 4	8 (40.00%) 8
Повышение числа В лимфоцитов	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	7 (35.00%) 7
Увеличение числа лимфоцитов	2 (22.22%) 2	0 (0.00%) 0	6 (30.00%) 7
Повышение количества CD8-лимфоцитов	1 (11.11%) 1	0 (0.00%) 0	6 (30.00%) 6
Повышение уровня иммуноглобулина Е (IgE) в крови	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	4 (20.00%) 4
Повышение уровня иммуноглобулина А	0 (0.00%) 0	1 (11.11%) 1	0 (0.00%) 0
Уменьшение соотношения CD4/CD8	1 (11.11%) 1	0 (0.00%) 0	2 (10.00%) 2
Повышение уровня аспаратаминотрансферазы	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	1 (5.00%) 1
Повышение уровня билирубина в крови	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	1 (5.00%) 1
Повышение уровня холестерина в крови	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	1 (5.00%) 1
Повышение числа естественных клеток-киллеров	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	1 (5.00%) 1
Снижение уровня иммуноглобулина Е (IgE) в крови	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	1 (5.00%) 1
Снижение уровня креатинина в крови	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	1 (5.00%) 1
Снижение уровня лактатдегидрогеназы в крови	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	1 (5.00%) 1
Общие нарушения и реакции в месте введения			
Боль в месте вакцинации	5 (55.56%) 5	7 (77.78%) 7	12 (60.00%) 19
Боль	1 (11.11%) 1	2 (22.22%) 2	6 (30.00%) 9
Уплотнение в месте введения	2 (22.22%) 2	1 (11.11%) 1	0 (0.00%) 0
Гипертермия	1 (11.11%) 1	1 (11.11%) 1	5 (25.00%) 5
Пирексия	0 (0.00%) 0	2 (22.22%) 2	0 (0.00%) 0
Астения	0 (0.00%) 0	0 (0.00%) 0	4 (20.00%) 4
Повышение температуры кожи в месте вакцинации	0 (0.00%) 0	1 (11.11%) 1	0 (0.00%) 0
Нарушения со стороны нервной системы			
Головная боль	3 (33.33%) 3	4 (44.44%) 4	5 (25.00%) 6

Как видно из представленных данных однократная схема иммунизации разработанным средством для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме вызывает существенно меньше побочных эффектов, по сравнению с двукратной схемой иммунизации.

Пример 11. Определение эффективности интраназальной иммунизации разработанным средством по оценке гуморального иммунного ответа.

Целью данного исследования является проверка эффективности разработанного средства при интраназальном введении.

В эксперименте использованы мыши линии C57/B16, самки 18-20 г., 5 животных/группе. Были сформированы следующие группы животных.

1) Однократное интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

2) Однократное интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

3) Однократное интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

4) Однократное интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

5) Однократное интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

6) Однократное интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

7) Однократное интраназальное введение буферного раствора (отрицательный контроль).

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

1) Антиген адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 ч при температуре 4°C .

2) Далее для избавления от неспецифического связывания в лунки планшета добавляли 5% молоко в TPBS 100 мкл/лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении 1 ч.

3) Образцы сывороток иммунизированных мышей разводили вначале в 100 раз, а затем делали серию двукратных разведений.

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

5) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C .

6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

8) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C .

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в табл. 5.

Таблица 5

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

Группа животных	Титр антител
Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу	1056
Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу	7352
simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу	5572
Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу	2111
Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу	16890
simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу	11143
Буферный раствор	0

Как видно из полученных результатов интраназальная иммунизация животных разработанным средством приводила к повышению титра антител к S белку вируса SARS-CoV-2. Таким образом, результаты данного эксперимента подтверждают возможность использования разработанного средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме путем его интраназального введения.

Пример 12. Оценка иммуногенности разработанного средства при совместной внутримышечной и интраназальной иммунизации.

Целью данного исследования является проверка эффективности разработанного средства при совместном интраназальном введении и внутримышечном введении.

В эксперименте использованы мыши линии C57/B16, самки 18-20 г., 5 животных/группе. Были сформированы следующие группы животных.

1) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу и одновременно внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

2) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

3) Внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

4) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу и одновременно внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

5) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

6) Внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

7) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу и одновременно внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

8) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

9) Внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц/дозу.

10) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу и одновременно внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

11) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

12) Внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа (Ad26-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

13) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу и одновременно внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

14) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

15) Внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

16) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу и одновременно внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

17) Интраназальное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

18) Внутримышечное введение средства на основе рекомбинантного аденовируса обезьян 25 серотипа (simAd25-too-CMV-S-CoV2) в лиофилизированной форме, $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц/дозу.

19) Интраназальное введение буферного раствора и одновременно внутримышечное введение буферного раствора (отрицательный контроль).

20) Интраназальное введение буферного раствора (отрицательный контроль).

21) Внутримышечное введение буферного раствора (отрицательный контроль).

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

1) Антиген адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 ч при температуре 4°C.

2) Далее для избавления от неспецифического связывания в лунки планшета добавляли 5% молоко в TPBS 100 мкл/лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении 1 ч.

3) Образцы сывороток иммунизированных мышей разводили вначале в 100 раз, а затем делали серию двукратных разведений.

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

5) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C.

6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

8) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°C.

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в табл. 6.

Таблица 6

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

	Группа животных	Титр антител
1	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	2786
2	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н	919
3	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	2111
4	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м,	33779
5	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н	8445

6	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	38802
7	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	19401
8	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н	7352
9	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	19401
10	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	44572
11	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	51200
12	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	58813
13	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	51200
14	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	22286
15	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу и/н, Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу в/м	25600
16	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	3676
17	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н,	1056
18	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	2786
19	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н,	44572

	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	
20	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н	11143
21	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	33779
22	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	22286
23	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н	6400
24	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	19401
25	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	51200
26	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	51200
27	Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	58813
28	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	51200
29	Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	25600
30	simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу и/н, Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу в/м	22286
31	Буферный раствор и/н Буферный раствор в/м	0
32	Буферный раствор и/н	0
33	Буферный раствор в/м	0

Как видно из полученных результатов совместная интраназальная и внутримышечная иммунизация животных разработанным средством приводила к более мощному гуморальному иммунному ответу по сравнению с иммунизацией только одним способом. Таким образом, результаты данного эксперимента подтверждают возможность использования разработанного средства для индукции специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 путем совместного и одновременного внутримышечного и интраназального введения.

Промышленная применимость

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

2. Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором deletированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

3. Средство для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в лиофилизированной форме, содержащее в качестве единственного активного компонента экспрессионный вектор на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovi-

гus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

4. Средство по пп.1-3, отличающееся тем, что восстановленная лиофилизированная форма содержит буферный раствор, мас. %:

трис от 0,0180 до 0,0338

хлорид натрия от 0,1044 до 0,1957

сахароза от 5,4688 до 10,2539

магния хлорида гексагидрат от 0,0015 до 0,0028

ЭДТА от 0,0003 до 0,0005

полисорбат-80 от 0,0037 до 0,0070

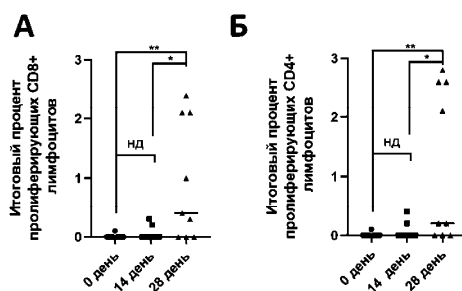
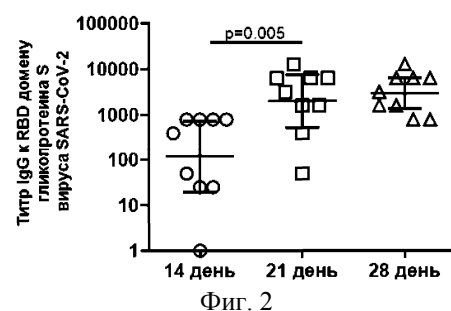
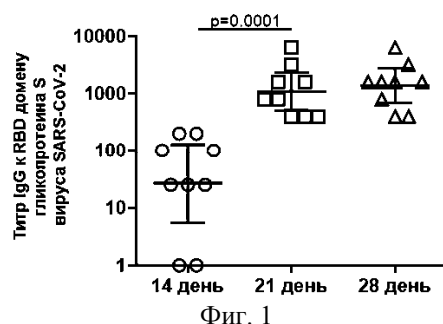
вода - остальное.

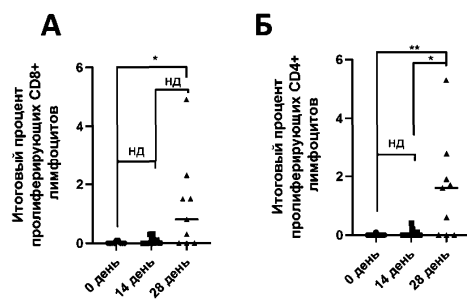
5. Применение средства по пп.1-3 для индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, где указанное средство предназначено для интраназального или внутримышечного введения или совместно-го интраназального и внутримышечного введения.

6. Применение по п.5, отличающееся тем, что указанное средство предназначено для интраназального введения в дозе $5 \cdot 10^{10}$ - $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц.

7. Применение по п.5, отличающееся тем, что указанное средство предназначено для внутримышечного введения в дозе $5 \cdot 10^{10}$ - $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц.

8. Применение по п.5, отличающееся тем, что при совместном введении интраназально и внутримышечно указанное средство внутримышечно вводят в дозе $5 \cdot 10^{10}$ - $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц, а интраназально в дозе $5 \cdot 10^{10}$ - $5 \cdot 10^{11}$ вирусных частиц.





Фиг. 4

