

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042672**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.13

(21) Номер заявки
202290451

(22) Дата подачи заявки
2022.02.18

(51) Int. Cl. **A61K 39/215** (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА SARS-CoV-2 У ЛИЦ СТАРШЕ 60 ЛЕТ И/ИЛИ ИМЕЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ (ВАРИАНТЫ)

(31) **2021104430**

(32) **2021.02.21**

(33) **RU**

(43) **2022.09.14**

(86) **PCT/RU2022/000045**

(87) **WO 2022/177465 2022.08.25**

(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)**

(72) Изобретатель:
**Зубкова Ольга Вадимовна,
Ожаровская Татьяна Андреевна,
Должикова Инна Вадимовна,
Попова Ольга, Щедляков 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, Народицкий Борис
Савельевич, Логунов Денис Юрьевич,
Гинцбург Александр Леонидович,
Чернецов Владимир Александрович,
Крюков Евгений Владимирович,
Бабира Владимир Федорович, Кутаев
Дмитрий Анатольевич, Логинова
Светлана Яковлевна (RU)**

(56) **RU-C1-2743595
RU-C1-2743593
RU-C1-2738081
CN-B-111217917
CN-B-110974950**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Предложенное средство может применяться для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2. Технической задачей заявленного изобретения является создание средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у лиц в возрасте 60 и старше, а также имеющих хронические заболевания. Технический результат заключается в создании безопасного и эффективного средства, которое обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у лиц в возрасте 60 и старше, а также имеющих хронические заболевания. Указанный технический результат достигается тем, что предложено применение средства, содержащего 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, и/или содержащего 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

B1**042672****042672****B1**

ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания. Также предложено применение средства, содержащего 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 содержащего 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, или содержащее только компонент 2 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания. Кроме того, предложено применение средства, содержащего 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 содержащего 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, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания. При этом при применении средство вводят интраназально и/или внутримышечно. Также при применении средства компоненты вводят последовательно с интервалом более 1 недели. При этом при применении средство находится в жидкой или лиофилизированной форме. Также при применении средства компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках.

042672
B1

042672
B1

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Предложено применение средства для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2- вакцинации, в том числе ревакцинации, лиц, имеющих возраст 60 лет и старше и/или имеющих хронические заболевания.

Уровень техники

Продолжающаяся пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 затронула миллионы людей по всему миру. В настоящее время зарегистрировано более 100 млн заболевших и более 2 млн погибших от данного заболевания.

В ходе проведенных исследований было установлено, что причиной заболевания является РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2, относящийся к семейству Coronaviridae, к линии Beta-CoV B. Было показано, что вирус распространяется путем прямой, контактной передачи, а также воздушно-капельным путем. Средний инкубационный период составляет 5,1 дня, после чего развиваются первые симптомы заболевания (Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann Intern Med.* 2020. 10.7326/M20-0504). Для COVID-19 характерными симптомами являются: повышение температуры тела, сухой кашель, одышка, утомляемость. Реже встречаются - боль в горле, в суставах, насморк, головная боль.

COVID-19 может протекать как в легкой, так и тяжелой форме. Наиболее грозными осложнениями данного заболевания являются - пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, острая дыхательная недостаточность, острая сердечная недостаточность, острая почечная недостаточность, септический шок, кардиомиопатии и др. При этом тяжелая форма заболевания чаще развивается у пациентов старшего возраста и имеющих хронические заболевания. Так по данным Центра по контролю и профилактике заболеваний риск смертельного исхода COVID-19 в возрасте 50-64 года повышается в 30 раз, в 65-74 года - в 90 раз, в 75-84 года в 220 раз, а у людей старше 85 лет - в 630 раз (по сравнению с более молодыми людьми (18-29 лет) (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html>)).

SARS-CoV-2 проникает в организм человека путем связывания S белка вируса с рецептором ангиотензин-превращающего фермента-2 (ACE-2), который экспрессируется в легких, эндотелии, сердце, почках и желудочно-кишечном тракте. Предполагается, что за счет этого специфического механизма, риск инфицирования пожилых людей возрастает. По данным CDC, 63,1% взрослых старше 60 лет страдают гипертонией, 38% людей старше 65 лет страдают хронической болезнью почек (ХБП), а 26,8% взрослых старше 65 лет страдают диабетом. Многие из этих пациентов используют ингибиторы ACE-2 и блокаторы рецепторов ангиотензина, которые активируют рецептор ACE-2. Таким образом, предполагается, что пожилые люди с такими сопутствующими заболеваниями могут иметь повышенный риск и иметь более тяжелое течение инфекции SARS-CoV-2 (Z. Shahid et al. COVID-19 and Older Adults: What We Know. *J Am Geriatr Soc.* 2020 May; 68(5): 926-929).

Таким образом, люди пожилого возраста и/или с наличием хронических заболеваний особенно нуждаются в вакцинации против COVID-19.

К настоящему времени разработано несколько вакцин против Covid-19. Фармацевтическая компания Moderna в сотрудничестве с Национальным Институтом здоровья (США) разработала вакцину mRNA-1273, которая состоит из мРНК, кодирующей S белок SARS-CoV-2, защищенной липидной оболочкой. В настоящий момент закончилась 3 фаза клинических испытаний данной вакцины. В данное исследование было включено более 7000 добровольцев в возрасте старше 65 лет, а также более 5000 добровольцев в возрасте до 65 лет, которые имеют хронические заболевания, которые подвергают их повышенному риску тяжелой формы COVID-19 (диабет, ожирение и сердечные заболевания). Согласно опубликованным данным эффективность вакцины для людей старше 65 лет составила 86,4% (L. Baden et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020 Dec 30).

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. В ходе последней фазы клинических исследований было вакцинировано более 18 тыс. человек в возрасте от 16 до 89 лет, при этом 7971 человек (42,3%) были старше 55 лет. Также сообщается, что часть пациентов имела хронические заболевания (ожирение и др.), которые являются факторами риска неблагоприятного исхода COVID-19. Эффективность вакцины для пациентов старше 55 лет составила 93,7%, старше 65 лет - 94,7%, старше 75 лет - 100% (Polack F. et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020 Dec).

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. В клинические исследования препарата были включены лица в возрасте 56 лет и старше, которые составили 12,2% от общей когорты (1006 (13,3%) в Великобритании и 412 (10,1%) в Бразилии). Из них пациенты в возрасте 56-69 лет - 974 человек, от 70 лет и старше -

444 человек. Вакцина имела хорошие профили безопасности. Однако оценить эффективность вакцины в возрастных группах старше 56 лет, по мнению авторов исследования, не представлялось возможным из-за недостаточного количества данных (Voysey M. 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. *Lancet*. 2021 Jan 9;397(10269):99-111).

Исследовательские группы Johnson and Johnson и Janssen Pharmaceutical в сотрудничестве с Медицинским центром Beth Israel Deaconess разработали вакцину Ad26.COV2.S. Активным компонентом данной вакцины является рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека 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 опубликованы результаты фазы 1-2b клинического исследования. В данное исследование была включена когорта участников в возрасте от 18 до 55 лет и когорта участников старше 65 лет. Результаты исследования показали, что у 90% участников независимо от возрастной группы на 29 день после 1 дозы вакцины можно было детектировать вируснейтрализующие антитела. К 57 дню, вируснейтрализующие антитела детектировали у всех вакцинированных добровольцев. Введение второй дозы вакцины обеспечило увеличение титра антител в 2,6-2,9 раза (Sadoff J. 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. Epub ahead of print. PMID: 33440088.). Данное решение было выбрано авторами за прототип. Недостатком прототипа является то, что после первого введения вакцины возможно образование антител к векторной части экспрессионного вектора, которые при последующем введении будут уменьшать эффективность вакцинации.

Таким образом, в области техники существует потребность в средстве, которое является безопасным и способно индуцировать иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2 у пожилых людей и/или пациентов с хроническими заболеваниями.

Осуществление изобретения

Технической задачей заявленного изобретения является создание средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у лиц в возрасте 60 и старше, а также имеющих хронические заболевания.

Технический результат заключается в создании безопасного и эффективного средства, которое обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у лиц в возрасте 60 и старше, а также имеющих хронические заболевания.

С возрастом происходит старение иммунной системы, которое характеризуется снижением качественных и количественных характеристик иммунного ответа, которые могут повлиять на профиль безопасности и эффективности разрабатываемых вакцин.

Количественные изменения характеризуются снижением количества наивных Т-лимфоцитов, а также изменением соотношения CD4⁺:CD8⁺ клеток, главным образом, из-за значительного уменьшения количества CD8⁺ Т-лимфоцитов. Старение также приводит к уменьшению репертуара Т-клеточных рецепторов, и в целом снижает выживаемость Т-лимфоцитов. Качественные изменения включают преимущественное производство короткоживущих эффекторных Т-клеток по сравнению с предшественниками клеток памяти, что приводит к нарушению иммунного ответа. Количество В-клеток не так сильно подвержено возрастным изменениям, однако из-за снижения экспрессии выбранных белков в пожилом возрасте вырабатывается меньше функциональных антител. Кроме возраста, на формирование иммунного ответа на вакцину могут влиять различные хронические заболевания, поскольку многие из них зачастую связаны с нарушениями в работе иммунной системы.

Таким образом, разработка средства для использования людьми пожилого возраста и/или с хроническими заболеваниями, обеспечивающего эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, включающую развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, является сложной научной задачей.

Указанный технический результат достигается тем, что предложено применение средства, 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, и/или 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания.

Также предложено применение средства, содержащего 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 содержащего 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 или содержащее только компонент 2 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания.

Кроме того, предложено применение средства, содержащего 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 содержащего 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания.

При этом при применении средство вводят интраназально и/или внутримышечно.

Также при применении средства компоненты вводят последовательно с интервалом более 1 недели.

При этом при применении средство находится в жидкой или лиофилизированной форме.

Причем при применении жидкая форма средства содержит буферный раствор, мас. %:

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

При этом при применении восстановленная лиофилизированная форма средства 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.

Также при применении средства компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев жидкой формой разработанного средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %. Ось абсцисс - дни.

- - обозначен % пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначен % пролиферирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов по каждому добровольцу на 28 день.
- - обозначен % пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначен % пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных, отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Символ ****, обозначает статистически достоверную разницу между значениями 0 и 28 дня ($p < 0,001$, по критерию Манна-Уитни).

На фиг. 2 представлен прирост концентрации ИФН γ (в размах) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови после рестимуляции их S антигеном кононавируса до иммунизации (0 день) и через 28 день исследования, после последовательной иммунизации добровольцев возрастной группы старше 60 лет разработанным средством по варианту 1.

Ось ординат - концентрация ИФН γ (разы)

Ось абсцисс - дни.

● - обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день.

■ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Символ ****, обозначает статистически достоверную разницу между значениями 0 и 28 дня ($p < 0,001$, по критерию Манна-Уитни).

На фиг. 3 представлены результаты оценки гуморального иммунного ответа к антигену вируса SARS-CoV2 у добровольцев, иммунизированных жидкой формой разработанного средства по варианту 1.

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

Ось абсцисс - дни.

● - обозначены значения по каждому добровольцу.

Среднее геометрическое значение титра антител представлено в виде черной черты для каждой группы данных. Статистически достоверная разница между значениями на 21, 28 и 42 день обозначена скобкой, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

Реализация изобретения

Первым этапом в разработке средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 являлся выбор вакцинного антигена. В ходе работы был проведен литературный поиск, который показал, что наиболее перспективным антигеном для создания кандидатной вакцины является S белок коронавируса. Это трансмембранный гликопротеин I типа, который отвечает за связывание, слияние и проникновение вирусных частиц в клетку. Было показано, что он является индуктором нейтрализующих антител (Liang M et al, SARS patients-derived human recombinant antibodies to S and M proteins efficiently neutralize SARS-coronavirus infectivity. Biomed Environ Sci. 2005 Dec;18(6):363-74).

Для достижения максимально эффективной индукции иммунных реакций против S белка SARS-CoV-2 авторы разработали различные варианты экспрессионных кассет.

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 YL., Li YC, Jing CQ., Guo X., Shang XF., Zhao CP., Wang TY. Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells.//Scientific Reports - 2017. - Vol. 8. - P. 10416].

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

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

Для эффективной доставки гена S белка коронавируса SARS-CoV-2 в организм человека была выбрана векторная система на основе аденовирусов. Аденовирусные векторы обладают целым рядом преимуществ: они не способны размножаться в клетках человека, проникают как в делящиеся, так и неделящиеся клетки, способны индуцировать клеточный и гуморальный иммунный ответ, обеспечивают вы-

сокий уровень экспрессии целевого антигена.

Авторы разработали варианты средства, содержащие два компонента, а также варианты средств, содержащие один компонент на основе аденовирусов различных серотипов. Таким образом, иммунный ответ на векторную часть аденовируса, который может возникать после введения первого компонента средства или однокомпонентного средства, в дальнейшем не бустится и не влияет на генерацию антиген-специфических иммунных ответов против вакцинного антигена в случае использования двухкомпонентного средства или при необходимости повторного введения однокомпонентного средства, так как в последнем случае может быть введено средство на основе иного аденовируса.

Кроме того, разработанные средства расширяют арсенал средств для индукции иммунного ответа против коронавируса SARS-CoV-2, что обеспечит преодоление трудностей, связанных проблемой наличия у части населения предсуществующего иммунного ответа к некоторым серотипам аденовирусов.

Таким образом, в результате проведенной работы были разработаны следующие варианты средств.

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

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

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

При этом компоненты средства находятся в индивидуальных упаковках.

Также авторами изобретения были разработаны жидкая и лиофилизированная формы средства. Кроме того, авторами изобретения были подобраны варианты буферного раствора, которые позволяют хранить разработанное средство как в замороженном виде при температуре ниже -18°C, так и в виде лиофилизата при температуре от +2 до +8°C.

Также был разработан способ применения средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или с хроническими заболеваниями, путем его введения в организм в эффективном количестве.

Кроме того, средство, в том числе состоящее из одного компонента, может применяться однократно.

Средство из двух компонентов может применяться последовательно с интервалом не менее 1 недели.

Средство может применяться интраназально и/или внутримышечно.

Для ревакцинации, может быть, использовано любое из предложенных средств, независимо от того, каким средством проводили вакцинацию.

Осуществление изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1.

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

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

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

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

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

Кроме того, авторами было разработано несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

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

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

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

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

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

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

Пример 2.

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

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

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

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

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

3. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с

экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad26-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы средства.

4. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей CAG промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 2 (Ad26-CAG-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad26-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для жидкой формы средства.

6. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus26-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области, а область ORF6-Ad26 заменена на ORF6-Ad5 с экспрессионной кассетой, содержащей EF1 промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 3 (Ad26-EF1-S-CoV2) в буферном растворе для лиофилизированной формы средства.

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

Пример 3.

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

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pSim25-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса обезьян 25-го серотипа (два плеча гомологии). Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса обезьян 25-го серотипа (от левого инвертированного концевой повтора до E1-области) и последовательность от конца E1-области до pIva2 белка. Второе плечо гомологии содержит последовательность конца генома аденовируса, включая правый инвертированный концевой повтор. Синтез конструкции pSim25-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

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

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pSim25-dlE1 была удалена E3 область генома аденовируса (3921 п.о. от начала гена 12,5K до гена 14,7K) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате была получена плазмидная конструкция pSim25-null, кодирующая полный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делецией E1 и E3-областей. В качестве материнской последовательности simian adenovirus 25-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 6.

Кроме того, авторы разработали несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

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

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

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

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

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

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

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

Пример 4.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Пример 5.

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

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

Выделенную из вирионов ДНК аденовируса человека 5-го серотипа смешивали с pAd5-Ends. В результате гомологичной рекомбинации между pAd5-Ends и вирусной ДНК была получена плаزمида pAd5-dlE1, несущая геном аденовируса человека 5-го серотипа с делетированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd5-dlE1 была удалена E3 область генома аденовируса (2685 п.о. от конца гена 12,5K до начала последовательности U- exon) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате этого был получен рекомбинантный плазмидный вектор pAd5-too-null на основе генома аденовируса человека 5-го серотипа с делецией E1 и E3 областей генома. В качестве материнской последовательности human adenovirus 5-го серотипа была использована последовательность SEQ ID NO: 7.

Кроме того, авторы разработали несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

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

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

и сигнала полиаденилирования;

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

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

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

На четвертом этапе плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-GAC-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2 гидролизовали специфической эндонуклеазой рестрикции для удаления векторной части. Полученным препаратом ДНК трансфицировали клетки культуры HEK293. Полученный материал был использован для накопления препаративных количеств рекомбинантного аденовируса.

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

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

Пример 6.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Пример 7.

Получение буферного раствора.

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

Авторами изобретения был подобран состав буферного раствора, обеспечивающий стабильность рекомбинантных аденовирусных частиц.

Данный раствор включает следующее.

1. Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), который необходим для поддержания pH раствора.
2. Хлорид натрия, который добавляют для достижения необходимой ионной силы и осмолярности.
3. Сахарозу, которая используется в качестве криопротектора.
4. Магния хлорида гексагидрат, который необходим в качестве источника двухвалентных катионов.
5. ЭДТА, который используется в качестве ингибитора свободно-радикального окисления.
6. Полисорбат-80, который используется в качестве поверхностно-активного вещества.
7. Этанол 95%, который применяют в качестве ингибитора свободно-радикального окисления.
8. Воду, которая используется в качестве растворителя.

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

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

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

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

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

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав средства. Полученные средства хранили при температуре -18 и -70°C в течение 3 месяцев, затем размораживали и оценивали изменение титра рекомбинантных аденовирусов.

Таблица 1

Состав экспериментальных буферных растворов для жидкой формы средства

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

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

Таким образом, разработанный буферный раствор для жидкой формы средства обеспечивает стабильность всех компонентов разработанного средства в следующем диапазоне действующих веществ (мас.%):

Трис: от 0,1831 масс. % до 0,3432 масс. %;

Хлорид натрия: от 0,3313 масс. % до 0,6212 масс. %;

Сахароза: от 3,7821 масс. % до 7,0915 масс. %;

Магния хлорида гексагидрат: от 0,0154 масс. % до 0,0289 масс. %;

ЭДТА: от 0,0029 масс. % до 0,0054 масс. %;

Полисорбат-80: от 0,0378 масс. % до 0,0709 масс. %;

Этанол 95%: от 0,0004 масс. % до 0,0007 масс. %;

Растворитель: остальное.

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

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

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

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

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

Таблица 2

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 масс. % до 0,0338 масс. %;

Хлорид натрия: от 0,1044 масс. % до 0,1957 масс. %;

Сахароза: от 5,4688 масс. % до 10,2539 масс. %;

Магния хлорида гексагидрат: от 0,0015 масс. % до 0,0028 масс. %;

ЭДТА: от 0,0003 масс. % до 0,0005 масс. %;

Полисорбат-80: от 0,0037 масс. % до 0,0070 масс. %;

Растворитель: остальное.

Пример 8.

Определение эффективности иммунизации животных старшего возраста 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 гликопротеина SARS-CoV-2 через 21 день после введения средства лабораторным животным.

В эксперименте использовались млекопитающие - мыши линии C57/B16, самки, 20 месяцев. Все животные были разделены на 43 группы по 3 животных, которым внутримышечно вводили либо компонент 1 средства в дозе 10^{11} вирусных частиц/100 мкл, а затем с интервалом в 2 недели компонент 2 в дозе 10^{11} вирусных частиц/100 мкл, либо только компонент 1 в дозе 10^{11} вирусных частиц/100 мкл, либо только компонент 2 в дозе 10^{11} вирусных частиц/100 мкл. Таким образом, были получены следующие группы животных:

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

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

- 36) Ad5- CAG -S-CoV2;
- 37) Ad5-EF1-S-CoV2;
- 38) Ad26-null;
- 39) simAd25-CMV-S-CoV2;
- 40) simAd25- CAG -S-CoV2;
- 41) simAd25-EF1-S-CoV2;
- 42) simAd25-null;
- 43) фосфатно-солевой буфер.

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

- 1) Антиген адсорбировали на лунках 96-луночного планшета в течение 16 ч при температуре +4°C.
- 2) Далее для избавления от неспецифического связывания осуществлялась "забивка" планшета 5% молоком, растворенном в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Методом 2-х кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.
- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 ч при 37°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 белку S в сыворотке крови мышей
(среднее геометрическое значение титра антител)

№	Название группы животных	Титр антител
1	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	24834
2	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	24834
3	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	24834
4	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	24834
5	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	28526
6	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	28526
7	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	24834
8	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	24834
9	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	28526
10	Ad26- null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2)	0
11	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	37641
12	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	49667

13	Ad26-CMV-S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S -CoV2 (компонент 2)	37641
14	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	37641
15	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S -CoV2 (компонент 2)	37641
16	Ad26- CAG -S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	37641
17	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	49667
18	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), simAd25-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	37641
19	Ad26- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), simAd25-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	37641
20	Ad26- null (компонент 1), simAd25-null (компонент 2)	0
21	Ad25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	28526
22	simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	28526
23	simAd25-CMV-S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	32768
24	simAd25- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	28526
25	simAd25- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	32768
26	simAd25- CAG -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	28526
27	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CMV-S-CoV2 (компонент 2)	28526
28	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-CAG-S-CoV2 (компонент 2)	32768

29	simAd25- EF1 -S-CoV2 (компонент 1), Ad5-EF1-S-CoV2 (компонент 2)	28526
30	simAd25- null (компонент 1), Ad5-null (компонент 2)	0
31	Ad26-CMV-S-CoV2;	8192
32	Ad26- CAG -S-CoV2;	9410
33	Ad26-EF1-S-CoV2;	10809
34	Ad26-null;	0
35	Ad5-CMV-S-CoV2;	24834
36	Ad5- CAG -S-CoV2;	24834
37	Ad5-EF1-S-CoV2;	21619
38	Ad26-null;	0
39	simAd25-CMV-S-CoV2;	18820
40	simAd25- CAG -S-CoV2;	18820
41	simAd25-EF1-S-CoV2;	18820
42	simAd25-null;	0
43	фосфатно-солевой буфер.	0

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

Пример 9.

Определение эффективности интраназальной иммунизации компонентами средства 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 жидкой 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 жидкой 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 жидкой 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 жидкой 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 жидкой 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 жидкой 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 $+4^{\circ}\text{C}$.

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 часа.

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

- 4) Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
- 5) Далее проводили инкубацию в течение 1 часа 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 часа при 37°C.
- 9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером
- 10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 мин добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

Титр антител определяли, как последнее разведение, в котором оптическая плотность раствора была достоверно выше, чем в группе отрицательного контроля. Полученные результаты (среднее геометрическое значение) представлены в табл. 4.

Таблица 4

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	4915,2
Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу	16384,0
simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/дозу	13107,2
Ad26-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу	14745,6
Ad5-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу	22937,6
simAd25-too-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{11}$ вч/дозу	16384,0
Буферный раствор	0

Как видно из полученных результатов интраназальная иммунизация животных компонентами разработанного фармацевтического средства 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 к вирусу SARS-CoV-2 путем его интраназального введения.

Пример 10.

Исследование безопасности разработанного средства на добровольцах старше 60 лет, имеющих хронические заболевания.

В исследование включили 110 добровольцев старше 60 лет. Предполагаемая схема иммунизации включала последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2). Один доброволец выбыл до вакцинации вследствие отзыва согласия, соответственно, 109 добровольцев начали исследуемую терапию. Еще один доброволец получил 1 компонент средства, но выбыл до введения 2 компонента. Соответственно, оба компонента средства по варианту 1 получили 108 добровольцев. В выборку полной популяции для анализа ($n=109$) вошли 56 (51,4%) мужчин и 53 (48,6%) женщины, 107 (98,2%) добровольцев европеоидной расы и 2 (1,8%) - монголоидной расы, средний возраст добровольцев (среднее (стандартное отклонение, SD)) составил 68,2 (5,96) лет, диапазон возраста от 60 до 85 лет. Индекс массы тела (среднее (SD)) составил 28,4 (4,11) кг/м².

Значимые заболевания в анамнезе присутствовали у 106 (97,2%), добровольцев, что ожидаемо для данной возрастной категории людей. В тройку наиболее частых сопутствующих заболеваний вошли гипертонзия, ожирение и дислипидемия.

Всего в ходе проведения данного исследования было зарегистрировано 35 нежелательных явлений (НЯ) у 17 (15,60%) добровольцев. Количество несерьезных НЯ составило 34 НЯ у 16 (14,68%) добровольцев. Одно НЯ у 1 (0,92%) добровольца -фибрилляция предсердий, было расценено как серьезное по критерию "требуется госпитализация или ее продления", связь с исследуемым препаратом оценивалась как сомнительная, СНЯ было средней степени тяжести, потребовало медикаментозной коррекции и завершилось выздоровлением.

По своей связи с приемом исследуемого препарата все зарегистрированные НЯ распределились следующим образом: 12 НЯ - как связанные с препаратом (определенная связь), 9 НЯ - вероятно связан-

ные, 4 НЯ - возможно связанные, 7 НЯ было с сомнительной связью с препаратом и для 3 НЯ связь отмечена как "неизвестно".

По степени тяжести все несерьезные НЯ были легкой степени тяжести (34 НЯ). Только одно НЯ было оценено как средней степени тяжести, к нему относилось вышеупомянутое СНЯ.

В табл. 5 отражены данные по количеству добровольцев с НЯ и числу НЯ по системно-органному классу MedDRA.

Таблица 5

Все нежелательные явления, зарегистрированные в ходе исследования (SOC MedDRA)

SOC MedDRA	Кол-во субъектов (%) Кол-во событий	
	Популяция для анализа (N=109)	
Любое НЯ	17 (15.60%)	35
Общие нарушения и реакции в месте введения	15 (13.76%)	28
Нарушения со стороны нервной системы	2 (1.83%)	2
Нарушения со стороны сердца	2 (1.83%)	3
Желудочно-кишечные нарушения	1 (0.92%)	1
Лабораторные и инструментальные данные	1 (0.92%)	1

Данные представлены в виде X (%) Y, где X(%) - количество добровольцев с хотя бы одним событием (процент по столбцу) и Y - количество событий.

Исходя из результатов исследования, можно сделать вывод, что выявленные в ходе исследования у добровольцев старше 60 лет НЯ характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов. Случаев развития НЯ тяжелой степени не было зарегистрировано.

Пример 11.

Определение эффективности иммунизации разработанным средством добровольцев старше 60 лет, имеющих хронические заболевания, по оценке напряженности клеточного иммунитета.

Цель данного эксперимента заключалась в оценке напряженности клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, путем определения доли пролиферирующих Т-лимфоцитов и определения секретируемого гамма-интерферона мононуклеарными клетками *in vitro* у добровольцев старше 60 лет, имеющих хронические заболевания, после их иммунизации различными вариантами разработанного средства.

В исследование включили 110 добровольцев старше 60 лет. Предполагаемая схема иммунизации включала последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2). Один доброволец выбыл до вакцинации вследствие отзыва согласия, соответственно, 109 добровольцев начали исследуемую терапию. Еще один доброволец получил 1 компонент средства, но выбыл до введения 2 компонента. Соответственно, оба компонента средства по варианту 1 получили 108 добровольцев. В выборку полной популяции для анализа (n=109) вошли 56 (51,4%) мужчин и 53 (48,6%) женщины, 107 (98,2%) добровольцев европеоидной расы и 2 (1,8%) - монголоидной расы, средний возраст добровольцев (среднее (стандартное отклонение, SD)) составил 68,2 (5,96) лет, диапазон возраста от 60 до 85 лет. Индекс массы тела (среднее (SD)) составил 28,4 (4,11) кг/м².

Значимые заболевания в анамнезе присутствовали у 106 (97,2%), добровольцев, что ожидаемо для данной возрастной категории людей. В тройку наиболее частых сопутствующих заболеваний вошли гипертонзия, ожирение и дислипидемия.

Перед иммунизацией, а также через 28 дней, у пациентов отбирали образцы крови, из которых выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколла (1,077 g/mL; ПанЭко). Далее выделенные клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE (InvivoGen, США) и высевали на лунки 96л планшета (2*10⁵ 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 из результата, полученного при анализе клеток рестимулированных антигеном S коронавируса. Полученные результаты представлены на фиг. 1.

Из данных результатов можно заключить, что двукратная иммунизация добровольцев старше 60 лет, разработанным средством формирует образование антигенспецифичных как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов на 28 день после введения первого компонента вакцины. Так, согласно медиане значений % пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов у добровольцев возрастной группы старше 60 лет был равен 0.7 (ДИ: 0.5-2.2) и 0.8 (ДИ: 0.3-2.2), соответственно. Статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов до иммунизации (0 день) и через 28 дней после введения первого компонента вакцины составила $p < 0,001$.

На втором этапе исследования проводили количественное определение концентрации гамма-интерферона (ИФН γ) в культуральной среде мононуклеарных клеток крови добровольцев старше 60 лет. Мононуклеарные клетки выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фикола (1,077 g/mL; ПанЭко) из образцов крови пациентов, полученных перед иммунизацией, а также через 28 дней после иммунизации разработанным средством. Клетки рестимулировали S белком SARS-CoV-2 и через 96 часов определяли концентрацию ИФН γ , с помощью набора "гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ" (БЕКТОР-БЕСТ, Россия) по инструкции производителя.

Прирост концентрации ИФН-гамма определяли по формуле $X = C_{st} / C_{int}$, где X - прирост концентрации ИФН-гамма (разы), C_{st} - концентрация ИФН γ в среде от стимулированных клеток (пг/мл), C_{int} - концентрация ИФН γ в среде от нестимулированных (интактных) клеток (пг/мл).

Результаты исследования приведены на фиг. 2.

Как видно из представленных результатов, иммунизация добровольцев старше 60 лет разработанным средством формирует образование антиген-специфичных интерферон-секретирующих клеток через 28 день после введения первого компонента. Так, согласно медиане значений прирост интерферона гамма у добровольцев возрастной группы старше 60 лет был равен 4.041 (ДИ: 2.106-6.802) на 28 день исследования. Статистически достоверная разница в приросте интерферона гамма до иммунизации (0 день) и через 28 дней после введения первого компонента вакцины составила $p < 0,001$. Полученные показатели свидетельствуют о выраженном формировании клеточного звена адаптивного иммунитета у добровольцев после проведенной иммунизации разработанным средством.

Таким образом, исходя из приведенных данных можно заключить, что иммунизация разработанным средством добровольцев старше 60 лет, в том числе имеющих хронические заболевания, способна вызывать формирование напряженного антиген-специфического клеточного звена иммунитета против вируса SARS-CoV-2, что подтверждается высокой степенью статистической достоверности в измеряемых параметрах до и после иммунизации.

Пример 12.

Определение эффективности иммунизации разработанным средством добровольцев старше 60 лет, имеющих хронические заболевания, по оценке напряженности гуморального иммунитета.

Цель данного эксперимента заключалась в оценке напряженности гуморального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 путем определения титра антител к RBD-домену S белка вируса SARS-CoV-2 у добровольцев старше 60 лет, имеющих хронические заболевания, после их иммунизации разработанным средством.

В исследование включили 110 добровольцев старше 60 лет. Предполагаемая схема иммунизации включала последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2) с интервалом 21 день. Один доброволец выбыл до вакцинации вследствие отзыва согласия, соответственно, 109 добровольцев начали исследуемую терапию. Еще один доброволец получил 1 компонент средства, но выбыл до введения 2 компонента. Соответственно оба компонента средства по варианту 1 получили 108 добровольцев.

Значимые заболевания в анамнезе присутствовали у 106, добровольцев, что ожидаемо для данной возрастной категории людей. В тройку наиболее частых сопутствующих заболеваний вошли гипертензия, ожирение и дислипидемия.

Оценка титра антиген-специфичного IgG была проведена у 108 добровольцев старше 60 лет в точках 21 и 28 дней и у 63 добровольцев на 42 день исследования.

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 промывочным 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 часа при температуре +37°C при перемешивании со скоростью 300 об/минуту. 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 минут в темном месте при температуре от +20°C. После этого останавливали реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента (1М 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 старше 60 лет после введения различных вариантов разработанного средства представлены на фиг. 3.

Как видно из представленных данных, рост титра антител, вызванного последовательной иммунизацией добровольцев разработанным средством, отмечается с увеличением дней после иммунизации. Антитела класса G, специфичные к RBD-домену S белка вируса SARS-CoV2 (титр выше, чем 1:50), на 21 день (перед введением 2 компонента) определялись у 53,2%, а на 28 день (7 дней после введения 2 компонента) у 98,1% добровольцев. При этом на 28 день (среднее геометрическое значение титра - 1719,9) отмечалось достоверное повышение титра антиген-специфичных IgG антител, по сравнению с 21 днем (среднее геометрическое значение титра - 33,8). В точке 42 дня, на момент подачи отчета, было исследовано 63 из 108 добровольцев. У исследованных добровольцев титр антител (среднее геометрическое значение титра - 2926,2), в сыворотке крови, достоверно повышался относительно значений титра у тех же добровольцев на 28 день исследования (среднее геометрическое значение титра - 1773,5). Стоит отметить, что на 42 день были обнаружены антиген-специфичные антитела класса G у 100% добровольцев, которые сдали кровь.

Резюмируя результаты, полученные при оценке титров антител в сыворотке крови добровольцев, можно сделать следующие выводы.

1. Однократная иммунизация 1 компонентом средства способна приводить к образованию антиген-специфичных IgG антител у 53,2% добровольцев в возрастной группе старше 60 лет на 21 день после иммунизации.

2. Иммунизация добровольцев в возрастной группе старше 60 лет обоими компонентами разработанного средства способна приводить к образованию антиген-специфичных IgG антител у 98,1% добровольцев старше 60 лет на 28 день после иммунизации.

3. При иммунизации добровольцев в возрастной группе старше 60 разработанным средством титры антител продолжают повышаться к 42-му дню после начала иммунизации. Полученные данные позволяют предполагать, что значения титров антиген-специфичных IgG антител продолжают повышаться после 42 дня от начала иммунизации.

Пример 13.

Оценка эффективности и безопасности иммунизации разработанным средством лиц, имеющих хронические заболевания.

В рамках клинических испытаний было проведено исследование разработанного средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2) на 35963 добровольцах. Из них 19866 человек были иммунизированы обоими компонентами средства (доза 1×10^{11} в.ч. внутримышечно в дельтовидную мышцу плеча, с интервалом в 21 день).

В исследование были включены добровольцы в возрасте от 18 до 92 лет. Средний возраст составил $45,3 \pm 12,0$ лет в группе I (ИП) и $45,3 \pm 11,9$ лет - в группе II (плацебо).

Анализ данных по сопутствующим заболеваниям показал, что у 3687 добровольцев (24,7%) в группе ИП и у 1235 добровольцев (25,3%) в группе плацебо были сопутствующие патологии (табл. 6).

Таблица 6

Данные наличию сопутствующих заболеваний у добровольцев

Наличие сопутствующих заболеваний	FAS			Старше 60 лет		
	Группа 1 (фарм. средство)	Группа 2 (Плацебо)	Суммарно	Группа 1 (фарм. средство)	Группа 2 (Плацебо)	Суммарно
Нет	11257 (75,3%)	3657 (74,8%)	14914 (75,2%)	857 (53,2%)	287 (54,0%)	1144 (53,4%)
Да	3687 (24,7%)	1235 (25,3%)	4922 (24,8%)	754 (46,8%)	246 (46,1%)	1000 (46,6%)
Суммарно	14944 (100,0%)	4892 (100,0%)	19836 (100,0%)	1611 (100,0%)	533 (100,0%)	2144 (100,0%)
P (χ^2)	0,420			0,774		

Результаты физического осмотра на визите скрининга показали наличие 823 отклонений, 42 из которых были клинически значимыми. Большая часть отклонений приходилась на отклонения сердечно-сосудистой системы (487 из 823 отклонений или 59,2%) (табл. 7).

Таблица 7

Наличие отклонений по результатам физического осмотра на визите скрининга

Орган/Система органов	FAS				P
	Группа 1 (ИП)		Группа 2 (Плацебо)		
	КНЗ	КЗ	КНЗ	КЗ	
Кожные покровы	12/14954 (0,1%)	0/14954 (0,0%)	2/4898 ($<0,1\%$)	1/4898 ($<0,1\%$)	0,174
Опорно-двигательная система	61/14951 (0,4%)	0/14951 (0,0%)	27/4897 (0,6%)	0/4897 (0,0%)	0,214
ЖКТ	73/148950 (0,5%)	2/14950 ($<0,1\%$)	29/4897 (0,6%)	1/4897 ($<0,1\%$)	0,432
Дыхательная система	17/14951 (0,1%)	0/14951 (0,0%)	8/4898 (0,2%)	1/4898 ($<0,1\%$)	0,165
Сердечно-сосудистая система	337/14952 (2,3%)	23/14952 (0,2%)	116/4896 (2,4%)	11/4896 (0,2%)	0,520
Органы мочевыделительной системы	52/14946 (0,4%)	1/14946 ($<0,1\%$)	16/4895 (0,3%)	1/4895 ($<0,1\%$)	0,617
Лимфоузлы	26/14938 (0,2%)	1/14938 ($<0,1\%$)	5/4892 (0,1%)	0/4892 (0,0%)	0,550

В настоящий момент доступны данные промежуточного анализа иммуногенности, который показал, что вакцина вызывает иммунный ответ у добровольцев. На 42-й день исследования в группе, получившей вакцину, среднее геометрическое титра антител составило 8996, уровень сероконверсии - 98,25%. В группе плацебо частота сероконверсии была значительно ниже и составила 14,91% ($p < 0,001$).

В данном клиническом исследовании также оценивалась безопасность разработанного средства. В

настоящий момент зарегистрировано 16795 случаев нежелательных явлений, развившихся у 7998 добровольцев. Из них 70 эпизодов были описаны как серьезные нежелательные явления, на основании того, что во всех случаях событие потребовало госпитализации участников исследования. Причинно-следственная связь данных явлений с исследуемым средством ни в одном случае не усматривается, что подтверждено Независимым Комитетом по Мониторингу Данных.

В целом, выявленные в ходе исследования нежелательные явления характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов. Не наблюдалось статистически значимой разницы между опытной и контрольной группой в частоте нежелательных явлений, не характерных для вакцинных препаратов. Наиболее частыми побочными эффектами были гриппоподобные заболевания и реакции в месте инъекций. В ходе исследования было подтверждено отсутствие сильных аллергических реакций, вызванных разработанным средством.

Промышленная применимость

Все приведенные примеры подтверждают эффективность средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и промышленную применимость.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение средства, содержащего 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, и/или содержащего 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, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания.

2. Применение средства, содержащего 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 содержащего 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, или содержащее только компонент 2 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания.

3. Применение средства, содержащего 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 содержащего 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, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у лиц старше 60 лет и/или имеющих хронические заболевания.

4. Применение по пп.1-3, где средство вводят интраназально и/или внутримышечно.

5. Применение по пп.1-3, где компоненты средства вводят последовательно с интервалом более 1 недели.

6. Применение по пп.1-3, отличающееся тем, что средство находится в жидкой или лиофилизированной форме.

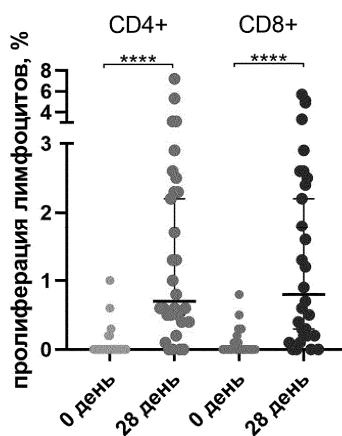
7. Применение по п.6, отличающееся тем, что жидкая форма средства содержит буферный раствор, мас. %:

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

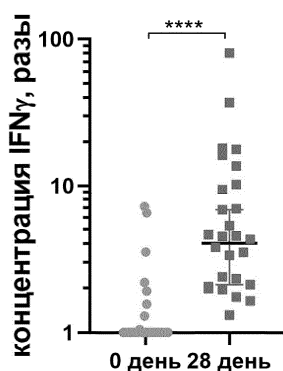
8. Применение по п.6, отличающееся тем, что восстановленная лиофилизированная форма средства содержит буферный раствор, мас. %:

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.

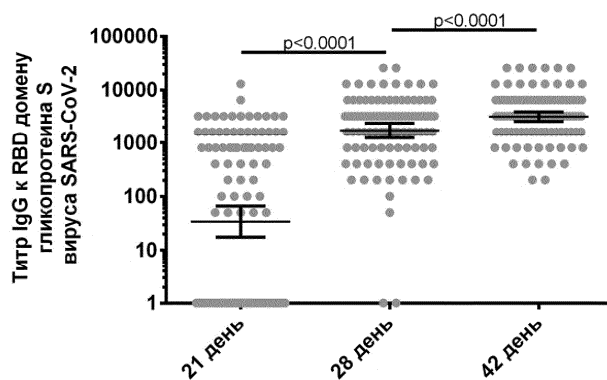
9. Применение по пп.1-3, отличающееся тем, что компонент 1 и компонент 2 находятся в разных упаковках.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2