

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043163**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.27

(21) Номер заявки
202290464

(22) Дата подачи заявки
2022.02.18

(51) Int. Cl. **G01N 33/53** (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61B 10/00 (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА SARS-COV-2 ДЛЯ РЕВАКЦИНАЦИИ НАСЕЛЕНИЯ (ВАРИАНТЫ)

(31) **2021104437**

(32) **2021.02.21**

(33) **RU**

(43) **2022.10.24**

(86) **PCT/RU2022/000046**

(87) **WO 2022/177466 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, Чернецов Владимир
Александрович, Крюков Евгений
Владимирович, Бабира Владимир
Федорович, Кутаев Дмитрий
Анатольевич, Логинова Светлана
Яковлевна, Народицкий Борис
Савельевич, Логунов Денис Юрьевич,
Гинцбург Александр Леонидович (RU)**

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

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

(57) Изобретение относится к области биотехнологии, иммунологии и вирусологии и предназначено для ревакцинации населения против заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2. Для этого применяют средство, которое содержит 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 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. Также применяют средство, которое содержит 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 содержит компонент 2, представляющий собой средство в

B1**043163****043163****B1**

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 содержит только компонент 2. Также применяют средство, которое содержит 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 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. Изобретение позволяет создать безопасные и эффективные средства, обеспечивающие продление поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2.

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии. Предложено применение средств для ревакцинации населения против заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

Уровень техники

Коронавирусы - это большое семейство вирусов, вызывающих широкий спектр заболеваний у человека и животных. В конце 2019 года мир столкнулся с новым зоонозным бета-коронавирусом SARS-CoV-2, который вызвал вспышку коронавирусной инфекции (COVID-19) в г. Ухань (Китайская Народная Республика (КНР)). 11 марта 2020 года Всемирная Организация Здравоохранения объявила, что распространение нового коронавируса в мире приобрело характер пандемии. По состоянию на 1 февраля 2021 года, в мире было зарегистрировано свыше 100 млн случаев заболевания COVID-19; более 2 млн человек скончалось.

К наиболее распространенным симптомам COVID-19 относятся повышение температуры тела, сухой кашель, одышка, утомляемость. Реже встречаются - боль в горле, в суставах, насморк, головная боль. При этом заболевание может протекать как в легкой, так и в тяжелой формах. Факторами риска являются пожилой возраст и наличие хронических заболеваний.

В результате перенесенного заболевания формируется как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. CD8⁺ и CD4⁺ Т клетки, специфичные к SARS-CoV-2, обнаруживаются у 70% и 100% пациентов, выздоравливающих после COVID-19, соответственно. Главной мишенью для Т-лимфоцитов является S белок SARS-CoV-2. Также обнаруживаются Т-лимфоциты специфичные к М и N белкам коронавируса и, в меньшем количестве, специфичные к nsp3, nsp4, ORF3a и ORF8 SARS-CoV-2. Иммунный ответ поляризован в сторону Th1 (Grifoni et al., Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. Cell. 2020 Jun 25; 181(7): 1489-1501.e15).

Гуморальный иммунный ответ опосредуется антителами, которые направлены в основном на поверхностный S белок коронавируса. Было показано, что RBD домен гликопротеина S, который отвечает за связывание с рецептором ACE-2 на клетках человека, является основной мишенью вируснейтрализующих антител. Кинетика гуморального иммунного ответа против SARS-CoV-2 характеризуется устойчивой сероконверсией (IgM и IgG) через 7-14 дней после появления симптомов. Титры IgG увеличиваются в течение первых 3 недель и начинают снижаться к 8 неделям (Adams ER, Ainsworth M, Anand R. Antibody testing for COVID-19: a report from the National COVID Scientific Advisory Panel. medRxiv. 2020). Также было показано, что титры IgG коррелируют с тяжестью заболевания. (Gregory A Poland et al. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. Lancet. 2020 14-20 November; 396(10262): 1595-1606).

Научные данные, накопленные к настоящему времени, свидетельствуют о том, что естественный иммунитет к COVID-19, который человек получает в результате перенесенного заболевания, является недолговременным. (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/facts.html>). Об этом свидетельствуют наблюдаемые тенденции по снижению уровня антител, а также случаи повторного заражения коронавирусом (Akiko Iwasaki. What reinfections mean for COVID-19. Lancet Infect Dis. 2021 Jan; 21(1): 3-5.)

Наиболее эффективным способом профилактики инфекционных заболеваний является вакцинация. К настоящему времени разработано несколько вакцин против COVID-19, в которых используются различные антигены коронавируса.

1) Вакцины, содержащие в качестве антигена цельный вирион.

Известно 4 кандидатные инактивированные вакцины, разработанные в КНР. В данный момент 3 вакцины (Sinovac совместно с Национальным институтом по контролю и профилактике инфекционных заболеваний; Sinopharm совместно с Уханьским институтом биологических продуктов и с Уханьским институтом вирусологии Китайской академии наук; Sinopharm совместно с Пекинским институтом биологических продуктов и с Институтом контроля и профилактики вирусных заболеваний) проходят фазу III клинических исследований, а одна вакцина (Институт медицинской биологии Китайской академии медицинских наук) проходит фазу I/II клинических исследований.

(Zhang Y et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2

vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-

controlled, phase 1/2 clinical trial. Lancet Infect Dis. 2021 Feb;21(2):181-192; Xia S et al.

Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA*. 2020 Sep 8;324(10):951-960. Xia S et al Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2021 Jan;21(1):39-51. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30831-8. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33069281; PMCID: PMC7561304. Che Y et al. Randomized, double-blinded and placebo-controlled phase II trial of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 9)

2) Вакцины, в которых антигеном является полноразмерный S белок.

Известно 3 вакцины на основе аденовирусов различных серотипов, которые экспрессируют ген полноразмерного S белка вируса SARS-CoV-2. CanSino Biological Inc. и Пекинский институт биотехнологии разработали вакцину на основе аденовируса человека 5 серотипа; Оксфордский университет, AstraZeneca - вакцину на основе аденовируса шимпанзе, ФГБУ "НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России - вакцину на основе аденовирусов человека 26 серотипа и 5 серотипа. Кроме того, известна ДНК вакцина, содержащая ген полноразмерного S белка вируса SARS-CoV-2, разработанная Inovio Pharmaceuticals совместно с Международным институтом вакцин.

(Zhu F et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*. 2020 Jun 13;395(10240):1845-1854. van Doremalen N et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*. 2020 Oct;586(7830):578-582. Logunov DY et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020 Sep 26;396(10255):887-897).

3) Вакцины, в которых антигеном является полноразмерный S белок с двумя заменами пролина (K986P и V987P).

Известны две вакцины на основе липидных наночастиц, включающих мРНК, кодирующую S белок SARS-CoV-2, с заменами пролина (Moderna совместно с Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний; BioNTech совместно с Fosun Pharma и Pfizer). Также известна белковая субъединичная вакцина, разработанная Novavax, антигеном в данной вакцине является полноразмерный S белок SARS-CoV-2 с двумя заменами пролина (K986P и V987P) и тремя мутациями в сайте расщепления фурином (R682Q, R683Q и R685Q). Кроме того, Janssen Pharmaceutical Companies разработала вакцину на основе аденовируса человека 26 серотипа, экспрессирующего полноразмерный S белок SARS-CoV-2 с двумя заменами пролина (K986P и V987P) и двумя мутациями в сайте расщепления фурином (R682S и R685G).

(L. Baden et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*. 2020 Dec 30; L. Jackson An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2020 Nov 12;383(20):1920-1931. Keech C et al. Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N Engl J Med*. 2020 Dec 10; Tostanoski L et al. Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. *Nat Med*. 2020 Nov;26(11):1694-1700. doi: 10.1038/s41591-020-1070-6. Epub 2020 Sep 3).

4) Вакцины, в которых антигеном является RBD домен S белка.

Известна белковая субъединичная вакцина, содержащая RBD-димер (остатки 319-537 в виде тандемного повтора), разработанная Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical совместно с Институтом микробиологии Китайской академии наук. Также известна вакцина на основе липидных наночастиц, включающих мРНК, кодирующую RBD-тример (тримеризованный добавлением фолдонового домена фибрина T4).

(BioNTech совместно с Fosun Pharma и Pfizer) (Mulligan M. et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*. 2020 Oct;586(7830):589-593. Dai L. A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*. 2020 Aug 6;182(3):722-733.e11. Dai L et al. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021 Feb;21(2):73-82).

В настоящий момент в мире разрешены к применению 8 вакцин против COVID-19. Результаты клинических исследований показали, что иммунизация данными вакцинами формирует у человека как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ к вирусу SARS-CoV-2. Однако, на сколько продолжительным окажется поствакцинальный протективный иммунитет для каждого типа вакцин пока не установлено. По мнению экспертов, она может варьироваться от человека к человеку и по различным оценкам составлять от 1 до 2 лет. Такие сроки определяют необходимость в разработке средств специфической профилактики COVID, применяемых для ревакцинации человека.

Между тем, выбор средства для ревакцинации является непростой задачей.

При разработке средства для специфической профилактики, применяемого для ревакцинации, следует помнить эффекты, возникающие при повторной иммунизации человека, оказывают при этом существенные воздействие на итоговую структуру противоиного иммунитета, включая его протективные свойства.

Известно, что при использовании вакцин, содержащих большое количество антигенов в своем составе (пример, инактивированные вакцины) иммунный ответ формируется на каждый антиген. Однако в этом случае напряженность иммунитета в отношении выбранного антигена будет ниже, по сравнению с теми вакцинными препаратами, имеющими в своей структуре только один этот антиген (эффект "размывания" иммунного ответа). Кроме того, некоторые антигены в структуре патогена могут быть непротективными, формирование клонов Т и В клеток на такие антигены не будет вносить свой вклад в общую протективность иммунитета, мешая образованию важных для защиты клонов клеток.

На основании вышесказанного, можно заключить, что для ревакцинации наиболее перспективными являются те вакцины, которые содержат в своем составе один или несколько белков с выраженными протективными свойствами. В таком случае в процессе ревакцинации будет происходить дополнительное стимулирование (бустирование) и не менее важное фокусирование иммунного ответа на наиболее важных для защиты человека антигенных детерминантах патогена, независимо от проведенной первичной иммунизации.

Из уровня техники не известно средств для ревакцинации против коронавирусной инфекции.

Техническое решение согласно патенту РФ №2731342 (опубликован 01.09.2020) выбрано авторами заявляемого изобретения за прототип. Из данного патента известны варианты 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.

Недостатком данного средства является то, что не описано его использование для продления поствакцинального иммунитета.

Таким образом, в уровне техники существует потребность в разработке средства, которое может применяться для ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2.

Осуществление изобретения

Технической задачей заявленной группы изобретений является разработка средств, обеспечивающих пролонгирование поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2.

Технический результат заключается в создании безопасного и эффективного средства, обеспечивающего продление поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2.

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 ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 для ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

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 содержащего только компонент 2 для ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

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 ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

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

Причем буферный раствор для жидкой формы средства содержит, 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.

Также 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.

Кроме того, 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 CD8⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

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

- - обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день.
- ▲ - обозначены значения по каждому добровольцу 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. 2 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев жидкой формой разработанным средством по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

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

- - обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день.
- ▲ - обозначены значения по каждому добровольцу 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. 3 представлены результаты оценки эффективности иммунизации добровольцев лиофилизированной формой разработанного средства по варианту 1 по оценке доли пролиферирующих CD8⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

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

- - обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день.
- ▲ - обозначены значения по каждому добровольцу 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 1 по оценке доли пролиферирующих CD4⁺ лимфоцитов, рестимулированных S антигеном SARS-CoV-2.

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

- - обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день.
- ▲ - обозначены значения по каждому добровольцу 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. 5 Представлен прирост концентрации ИФН γ (в разгах) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев, иммунизированных жидкой формой разработанного средства по варианту 1, после рестимуляции их S антигеном SARS-CoV-2 до иммунизации (0 день) и через 14 и 28 день исследования.

Ось ординат - увеличение концентрации гамма-интерферона, разы. Ось абсцисс - дни.

- - обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день.
- ▲ - обозначены значения по каждому добровольцу 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 *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 6 представлен прирост концентрации ИФН γ (в разгах) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев, иммунизированных лиофилизированной формой разработанного средства по варианту 1, после рестимуляции их S антигеном SARS-CoV-2 до иммунизации (0 день) и через 14 и 28 день исследования.

Ось ординат - увеличение концентрации гамма-интерферона, разы. Ось абсцисс - дни.

- - обозначены значения по каждому добровольцу на 0 день.
- - обозначены значения по каждому добровольцу на 14 день.
- ▲ - обозначены значения по каждому добровольцу на 28 день.

Точками обозначены значения по каждому добровольцу, участвующему в исследовании. 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 *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни.

На фиг. 7 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.



Δ - данные по каждому добровольцу.

На фиг. 8 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.



Δ - данные по каждому добровольцу.

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 Р-актина курицы и химерный интрон (Р-актина курицы и Р-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 высокий уровень экспрессии целевого антигена.

Авторы разработали варианты средства, содержащие два компонента на основе аденовирусов различных серотипов. Таким образом, иммунный ответ на векторную часть аденовируса, который может

возникать после введения первого компонента средства, в дальнейшем не бустится и не влияет на генерацию антиген-специфических иммунных ответов против вакцинного антигена.

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 предрасполагающего иммунного ответа к некоторым серотипам аденовирусов.

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

1. Средство для ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом 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 делегированы 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 ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом 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 ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом 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.

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 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 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 плазида pAd26-d1E1, несущая геном аденовируса человека 26-го серотипа с делегированной E1-областью.

Затем, в полученной плазмиде pAd26-d1E1 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 плазида pAd26-d1E1-ORF6-Ad5.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd26-d1E1-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 линейаризовали 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 гидролизировали 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 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 лиофилизированной формы средства.

5. 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 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 adenovirus 26-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-d1E1, несущая геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делегированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pSim25-d1E1 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 гидролизуют 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 делегированы 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 делегированы 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 серотипа, в котором делегированы E1 и E3 области:

1. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делегированы 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 делегированы 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 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 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-d1E1, несущая геном аденовируса человека 5-го серотипа с делетированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd5-d1E1 была удалена E3 область генома аденовируса (2685 п.о. от конца гена 12,5K до начала последовательности U-хон) 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 гомологи, 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 делецией 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 гидролизировали 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 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 лиофилизированной формы средства.

5. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного human adenovirus 5-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 (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 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 (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:

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 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 сероти-

па с экспрессионной кассетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, 1×10^{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, 1×10^{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, 1×10^{11} вирусных частиц.

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав средства. Полученные фармацевтические средства хранили при температуре -18°C 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°C 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	0,1831-0,3432
хлорид натрия	0,3313-0,6212
сахароза	3,7821-7,0915
магния хлорида гексагидрат	0,0154-0,0289
ЭДТА	0,0029-0,0054
полисорбат-80	0,0378-0,0709

этанол 95% 0,0004-0,0007
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, 1×10^{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, 1×10^{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, 1×10^{11} вирусных частиц.

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав средства. Полученные фармацевтические средства хранили при температуре +2 и +8°C в течение 3 месяцев, затем размораживали и 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°C 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, мас. %:

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

Пример 8.

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

В рамках клинических исследований разработанного средства по варианту 1 было проведено исследование

дование напряженности клеточного иммунитета.

В исследовании принимало участие 40 добровольцев, которые были иммунизированы:

1) Компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 жидкой формы разработанного средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек).

2) Компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 лиофилизированной формы разработанного средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек).

На 0 день (до введения препарата), 14 день и 28 день у добровольцев отбирали образцы крови, из которых выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколла. Далее выделенные клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE (Invivogen, США) и высевали на лунки планшета. 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 (BD Biosciences, клон SK7), anti-CD4 APC (BD Biosciences, клон SK3), anti-CD8 PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, клон SKI)). Пролиферирующие (с меньшим количеством красителя CFSE клеток) CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлюориметра BD FACS AriaIII (BD Biosciences, 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. 1, 2 (для жидкой формы вакцины), на фиг. 3, 4 (для лиофилизированной формы вакцины).

Количественное определение концентрации гамма-интерферона (ИФН γ) в культуральной среде мононуклеарных клеток крови человека через 72 ч после рестимуляции их S белком коронавируса, проводили с помощью набора "гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ" (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия) по инструкции производителя. Полученные данные представлены на фиг. 5 (для жидкой формы вакцины), на фиг. 6 (для лиофилизированной формы вакцины).

Результаты проведенного исследования показали, что рост напряженности клеточного иммунитета, вызванного последовательной иммунизацией добровольцев обеими формами средства по варианту 1, согласно медиане значений пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, отмечается с увеличением дней после иммунизации. В обеих 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 - $p < 0,001$.

Из результатов, представленных на фиг. 5, 6 можно заключить, что рост напряженности клеточного иммунитета, вызванного последовательной иммунизацией добровольцев обеими формами средства по варианту 1, согласно медиане прироста концентрации ИФН γ , отмечается с увеличением дней после иммунизации. Статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ до иммунизации (0 день) и через 14 дней после проведенной вакцинации составила $p < 0,001$. Максимальный прирост концентрации ИФН γ наблюдается на 28 день после иммунизации. Между 0 и 28 днем исследования наблюдается максимальная статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ - $p < 0,001$.

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

Пример 9.

Изучение иммуногенности разработанного средства путем оценки титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в крови добровольцев в различные сроки после вакцинации.

В исследовании принимало участие 40 добровольцев, которые были иммунизированы:

3) Компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 жидкой формы разработанного средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек).

4) Компонентом 1, а затем через 21 день компонентом 2 лиофилизированной формы разработанного средства по варианту 1 (компонент 1: Ad26-CMV-S-CoV2, компонент 2: Ad5-CMV-S-CoV2), доза 1×10^{11} вирусных частиц (20 человек).

На 14 день, 21 день, 28 день у добровольцев отбирали образцы крови, из которых выделяли сыворотку.

Титр антител к домену RBD S белка вируса SARS-CoV-2 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора "SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи". Анализ проводили согласно инструкции производителя.

Результаты анализа титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови добровольцев после введения жидкой формы препарата представлены на фиг. 7.

Результаты анализа титра антител к антигену вируса SARS-CoV-2 в сыворотки крови добровольцев после введения лиофилизированной формы препарата представлены на фиг. 8.

Как видно из представленных данных, иммунизация добровольцев разработанным средством как в жидкой форме, так и в лиофилизированной форме позволяет сформировать выраженный (статистически достоверно отличный от показателей контрольной не иммунизированной группы животных) 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 10.

Применение разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации модельной субъединичной вакциной.

Целью данной работы являлось определение возможности использовать разработанное средство для ревакцинации животных, иммунизированных модельной субъединичной вакциной.

В данном эксперименте были использованы мыши линии Balb/c, самки, весом 18г. На первом этапе животные были иммунизированы модельной вакциной, состоящей из S белка вируса SARS-CoV-2 (10 мкг/мышь) в фосфатно-солевом буфере и гидроксида алюминия (100 мкг/мышь). Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 21 день. На 180 день эксперимента проводили повторную иммунизацию различными вариантами разработанного средства. В случае двухкомпонентного средства: 1 компонент (10^{10} в.ч./мышь) вводили на 180 день эксперимента, а второй компонент (10^{10} в.ч./мышь) вводили на 201 день. В случае однокомпонентного средства иммунизацию проводили на 201 день эксперимента. В результате были получены следующие опытные и контрольные группы животных:

- 1) Модельная вакцина/Ad26- CMV-S-CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2
- 2) Модельная вакцина/Ad26- CAG-S-CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2
- 3) Модельная вакцина/Ad26- EF1-S-CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2
- 4) Модельная вакцина/Ad26- CMV-S-CoV2/ simAd25- CMV-S-CoV2
- 5) Модельная вакцина/Ad26- CAG-S-CoV2/ simAd25- CAG -S-CoV2
- 6) Модельная вакцина/Ad26- EF1-S-CoV2/ simAd25- EF1-S-CoV2
- 7) Модельная вакцина/simAd25- CMV-S-CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2
- 8) Модельная вакцина/simAd25- CAG-S-CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2
- 9) Модельная вакцина/simAd25- EF1-S-CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2
- 10) Модельная вакцина/Ad26- CMV-S-CoV2
- 11) Модельная вакцина/Ad26- CAG-S-CoV2
- 12) Модельная вакцина/Ad26- EF1-S-CoV2
- 13) Модельная вакцина/Ad5- CMV-S-CoV2
- 14) Модельная вакцина/Ad5- CAG-S-CoV2
- 15) Модельная вакцина/Ad5- EF1-S-CoV2
- 16) Модельная вакцина/simAd25- CMV-S-CoV2
- 17) Модельная вакцина/simAd25- CAG-S-CoV2
- 18) Модельная вакцина/simAd25- EF1-S-CoV2

На 21 день, 180 день и 222 день эксперимента у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител к SARS-CoV-2 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 блокирующим буфером в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Сыворотки иммунизированных мышей разводили в 100 раз, а затем делали серию 2-кратных 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 белку S в сыворотке крови мышей (среднее геометрическое значение титра антител)

		Дни от начала эксперимента		
		21 день	180 день	222 день
1	Модельная вакцина/ Ad26- CMV-S-CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2	1393	606	117627
2	Модельная вакцина/ Ad26- CAG-S-CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2	1600	528	89144
3	Модельная вакцина/ Ad26- EF1-S-CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2	1213	696	102400
4	Модельная вакцина/ Ad26- CMV-S-CoV2/ simAd25- CMV-S-CoV2	1600	606	58813
5	Модельная вакцина/ Ad26- CAG-S-CoV2/ simAd25- CAG -S-CoV2	1393	528	67559
6	Модельная вакцина/ Ad26- EF1-S-CoV2/ simAd25- EF1-S-CoV2	1393	528	58813
7	Модельная вакцина/ simAd25- CMV-S- CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2	1600	606	89144
8	Модельная вакцина/ simAd25- CAG-S- CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2	1213	606	89144
9	Модельная вакцина/ simAd25- EF1-S- CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2	1393	696	102400
10	Модельная вакцина/ Ad26- CMV-S-CoV2	1600	528	16890
11	Модельная вакцина/ Ad26- CAG-S-CoV2	1600	528	19401
12	Модельная вакцина/ Ad26- EF1-S-CoV2	1600	696	19401
13	Модельная вакцина/ Ad5- CMV-S-CoV2	1600	606	51200
14	Модельная вакцина/ Ad5- CAG-S-CoV2	1600	606	44572
15	Модельная вакцина/ Ad5- EF1-S-CoV2	1600	528	51200
16	Модельная вакцина/ simAd25- CMV-S- CoV2	1600	606	33779
17	Модельная вакцина/ simAd25- CAG-S- CoV2	1393	528	38802
18	Модельная вакцина/ simAd25- EF1-S- CoV2	1600	528	33779

Как видно из представленных данных после иммунизации мышей модельной субъединичной вакциной у всех животных вырабатываются антитела, через 180 дней титр антител снижается, однако ревакцинация животных различными вариантами разработанного средства приводит к многократному повышению титра антител в крови. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают возможность использования разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2.

Пример 11.

Применение разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета к вирусу

SARS-CoV-2 после иммунизации модельной инактивированной вакциной.

Целью данной работы являлось определение возможности использовать разработанное средство для ревакцинации животных, иммунизированных модельной инактивированной вакциной.

В данном эксперименте были использованы мыши линии Balb/c, самки, весом 18г. На первом этапе животные были иммунизированы модельной вакциной, состоящей из вируса SARS-CoV-2, инактивированного формалином. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 21 день. На 180 день эксперимента проводили повторную иммунизацию различными вариантами разработанного средства. В случае двухкомпонентного средства: 1 компонент (10^{10} в.ч./мышь) вводили на 180 день эксперимента, а второй компонент (10^{10} в.ч./мышь) вводили на 201 день. В случае однокомпонентного средства иммунизацию проводили на 201 день эксперимента. В результате были получены следующие опытные и контрольные группы животных:

1. Модельная вакцина/Ad26- CMV-S-CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2
2. Модельная вакцина/Ad26- CAG-S-CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2
3. Модельная вакцина/Ad26- EF1-S-CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2
4. Модельная вакцина/Ad26- CMV-S-CoV2/ simAd25- CMV-S-CoV2
5. Модельная вакцина/Ad26- CAG-S-CoV2/ simAd25- CAG -S-CoV2
6. Модельная вакцина/Ad26- EF1-S-CoV2/ simAd25- EF1-S-CoV2
7. Модельная вакцина/simAd25- CMV-S-CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2
8. Модельная вакцина/simAd25- CAG-S-CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2
9. Модельная вакцина/simAd25- EF1-S-CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2
10. Модельная вакцина/Ad26- CMV-S-CoV2
11. Модельная вакцина/Ad26- CAG-S-CoV2
12. Модельная вакцина/Ad26- EF1-S-CoV2
13. Модельная вакцина/Ad5- CMV-S-CoV2
14. Модельная вакцина/Ad5- CAG-S-CoV2
15. Модельная вакцина/Ad5- EF1-S-CoV2
16. Модельная вакцина/simAd25- CMV-S-CoV2
17. Модельная вакцина/simAd25- CAG-S-CoV2
18. Модельная вакцина/simAd25- EF1-S-CoV2

На 21 день, 180 день и 222 день эксперимента у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител к SARS-CoV-2 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 блокирующим буфером в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Сыворотки иммунизированных мышей разводили в 100 раз, а затем делали серию 2-кратных 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. 4.

Таблица 4

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

		Дни от начала эксперимента		
		21 день	180 день	222 день
1	Модельная вакцина/ Ad26- CMV-S-CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2	303	200	135118
2	Модельная вакцина/ Ad26- CAG-S-CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2	348	152	117627
3	Модельная вакцина/ Ad26- EF1-S-CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2	264	174	155209
4	Модельная вакцина/ Ad26- CMV-S-CoV2/ simAd25- CMV-S-CoV2	303	115	58813
5	Модельная вакцина/ Ad26- CAG-S-CoV2/ simAd25- CAG -S-CoV2	264	174	77605
6	Модельная вакцина/ Ad26- EF1-S-CoV2/ simAd25- EF1-S-CoV2	303	174	67559
7	Модельная вакцина/ simAd25- CMV-S-CoV2/ Ad5- CMV-S-CoV2	264	115	135118
8	Модельная вакцина/ simAd25- CAG-S-CoV2/ Ad5- CAG -S-CoV2	264	174	117627
9	Модельная вакцина/ simAd25- EF1-S-CoV2/ Ad5- EF1-S-CoV2	303	115	117627
10	Модельная вакцина/ Ad26- CMV-S-CoV2	264	174	19401
11	Модельная вакцина/ Ad26- CAG-S-CoV2	348	132	19401
12	Модельная вакцина/ Ad26- EF1-S-CoV2	303	174	16890
13	Модельная вакцина/ Ad5- CMV-S-CoV2	303	132	58813
14	Модельная вакцина/ Ad5- CAG-S-CoV2	264	152	58813
15	Модельная вакцина/ Ad5- EF1-S-CoV2	348	174	51200
16	Модельная вакцина/ simAd25- CMV-S-CoV2	348	152	38802
17	Модельная вакцина/ simAd25- CAG-S-CoV2	264	152	44572
18	Модельная вакцина/ simAd25- EF1-S-CoV2	303	132	38802

Как видно из представленных данных после иммунизации мышей модельной инактивированной вакциной у всех животных вырабатываются антитела, через 180 дней титр антител снижается, однако ревакцинация животных различными вариантами разработанного средства приводит к многократному повышению титра антител в крови. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают возможность использования разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2.

Пример 12.

Применение разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации различными вариантами разработанного средства.

Целью данной работы являлось определение возможности использовать разработанное средство для ревакцинации животных, иммунизированных различными вариантами разработанного средства.

В данном эксперименте были использованы мыши линии Balb/c, самки, весом 18г. На первом этапе животные были иммунизированы различными однокомпонентными вариантами разработанного средства (10^{10} в.ч./мышь). Через 180 дней эксперимента проводили повторную иммунизацию различными двухкомпонентными вариантами разработанного средства. 1 компонент (10^{10} в.ч./мышь) вводили на 180 день эксперимента, а второй компонент (10^{10} в.ч./мышь) вводили на 201 день. В случае однокомпонентного средства иммунизацию проводили на 201 день эксперимента. В результате были получены следующие опытные и контрольные группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 4) Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 5) Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2
- 6) Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 7) simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 8) simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2
- 9) simAd25-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 10) Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2
- 12) Ad26-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2
- 13) Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2
- 14) Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2
- 15) Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2
- 16) simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2
- 17) simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2
- 18) simAd25-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2

На 21 день, 180 день и 222 день эксперимента у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител к SARS-CoV-2 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 блокирующим буфером в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Сыворотки иммунизированных мышей разводили в 100 раз, а затем делали серию 2-кратных 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 м 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)

		Дни от начала эксперимента		
		21 день	180 день	222 день
1	Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	2786	2111	204800
2	Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	2425	2425	155209
3	Ad26-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	2111	1838	178289
4	Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	29407	25600	155209
5	Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	33779	29407	178289
6	Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	38802	33779	155209
7	simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	12800	9701	155209
8	simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	14703	11143	178289
9	simAd25-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	16890	11143	155209
10	Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2	3200	2111	117627
11	Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2	2425	2111	102400
12	Ad26-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2	2425	2111	117627
13	Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2	25600	22286	102400
14	Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2	29407	25600	117627
15	Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2	38802	33779	102400
16	simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2	16890	12800	117627
17	simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2	16890	14703	117627
18	simAd25-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2	19401	16890	102400

Как видно из представленных данных после иммунизации мышей однокомпонентными вариантами разработанного средства у всех животных вырабатываются антитела, через 180 дней титр антител снижается, однако ревакцинация животных различными вариантами разработанного средства приводит к многократному повышению титра антител в крови. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают возможность использования разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2.

Пример 13.

Применение разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации различными вариантами разработанного средства.

Целью данной работы являлось определение возможности использовать разработанное средство для ревакцинации животных, иммунизированных различными вариантами разработанного средства.

В данном эксперименте были использованы мыши линии Balb/c, самки, весом 18г. На первом этапе животные были иммунизированы вариантами разработанного двухкомпонентного средства (10^{10} в.ч./мышь) с интервалом 21 день. На 180 день эксперимента проводили повторную иммунизацию различными вариантами разработанного однокомпонентного средства. В результате были получены следующие опытные и контрольные группы животных:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2
- 4) Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2
- 5) Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2
- 6) Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2
- 7) simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2
- 8) simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2
- 9) simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2
- 10) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 11) Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2
- 12) simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2
- 13) Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2

На 42 день, 180 день и 201 день эксперимента у животных отбирали кровь из хвостовой вены и выделяли сыворотку крови. Титр антител к SARS-CoV-2 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 блокирующим буфером в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
- 3) Сыворотки иммунизированных мышей разводили в 100 раз, а затем делали серию 2-кратных 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)

		Дни от начала эксперимента		
		21 день	180 день	222 день
1	Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	44572	38802	204800
2	Ad26-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	38802	33779	178289
3	Ad26-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	51200	38802	204800
4	Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	33779	29407	178289
5	Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	29407	25600	178289
6	Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	29407	25600	178289
7	simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	38802	33779	178289
8	simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2	38802	33779	204800
9	simAd25-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2	33779	33779	155209
10	Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2	44572	38802	204800
11	Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2	33779	29407	204800
12	Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2	38802	33779	204800
13	Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2	38802	33779	178289
14	Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2	44572	38802	204800
15	Ad26-CMV-S-CoV2, simAd25-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2	38802	33779	178289
16	simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad26-CMV-S-CoV2	51200	38802	204800
17	simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ Ad5-CMV-S-CoV2	33779	29407	178289
18	simAd25-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2/ simAd25-CMV-S-CoV2	29407	25600	178289

Как видно из представленных данных, после иммунизации мышей двухкомпонентными вариантами разработанного средства у всех животных вырабатываются антитела, через 180 дней титр антител снижается, однако ревакцинация животных различными вариантами разработанного средства приводит к многократному повышению титра антител в крови. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают возможность использования разработанного средства для продления поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, поставленная техническая задача, а именно создание средств, обеспечивающих пролонгирование поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2, достигнута, что подтверждается приведенными примерами.

Промышленная применимость

Все приведенные примеры подтверждают эффективность средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа, а также пролонгирование поствакцинального иммунитета против вируса SARS-CoV-2 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 ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

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 содержащего только компонент 2 для ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

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 ревакцинации против заболеваний, вызываемых вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

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

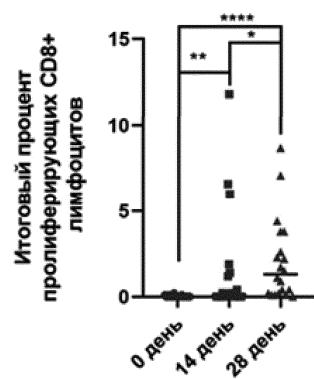
5. Применение по п.4, отличающееся тем, что буферный раствор для жидкой формы средства содержит, мас. %:

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

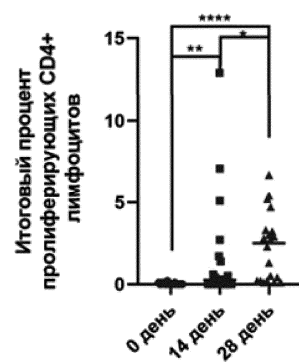
6. Применение по п.4, отличающееся тем, что восстановленная лиофилизированная форма средства содержит буферный раствор, мас. %:

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

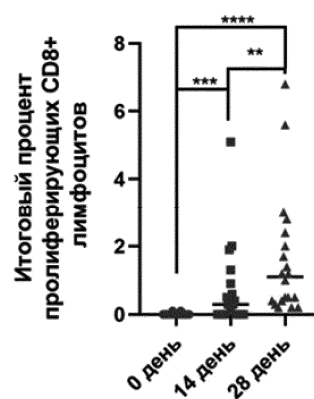
7. Применение по пп.1-3, отличающееся тем, что компонент 1 и компонент 2 средства находятся в разных упаковках.



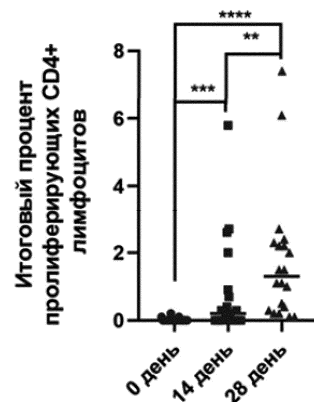
Фиг. 1



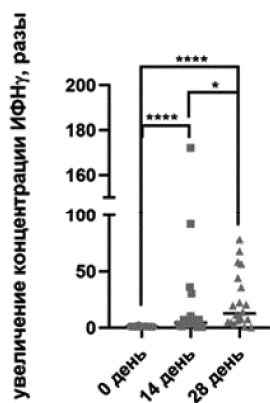
Фиг. 2



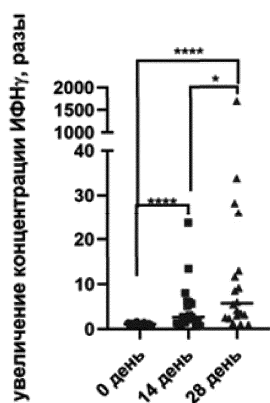
Фиг. 3



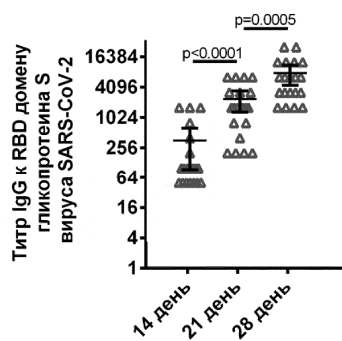
Фиг. 4



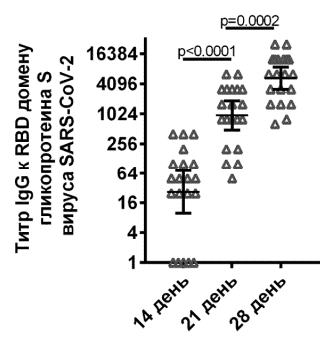
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

