

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043182**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.27
- (21) Номер заявки
202290494
- (22) Дата подачи заявки
2022.02.18
- (51) Int. Cl. **A61K 39/215** (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ИНДУКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ВИРУСА ТЯЖЕЛОГО ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА SARS-COV-2 У ДЕТЕЙ**

- (43) **2023.04.26**
- (86) **PCT/RU2022/000047**
- (87) **WO 2022/197209 2022.09.22**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ
ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.
ГАМАЛЕИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**
- (72) Изобретатель:
**Зубкова Ольга Вадимовна,
Ожаровская Татьяна Андреевна,
Должикова Инна Вадимовна,
Попова Ольга, Щедляков Дмитрий
Викторович, Гроусова Дарья
Михайловна, Джаруллаева Алина
Шахмировна, Тухватулин Амир
Ильдарович, Тухватулина Наталья
Михайловна, Щербинин Дмитрий
Николаевич, Есмагамбетов Ильяс
Булатович, Токарская Елизавета**
- Александровна, Ботиков Андрей
Геннадьевич, Ерохова Алина
Сергеевна, Ижаева Фатима
Магомедовна, Никитенко Наталья
Анатольевна, Лубенец Надежда
Леонидовна, Семихин Александр
Сергеевич, Народицкий Борис
Савельевич, Логунов Денис Юрьевич,
Гинцбург Александр Леонидович,
Борисевич Сергей Владимирович,
Чернецов Владимир Александрович,
Крюков Евгений Владимирович,
Бабира Владимир Федорович, Кутаев
Дмитрий Анатольевич, Логинова
Светлана Яковлевна (RU)
- (74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)
- (56) RU-C1-2743963
RU-C9-2731342
RU-C9-2720614
WO-A1-2021204179
SADOFF J. et al. Interim Results of a Phase 1-2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. *Engl J Med.*, 2021, 384:1824-1835 DOI: 10.1056/NEJMoa2034201
JACKSON L. A. et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med*, 2020, 383:1920-1931 DOI: 10.1056/NEJMoa2022483

- (57) Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии и вирусологии и касается средства для профилактики заболеваний, вызванных вирусом тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца. Для этого разработано 6 вариантов применения средства, включающего компонент 1 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 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, и/или компонент 3 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,
-

B1**043182****043182****B1**

SEQ ID NO: 3. Заявленные компоненты применяются как в отдельности, так и совместно. Изобретение обеспечивает создание безопасного и эффективного средства, которое обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца. Также средство обеспечивает индукцию гуморального иммунного ответа, сравнимую с иммунным ответом взрослого человека, и обеспечивает усиленный мукозальный ответ в респираторном тракте.

043182 B1

043182 B1

Область техники

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

Уровень техники

В декабре 2019 года в провинции Хубэй Китайской Народной Республики распространился новый коронавирус зоонозного происхождения, который получил название SARS-CoV-2. Эпидемическое заболевание, вызванное SARS-CoV-2, называется коронавирусная болезнь-19 (coronavirus disease-19), сокращенно COVID-19. Данное заболевание может протекать как в бессимптомной или легкой форме, так и в тяжелой форме, которая может сопровождаться сепсисом и полиорганной недостаточностью. В течение нескольких месяцев заболевание распространилось по всему миру, затронув более 200 стран. В январе 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила эпидемию, связанную с SARS-CoV-2, чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения международного значения, а в марте 2020 года охарактеризовала распространение болезни как пандемию. К 28 июля 2021 года количество заболевших превысило 195 млн человек, а количество погибших - 4 млн человек.

Продолжающаяся вспышка COVID-19 представляет исключительную угрозу для общественного здравоохранения. Разработка безопасной и эффективной вакцины против SARS-CoV-2 в настоящее время является важнейшим глобальным приоритетом.

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

Фармацевтическая компания Pfizer при сотрудничестве с биотехнологической компанией BioNTech разработала вакцину BNT162b2 (tozinameran). Данная вакцина представляет собой липидные наночастицы, внутрь которых инкапсулирована модифицированная мРНК, кодирующая мутантную форму S белка SARS-CoV-2. В данный момент разрешено использование данной вакцины у взрослых и детей с 12 лет (F.P. Polack et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383: 2603-2615; www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/recommendations/adolescents.html).

Фармацевтическая компания Moderna в сотрудничестве с Национальным Институтом здоровья (США) разработала вакцину mRNA-1273. Активным компонентом данной вакцины является мРНК, кодирующая S белок SARS-CoV-2, которая окружена липидной оболочкой. Сейчас вакцина разрешена для экстренного применения у взрослых от 18 лет. Также Moderna провела исследование для детей от 12 до 17 лет, которое сейчас находится на рассмотрении. В настоящий момент проходит клиническое исследование KidCOVE, в ходе которого проводится иммунизация детей от 6 месяцев до 12 лет (L. A. Jackson et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med* 2020; 383:1920-1931; <https://penntoday.upenn.edu/news/covid-vaccine-kids>; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04796896>).

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

Компания CanSino разработала векторную вакцину против COVID-19, в основе которой репликативно-дефектный аденовирус человека 5 серотипа (Ad5), экспрессирующий полноразмерный S гликопротеин SARS-CoV-2. В настоящее время вакцина разрешена для экстренного использования у взрослых людей старше 18 лет. (GenBankYP_009724390) (Feng-Cai Zhu et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*. Vol. 369, Issue 10249, P479-488, 2020).

Исследовательские группы JohnsonandJohnson и JanssenPharmaceutical в сотрудничестве с Медицинским центром BethIsraelDeaconess, с помощью технологии JanssenAdVac® создали несколько кандидатных вакцин. После проведенных исследований безопасности и эффективности была выбрана кандидатная вакцина Ad26.COVS1 (Ad26COVS1). Активным компонентом данной вакцины является рекомбинантный аденовирусный вектор 26 серотипа с делецией E1 и E3 области, содержащий ген S белка SARS-CoV-2, с мутацией сайта расщепления фурина и с двумя пролин-стабилизирующими мутациями. Вакцина разрешена для экстренного применения у взрослых старше 18 лет. В настоящий момент проводятся исследования для использования вакцины у подростков и детей с рождения. (J. Sadoff et al. Interim Results of a Phase 1-2a Trial of Ad26.COVS1 Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*, 2021 Jan 13. DOI: 10.1056/NEJMoa2034201; <https://www.janssenmd.com/janssen-covid19-vaccine/special-populations/pediatrics/use-of-janssen-covid19-vaccine-in-pediatric-participants>).

В Beijing Institute of Biological Products Co. была разработана инактивированная вакцина против COVID-19. Вакцина одобрена для экстренного применения у взрослых с 18 лет. Также опубликована информация о клиническом исследовании данной вакцины на детях в возрастных группах 3-6 лет, 7-12

лет, 13-17 лет. В настоящий момент исследование продолжается (<https://www.who.int/news/item/07-05-2021-who-lists-additional-covid-19-vaccine-for-emergency-use-and-issues-interim-policy-recommendations>; https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04917523?cond=covid-19+vaccine&age_v=5&draw=2&rank=10).

Таким образом, в настоящее время, для применения у детей одобрена всего одна вакцина против COVID-19 на базе мРНК (Pfizer). Между тем, наблюдения врачей показывают, что количество молодых пациентов, госпитализированных в стационары с диагнозом COVID-19 возрастает. Также увеличивается смертность среди молодого населения (<https://www.paho.org/en/news/5-5-2021-hospitalizations-and-deaths-younger-people-soar-due-covid-19-paho-director-reports>), а вместе с этим увеличивается потребность в вакцинах для профилактики COVID-19 у детей.

Защитный иммунитет против коронавируса SARS-CoV-2 задействует несколько звеньев иммунной системы. Эффективная вакцина против COVID-19, по-видимому, должна индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Кроме того, важным элементом защитного иммунитета может служить активация мукозального иммунитета (например, реализуемого через экспрессию IgA антител) в носоглотке, которая является воротами проникновения вируса.

Таким образом, в уровне техники существует потребность в разработке новых средств, которые способны индуцировать у детей иммунный ответ против SARS-CoV-2, в том числе на слизистых оболочках дыхательных путей, который являются основными воротами инфекции.

Осуществление изобретения

Технической задачей заявленной группы изобретений является создание средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа (в том числе мукозального иммунного ответа) против вируса SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Технический результат заключается в создании безопасного и эффективного средства, которое обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Ребенок рождается с незрелой врожденной и адаптивной иммунной системой, которая развивается и приобретает память по мере его роста. От рождения до периода полового созревания человека, его иммунная система проходит в своем развитии ряд этапов.

Иммунная система новорожденного находится в супрессии. Система фагоцитоза не развита. Неонатальные Т-клетки значительно отличаются от взрослых клеток, что является следствием внутриутробной жизни плода, где воздействие чужеродных антигенов в значительной степени ограничивается материнскими аллоантигенами. Поэтому очень ранний адаптивный Т-клеточный иммунитет характеризуется толерогенной реактивностью, сниженным распознаванием аллоантигена и слабыми ответами на чужеродные антигены. В-клетки новорожденных также сильно отличаются от В-клеток взрослого человека. Известно, что неонатальные В-клетки имеют пониженную экспрессию TACI, BCMA и BAFF-R, а также сниженную продукцию IgG и IgA вответна CD40L и IL-10 (Kaur K, Chowdhury S, Greenspan NS, Schreiber JR. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2948-54. doi: 10.1182/blood-2007-01-069245. Epub 2007 Jul 18. PMID: 17634409). Вместе эти особенности способствуют притуплению гуморальных иммунных ответов с неполным переключением класса иммуноглобулинов. В-клетки новорожденных и младенцев в возрасте до 2 месяцев демонстрируют снижение соматической гипермутации по сравнению со взрослыми, что ограничивает созревание аффинности антител. Также, стромальные клетки костного мозга на ранних этапах жизни неспособны поддерживать долгосрочную выживаемость плазмобластов и дифференцировку в плазматические клетки, так что любые антитела IgG, вырабатываемые после иммунизации, быстро снижаются, в отличие от детей старшего возраста и взрослых (Pihlgren M, Friedli M, Tougne C, Rochat AF, Lambert PH, Siegrist CA. Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1): 165-72. doi: 10.4049/jimmunol.176.1.165. PMID: 16365407). Следовательно, эффективность адаптивной иммунной системы по раннему ответу на Т-клеточно-зависимые антигены заметно снижена у новорожденных по сравнению с детьми старшего возраста и взрослыми (A.K. Simon, G.A. Hollander, A. McMichael. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci*. 2015 Dec 22; 282(1821): 20143085. doi: 10.1098/rspb.2014.3085, PMCID: PMC4707740, PMID: 26702035).

В младенчестве иммунная система постепенно созревает. Критически важная ранняя защита от многих инфекционных заболеваний, ранее перенесенных матерью, обеспечивается пассивными антителами IgG, передаваемыми от матери трансплацентарно и с молоком.

Следующий этап развития обусловлен разрушением материнских антител. Первичный иммунный ответ на проникновение инфекции развивается за счет синтеза иммуноглобулинов класса М и не оставляет иммунологической памяти. Такой тип иммунного ответа наступает также при вакцинации против инфекционных заболеваний, и только ревакцинация формирует вторичный иммунный ответ с продукцией антител класса IgG.

С ростом ребенка расширяются его контакты с внешним миром. Постепенно начинается переключение иммунных реакций на образование антител класса IgG. Однако на многие антигены сохраняется первичный иммунный ответ (синтез IgM). Система местного иммунитета все еще остается незрелой. По-

степенно средняя концентрация IgG и IgM в крови увеличивается и достигает уровня, соответствующего взрослым, однако уровень IgA в крови еще не достигает окончательных значений.

Последний этап развития иммунной системы наступает в период полового созревания. На фоне повышения секреции половых стероидов уменьшается объем лимфоидных органов. Секреция половых гормонов ведет к подавлению клеточного звена иммунитета (Щеплягина Л.А., Круглова И.В. Возрастные особенности иммунитета у детей, Русский медицинский журнал №23 от 11.11.2009 стр. 1564).

Таким образом, разработка средства для применения у детей, обеспечивающего эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, включающую развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2, является сложной научной задачей.

Когда ребенок сталкивается с SARS-CoV-2, вирус в первую очередь поражает слизистые оболочки дыхательных путей. Это означает, что взаимодействия вируса с иммунной системой сначала происходят преимущественно на слизистых оболочках дыхательных путей и полости рта. Поэтому индукция мукозального иммунитета является важным фактором, влияющим на протективные свойства фармацевтического средства.

Исходя из уровня техники можно предположить, что введение детям вакцины, которая используется у взрослых, приведет к уменьшению ее эффективности вследствие незрелости детской иммунной системы. Однако, проведенные исследования показали, что введение детям 1/10 взрослой дозы разработанного средства индуцирует гуморальный иммунный ответ сравнимый с иммунным ответом взрослого человека. В данном случае это является неожиданным результатом.

Также, на молодых животных было показано, что введение разработанного средства индуцирует повышение уровня IgG антител на слизистой оболочке респираторного тракта. При этом, если в схему иммунизации включается интраназальный способ введения средства, это приводит к секреции на слизистой оболочке IgA антител. Таким образом, в результате проведенной работы были разработаны схемы введения средства, обеспечивающие усиленный мукозальный ответ в респираторном тракте.

Указанный технический результат достигается тем, что предложено следующее.

Применение средства, содержащего компонент 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего компонент в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую собой компонент 1 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 компонент 2 в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего компонент 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую собой компонент 1 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 компонент 2 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую компонент 1 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 в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID

NO: 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

В частных случаях осуществления:

средство обеспечивает индукцию мукозального иммунного ответа на слизистых оболочках дыхательных путей;

средство выполнено в жидкой или лиофилизированной форме.

При этом жидкая форма средства содержит буферный раствор, мас. %:

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

При этом 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

В частном случае, компонент и/или компоненты средства предназначены для интраназального и/или внутримышечного введения.

В частном случае, средство предназначено для введения в дозе $5 \cdot 10^9$ - $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц.

В частном случае, компоненты средства предназначены для последовательного введения с интервалом более 1 недели или предназначены для одновременного введения.

При этом компоненты средства могут находиться в индивидуальных упаковках.

Краткое описание фигур

На фиг. 1

представлен процент пролиферирующих CD4+ (А) и CD8+ (Б) Т лимфоцитов до иммунизации (1 день) и на 14 день исследования, после иммунизации мышей разработанным фармацевтическим средством Ad26-CMV-S-CoV2. Точками обозначены значения по каждому животному, участвующему в исследовании. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Символ **, обозначает статистически достоверную разницу между значениями 1 и 14 дня ($p < 0.01$, по критерию Манн-Уитни).

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - время, дни.

На фиг. 2

представлен процент пролиферирующих CD4+ (А) и CD8+ (Б) Т лимфоцитов до иммунизации (1 день) и на 14 день исследования, после иммунизации мышей разработанным фармацевтическим средством Ad5-CMV-S-CoV2. Точками обозначены значения по каждому животному, участвующему в исследовании. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Символы * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.01$), обозначают статистически достоверную разницу между значениями 1 и 14 дня по критерию Манн-Уитни.

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - время, дни.

На фиг. 3

представлены титры IgG антител, специфичных к RBD-домену S белка вируса SARS-CoV2, до вакцинации (1 день) и на 21, 28 и 42 дни исследования, после иммунизации добровольцев разработанным фармацевтическим средством в дозе 1×10^{10} вирусных частиц. Точками обозначены значения по каждому добровольцу, участвующему в исследовании. Среднее геометрическое значение титра антител представлено в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Статистически достоверная разница между значениями на 21, 28 и 42 день обозначена скобкой, над которой указано значение p по T-критерию Вилкоксона (#### - $p < 0.0001$). НД обозначает недостоверные различия между указанными выборками данных. Статистически достоверная разница между значениями 21, 28 и 42 день в сравнении со значениями до вакцинации (1 день) определено по T-критерию Вилкоксона (**** - $p < 0.0001$).

Ось ординат - титр антигенспецифических IgG антител.

Ось абсцисс - время, дни.

На фиг. 4

представлены титры IgG антител, специфичных к RBD-домену S белка вируса SARS-CoV2, до вакцинации (1 день) и на 21, 28 и 42 дни исследования, после иммунизации добровольцев разработанным фармацевтическим средством в дозе 2×10^{10} вирусных частиц. Точками обозначены значения по каждому добровольцу, участвующему в исследовании. Среднее геометрическое значение титра антител представлено в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Статистически достоверная разница между значениями на 21, 28 и 42 день обозначена скобкой, над которой указано значение p по T-критерию Вилкоксона (#### - $p < 0.0001$). НД обозначает недостоверные различия между указанными выборками данных. Статистически достоверная разница между значениями 21, 28 и 42 день в сравнении со значениями до вакцинации (1 день) определено по T-критерию Вилкоксона (**** - $p < 0.0001$).

Ось ординат - титр антигенспецифических IgG антител.

Ось абсцисс - время, дни.

На фиг. 5

представлен процент пролиферирующих CD4+ (А) и CD8+ (Б) Т лимфоцитов до иммунизации (1 день) и на 28 день исследования, после иммунизации добровольцев разработанным фармацевтическим средством в дозе 1×10^{10} вирусных частиц. Точками обозначены значения по каждому добровольцу, участвующему в исследовании. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Символ ****, обозначает статистически достоверную разницу между значениями 1 и 28 дня ($p < 0.0001$, по критерию Вилкоксона).

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - время, дни.

На фиг. 6

представлен процент пролиферирующих CD4+ (А) и CD8+ (Б) Т лимфоцитов до иммунизации (1 день) и на 28 день исследования, после иммунизации добровольцев разработанным фармацевтическим средством в дозе 2×10^{10} вирусных частиц. Точками обозначены значения по каждому добровольцу, участвующему в исследовании. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Символ ****, обозначает статистически достоверную разницу между значениями 1 и 28 дня ($p < 0.0001$, по критерию Вилкоксона).

Ось ординат - количество пролиферирующих клеток, %.

Ось абсцисс - время, дни.

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 метили-

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

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

Экспрессионная кассета SEQ ID NO: 3 состоит из EF1 промотора, гена S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнала полиаденилирования. Промотор EF1 - промотор человеческого эукариотического фактора элонгации трансляции 1 β (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, а также варианты средств, содержащие один компонент на основе аденовирусов различных серотипов. Таким образом, иммунный ответ на векторную часть аденовируса, который может возникать после введения первого компонента средства или однокомпонентного средства, в дальнейшем не буструется и не влияет на генерацию антиген-специфических иммунных ответов против вакцинного антигена в случае использования двухкомпонентного средства или при необходимости повторного введения однокомпонентного средства, так как в последнем случае может быть введено средство на основе иного аденовируса.

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

Таким образом, в результате проведенной работы были разработаны следующие технические решения.

Применение средства, содержащего компонент 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего компонент в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую собой компонент 1 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 компонент 2 в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего компонент 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую собой компонент 1 в виде экс-

прессионного 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 компонент 2 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 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую компонент 1 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 в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

В частных случаях осуществления:

средство обеспечивает индукцию мукозального иммунного ответа на слизистых оболочках дыхательных путей;

средство выполнено в жидкой или лиофилизированной форме.

При этом жидкая форма средства содержит буферный раствор, мас. %:

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

При этом 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.

В частном случае, компонент и/или компоненты средства предназначены для интраназального и/или внутримышечного введения.

В частном случае, средство предназначено для введения в дозе $5 \cdot 10^9$ - $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц.

В частном случае, компоненты средства предназначены для последовательного введения с интервалом более 1 недели или предназначены для одновременного введения.

При этом компоненты средства могут находиться в индивидуальных упаковках.

Кроме того, авторами изобретения были подобраны варианты буферного раствора, которые позволяют хранить разработанное средство как в замороженном виде при температуре ниже -18°C , так и в виде лиофилизата при температуре от $+2^{\circ}\text{C}$ до $+8^{\circ}\text{C}$.

Также был разработано применение средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца, путем его вве-

дения в организм в эффективном количестве.

Было показано, что разработанное средство обеспечивает индукцию мукозального иммунного ответа на слизистых оболочках дыхательных путей.

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

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

Осуществление изобретения подтверждается следующими примерами.

Пример 1.

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

На первом этапе работы был разработан дизайн плазмидной конструкции pAd26-Ends, несущей два участка, гомологичных геному аденовируса человека 26 серотипа (два плеча гомологии), и ген устойчивости к ампициллину. Одно плечо гомологии представляет собой начало генома аденовируса человека 26-го серотипа (от левого инвертированного концевого повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую рIX 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-dlE1, несущая геном аденовируса человека 26-го серотипа с делетированной E1-областью.

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

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd26-dlE1-ORF6-Ad5 была удалена E3-область генома аденовируса (примерно 3321 п.о. между генами pVIII и U-exon) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате этого был получен рекомбинантный вектор pAd26-only-null на основе генома аденовируса человека 26-го серотипа с открытой рамкой считывания ORF6 аденовируса человека 5-го серотипа и с делецией E1 и E3-областей.

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 гидролизовали 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 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 ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Готовая суспензия содержала аденовирусные частицы в буферном растворе для жидкой формы средства или в буферном растворе для лиофилизированной фор-

мы 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 концевого 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 плаزمида pSim25-dlE1, несущая геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делетированной E1-областью.

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pSim25-dlE1 была удалена E3 область генома аденовируса (3921 п.о. от начала гена 12,5K до гена 14,7K) для увеличения пакующей емкости вектора. В результате была получена плазмидная конструкция pSim25-null, кодирующая полный геном аденовируса обезьян 25-го серотипа с делецией E1 и E3-областей.

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 линеаризовали 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 каскету 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 каскету SEQ ID NO: 4), simAd25-CAG-S-CoV2 (содержащий экспрессионную каскету SEQ ID NO: 2), simAd25-EF1-S-CoV2 (содержащий экспрессионную каскету SEQ ID NO: 3).

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

Пример 4.

Получение средства в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной каскетой, выбранной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

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

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

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

2. Иммунобиологическое средство на основе генома рекомбинантного штамма simian adenovirus 25-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области с экспрессионной каскетой, содержащей CMV промотор, ген S белка вируса SARS-CoV-2 и сигнал полиаденилирования, SEQ ID NO: 4 (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 каскетой, 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 каскетой, 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 каскетой, 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 каскетой, 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 концевго повтора до E1-области) и последовательность вирусного генома, включающую pIX белок. Второе плечо гомологии содержит последовательность нуклеотидов после ORF3 E4-области до

конца генома. Синтез конструкции pAd5-Ends осуществлялся компанией ЗАО "Евроген" (Москва).

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

Далее с использованием стандартных генно-инженерных методов в сконструированной плазмиде pAd5-dlE1 была удалена E3 область генома аденовируса (2685 п.о. от конца гена 12,5K до начала последовательности U-эxon) 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. Кроме того, авторы разработали несколько дизайнов экспрессионной кассеты:

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

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

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

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

После этого, конструкции pArms-Ad5-CMV-S-CoV2, pArms-Ad5-CAG-S-CoV2, pArms-Ad5-EF1-S-CoV2 лианеризовали по уникальному сайту гидролиза между плечами гомологии, каждую плазмиду смешивали с рекомбинантным вектором pAd5-too-null. В результате гомологичной рекомбинации были получены плазмиды pAd5-too-CMV-S-CoV2, pAd5-too-GAC-S-CoV2, pAd5-too-EF1-S-CoV2, несущие геном рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа с 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 НЕК293. 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 делегированы 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 средства 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.

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 делегированы E1 и E3 области:

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

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

ферном 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 2 в варианте 1 и в варианте 3 разработанного средства.

Пример 7.

Получение буферного раствора.

Каждый компонент разработанного средства представляет собой средство на основе рекомбинантного аденовируса с экспрессионной кассетой в буферном растворе.

Авторами изобретения был подобран состав буферного раствора, обеспечивающий стабильность рекомбинантных аденовирусных частиц. Данный раствор включает следующее.

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

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

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

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

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

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

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав средства. Полученные 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: от 0,1831 мас.% до 0,3432 мас.%;
хлорид натрия: от 0,3313 мас.% до 0,6212 мас.%;
сахароза: от 3,7821 мас.% до 7,0915 мас.%;
магния хлорида гексагидрат: от 0,0154 мас.% до 0,0289 мас.%;
ЭДТА: от 0,0029 мас.% до 0,0054 мас.%;
Полисорбат-80: от 0,0378 мас.% до 0,0709 мас.%;
этанол 95%: от 0,0004 мас.% до 0,0007 мас.%;
растворитель: остальное.

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

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

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

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

Таким образом, была проверена стабильность каждого из серотипов аденовирусов, входящих в состав средства. Полученные средства хранили при температуре $+2^{\circ}\text{C}$ и $+8^{\circ}\text{C}$ 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:

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

Пример 8.

Оценка способности разработанного средства индуцировать мукозальный иммунный ответ при внутримышечном введении.

Для данного исследования использовали молодых мышей линии BALB/c (возраст 21-28 дней). Животные были распределены на группы по 10 шт, которым вводили следующие средства:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2, внутримышечно (в/м), в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad26-CMV-S-CoV2, внутримышечно (в/м), в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;
- 2) Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;
- 3) simAd25-CMV-S-CoV2, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день simAd25-CMV-S-CoV2, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;
- 4) Ad26-null, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad26-null, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;
- 5) Ad5-null, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad5-null, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;
- 6) simAd25-null, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день simAd25-null, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;
- 7) Ad26-CMV-S-CoV2, интраназально (ин), в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad26-CMV-S-CoV2 ин, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;

8) Ad5-CMV-S-CoV2, ин, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad5-CMV-S-CoV2, ин, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;

9) Ad26-CMV-S-CoV2, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad26-CMV-S-CoV2 ин, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;

10) Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл; через 21 день Ad5-CMV-S-CoV2, ин, в дозе 5×10^9 в.ч./100мкл;

11) буферный раствор.

Через 14 дней после последней иммунизации определяли титр IgG и IgA антител методом ИФА в смывах бронхоавеолярного лаважа (БАЛ) экспериментальных животных.

Для этого.

1) Антиген (рекомбинантный RBD) адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^\circ\text{C}$.

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

3) Образцы БАЛ разводили в 25 раз и далее методом 2-х кратных разведений.

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

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

6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

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

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМБ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут 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
Среднее геометрическое титра IgG и IgA антител к S белку вируса SARS-CoV-2 в смывах БАЛ экспериментальных животных

	Название группы	Титр IgG антител	Титр IgA антител
1	Ad26-CMV-S-CoV2 в/м; Ad26-CMV-S-CoV2 в/м	162	3
2	Ad5-CMV-S-CoV2 в/м, Ad5-CMV-S-CoV2 в/м	325	4

3	simAd25-CMV-S-CoV2 в/м, simAd25-CMV-S-CoV2 в/м	214	3
4	Ad26-CMV-S-CoV2 ин; Ad26-CMV-S-CoV2 ин	123	76
5	Ad5-CMV-S-CoV2 ин, Ad5-CMV-S-CoV2 ин	264	81
6	Ad26-CMV-S-CoV2 в/м; Ad26-CMV-S-CoV2 ин	373	283
7	Ad5-CMV-S-CoV2 в/м, Ad5-CMV-S-CoV2 ин	348	303
8	Ad26-null в/м; Ad26-null в/м;	0	0
9	Ad5-null в/м; Ad5-null в/м;	0	0
10	simAd25-null в/м; simAd25-null в/м;	0	0
11	Ad26-null ин; Ad26-null ин;	0	0
12	Ad5-null ин; Ad5-null ин;	0	0
13	Буферный раствор	0	0

Как видно из представленных результатов, все варианты разработанного средства приводят к повышению титра IgG антител на поверхности слизистой оболочки дыхательных путей. Экспрессия IgA антител зависит от способа введения средства. Максимальные титры IgA антител индуцируются, когда иммунизация животных проводится последовательно: внутримышечно, а затем интраназально.

Таким образом, в результате проведенной работы было разработано иммунобиологическое средство, способное индуцировать мукозальный иммунный ответ против вируса SARS-CoV-2 на слизистой оболочке дыхательных путей у детей, а также схема введения данного средства, приводящая к потенцированию мукозального иммунного ответа.

Пример 9.

Оценка способности разработанного средства индуцировать иммунный ответ у млекопитающих разного возраста.

Для данного исследования использовали молодых мышей линии BALB/c различного возраста. Животные были распределены на группы по 5 шт:

- 1) мыши возраста 15-18 дней,
- 2) мыши возраста 28 -35 дней,
- 3) мыши возраста 50-60 дней.

Всех животных однократно иммунизировали разработанным иммунобиологическим средством на основе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5-CMV-S-CoV2) в дозе 10^8 вч/50 мкл. Через 21 день после иммунизации измеряли титр IgG антител в сыворотке крови животных.

Для этого.

1) Антиген (рекомбинантный RBD) адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре +4°C.

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

3) Образцы сыворотки разводили в 50 раз и далее методом 2-х кратных разведений.

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

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

6) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

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

9) После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

10) Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМБ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут 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 таблице 4.

Таблица 4

Среднее геометрическое титра IgG антител к S белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови экспериментальных животных в зависимости от их возраста

№	Возраст животных	Титр IgG антител
1	15-18 дней	6400
2	28-35 дней	5572
3	50-60 дней	4222

Таким образом, как видно из представленных данных разработанное иммунобиологическое средство индуцирует развитие гуморального иммунного ответа как у взрослых, так и у молодых мышей различного возраста. Это позволяет предположить, что средство будет эффективно для использования у людей различных возрастных категорий.

Пример 10.

Исследование иммуногенности разработанного средства на молодых мышках по оценке клеточного иммунного ответа после однократной вакцинации.

Для исследования иммуногенности разработанного средства были использованы молодые мыши BALB/c (21-28 дней). Животные были распределены на группы по 5 шт, которым вводили однократно следующие средства:

1. Ad26-CMV-S-CoV2, внутримышечно (в/м), в дозе 10^{10} вч/100 мкл;
2. Ad5-CMV-S-CoV2, внутримышечно (в/м), в дозе 10^{10} вч/100 мкл.

Напряженность клеточного иммунитета определяли путем оценки количества пролиферирующих CD4+ и CD8+ лимфоцитов выделенных из селезенки мышей в культуре *in vitro* после повторной рестимуляции клеток рекомбинантным S белком SARS-CoV-2. Перед иммунизацией, а также через 14 дней, у животных отбирали селезенки, из которых выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколла (1,09 g/mL; ПанЭко). Далее выделенные клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE (Invivogen, США) и высевали на лунки 96л планшета ($2 \cdot 10^5$ кл/лунку). Затем проводили повторную стимуляцию лимфоцитов в условиях *in vitro* добавлением в культуральную среду S белка коронавируса (конечная концентрация белка 1мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген.

Для определения % пролиферирующих клеток проводили их окрашивание антителами против маркерных молекул T лимфоцитов CD3, CD4, CD8 (BDBiosciences, США). Пролиферирующие (с меньшим количеством красителя CFSE клеток) CD4+ и CD8+ T 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 из результата, полученного при анализе клеток рестимулированных антигеном S коронавируса.

Результаты (с проведенной статистической обработкой) определения процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ T лимфоцитов на 1 день (до иммунизации) и на 14 день исследования представлены на фиг. 1 (Ad26-CMV-S-CoV2) и фиг. 2 (Ad5-CMV-S-CoV2).

Полученные данные показали, что однократная иммунизация мышей разработанным средством позволяет достоверно повысить процент пролиферирующих CD4+ и CD8+ T лимфоцитов после антигенной рестимуляции на 14 день после иммунизации.

Таким образом, можно заключить, что однократная иммунизация мышей разработанным иммунобиологическим средством способна приводить к формированию напряженного поствакцинального клеточного иммунитета.

Пример 11.

Исследование иммуногенности разработанного средства на молодых мышках при различных способах введения.

Для исследования иммуногенности разработанного средства были использованы молодые мыши BALB/c(21-28 дней). Животные были распределены на группы по 5 шт, которым вводили следующие средства:

3. Ad26-CMV-S-CoV2, внутримышечно (в/м), в дозе 10^9 вч/100 мкл;
4. Ad26-CAG-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
5. Ad26-EF1-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
6. Ad5-CMV-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;

7. Ad5-CAG-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
8. Ad5-EF1-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
9. simAd25-CMV-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
10. simAd25-CAG-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
11. simAd25-EF1-S-CoV2, внутримышечно, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
12. Ad26-CMV-S-CoV2, интраназально (ин), в дозе 10^9 вч/100 мкл;
13. Ad26-CAG-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
14. Ad26-EF1-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
15. Ad5-CMV-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
16. Ad5-CAG-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
17. Ad5-EF1-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
18. simAd25-CMV-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
19. simAd25-CAG-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл;
20. simAd25-EF1-S-CoV2, интраназально, в дозе 10^9 вч/100 мкл.

Через 21 день у животных отбирали кровь, выделяли сыворотку крови и определяли титр IgG антиген к S белку вируса SARS-CoV-2 методом иммуоферментного анализа. Для этого:

1. Антиген адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.
2. Далее для избавления от неспецифического связывания в лунки планшета добавляли 5 % молоко в TPBS 100 мкл/лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа.
3. Методом 2-кратных разведений разводили образцы сыворотки иммунизированных мышей. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.
4. Добавляли по 50 мкл каждого разведенного образца сыворотки в лунки планшета.
5. Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .
6. После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
7. Затем добавляли вторичные антитела против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена.
8. Далее проводили инкубацию в течение 1 часа при 37°C .
9. После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.
10. Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМБ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут добавлением серной кислоты. Далее с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность раствора (OD) в каждой лунке при длине волны 450 нм.

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

	Группа животных	Титр IgG антиген
1	Ad26-CMV-S-CoV2, в/м	696
2	Ad26-CAG-S-CoV2, в/м	528
3	Ad26-EF1-S-CoV2 в/м	459
4	Ad5-CMV-S-CoV2, в/м	9701
5	Ad5-CAG-S-CoV2, в/м	11143
6	Ad5-EF1-S-CoV2, в/м	14703
7	simAd25-CMV-S-CoV2, в/м	3676
8	simAd25-CAG-S-CoV2, в/м	5572

9	simAd25-EF1-S-CoV2, в/м	3676
10	Ad26-CMV-S-CoV2, ин	230
11	Ad26-CAG-S-CoV2, ин	200
12	Ad26-EF1-S-CoV2, ин	174
13	Ad5-CMV-S-CoV2, ин	606
14	Ad5-CAG-S-CoV2, ин	459
15	Ad5-EF1-S-CoV2, ин	459
16	simAd25-CMV-S-CoV2, ин	459
17	simAd25-CAG-S-CoV2, ин	400
18	simAd25-EF1-S-CoV2, ин	303

Как видно из представленных данных, однократная иммунизация разработанным средством индуцирует гуморальный иммунный ответ к гликопротеину SARS-CoV-2.

Пример 12.

Исследование иммуногенности разработанного средства при введении молодым животным в различных дозах.

Целью данного исследования являлось оценка гуморального иммунного ответа к S белку SARS-CoV-2 при введении разработанного средства в различных дозах молодым животным.

Для исследования иммуногенности разработанного средства были использованы молодые мыши линии C57/B16 (3-4 нед). Животные были распределены на группы по 5 шт, которым вводили следующие средства внутримышечно, двукратно с интервалом 28 дней:

- 1) Ad5-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^9$ вч/100 мкл,
- 2) Ad5-CMV-S-CoV2, 10^{10} вч/100 мкл,
- 3) Ad5-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/100 мкл.

Через 21 день у животных отбирали кровь, выделяли сыворотку крови и определяли титр IgG антител к S белку вируса SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа.

Для этого.

1. Антиген адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

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

3. Образцы сыворотки иммунизированных мышей разводили в 100 раз и далее методом 2-кратных разведений. Всего было приготовлено 12 разведений каждого образца.

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

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

6. После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

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

9. После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером

10. Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМВ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение. Реакцию останавливали через 15 минут 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 IgG антител к белку S в сыворотке крови мышей
(среднее геометрическое значение титра антител)

	Группа животных	Титр IgG антител
1	Ad5-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^9$ вч/100 мкл,	22286
2	Ad5-CMV-S-CoV2, 10^{10} вч/100 мкл,	44572
3	Ad5-CMV-S-CoV2, $5 \cdot 10^{10}$ вч/100 мкл.	117627

Как видно из представленных данных, разработанное средство проявляет иммуногенность во всем диапазоне выбранных доз.

Пример 13.

Исследование иммуногенности разработанного средства на молодых мышах при различных схемах введения.

Для исследования иммуногенности разработанного средства были использованы молодые мыши (3-4 нед.). Животные были распределены на группы по 5 шт, которым вводили следующие средства:

- 1) Ad26-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad26-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 2) Ad26-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad5-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 3) Ad26-CMV-S-CoV2, ин, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad5-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 4) Ad26-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели simAd5-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 5) Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad5-CMV-S-CoV2 в/м, 10^8 вч/100 мкл;
- 6) Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad26-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 7) Ad5-CMV-S-CoV2, ин, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad26-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 8) Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели simAd5-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 9) simAd25-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели simAd5-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 10) simAd25-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad5-CMV-S-CoV2 в/м, 10^9 вч/100 мкл;
- 11) simAd25-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл; через 3 недели Ad26-CMV-S-CoV2, в/м, 10^9 вч/100 мкл.

Через 21 день у животных отбирали кровь, выделяли сыворотку крови и определяли титр IgG антител к S белку вируса SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа.

Для этого.

1. Антиген адсорбировали на лунках 96-луночного планшета для ИФА в течение 16 часов при температуре $+4^\circ\text{C}$.

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

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

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

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

6. После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером.

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

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

9. После инкубации проводилась трехкратная промывка лунок фосфатным буфером

10. Затем добавили раствор тетраметилбензидина (ТМБ), который является субстратом пероксидазы хрена и в результате реакции превращается в окрашенное соединение.

11. Реакцию останавливали через 15 минут 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 таблице 7.

Таблица 7

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

	Группа животных	Титр IgG антител
1	Ad26-CMV-S-CoV2 в/м, Ad26-CMV-S-CoV2 в/м	11143
2	Ad26-CMV-S-CoV2, в/м, Ad5-CMV-S-CoV2 в/м,	29407
3	Ad26-CMV-S-CoV2, ин, Ad5-CMV-S-CoV2 в/м,	22286
4	Ad26-CMV-S-CoV2, в/м, simAd5-CMV-S-CoV2 в/м,	14703
5	Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, Ad5-CMV-S-CoV2 в/м,	16890
6	Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, Ad26-CMV-S-CoV2 в/м,	33779
7	Ad5-CMV-S-CoV2, ин, Ad26-CMV-S-CoV2 в/м,	25600
8	Ad5-CMV-S-CoV2, в/м, simAd5-CMV-S-CoV2 в/м,	14703
9	simAd5-CMV-S-CoV2, в/м, simAd5-CMV-S-CoV2 в/м,	12800
10	simAd5-CMV-S-CoV2, в/м, Ad5-CMV-S-CoV2 в/м,	16890
11	simAd5-CMV-S-CoV2, в/м, Ad26-CMV-S-CoV2, в/м	14703

Полученные результаты показывают, что разработанное средство обеспечивает развитие гуморального иммунного ответа против SARS-CoV-2 у молодых животных при различных схемах введения.

Пример 14.

Исследование безопасности использования разработанного средства для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 для детей.

В данном исследовании приняли участие 100 добровольцев в возрасте от 12 до 17 лет. Предполагаемая схема иммунизации включала последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 фармацевтического средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2). Один доброволец выбыл до введения компонента 1 по причине впервые диагностированной артериальной гипертензии, соответственно 99 добровольцев начали исследуемую терапию. Так же компонент 2 не получили: 1 человек - по причине неявики, 1 человек - по причине нежелательного явления (лейкопения), 1 человек - по причине кишечной инфекции неустановленной этиологии (по типу энтеровирусной), 1 человек - по причине госпитализации с гнойным фурункулом через 5 дней после введения компонента, 1 человек - по причине госпитализации (кишечная инфекция) и 1 человек - по причине заболевания ковидом, 2 человека -отказались от участия. Соответственно, оба компонента вакцины получил 91 доброволец.

Было зарегистрировано 205 НЯ, развившихся у 73 добровольцев (73,0%) после введения вакцины. В таблице 8 приведено число (доля) добровольцев с наличием НЯ в каждой группе по классу системы органов (SOC) и предпочтительному термину (PT) в соответствии со словарем MedDRA, а также по связи с исследуемым препаратом и степени тяжести. Межгрупповое сравнение частоты развития НЯ было проведено с помощью χ^2 -критерия и при необходимости точного тест Фишера, если ожидаемая частота в какой-либо из ячеек была менее 5. Анализ не выявил статистически значимых отличий по частоте возникновения отдельных НЯ между группами.

Таблица 8
 Нежелательные явления, зарегистрированные в анализируемый период, по классам систем органов, предпочтительным терминам и группам (FAS-популяция)

Описание	Группа 1 (дозировка 1/10) N=50		Группа 2 (дозировка 1/5) N=50		Всего N = 100		p- value
	N	%	N	%	N	%	
Любой РТ	37	74,0	36	72,0	73	73,0	0,822
Общие нарушения и реакции в месте введения (78 эпизодов НЯ)							
Боль в месте инъекции	15	30,0	11	22,0	26	26,0	0,362
Болезненные ощущения (1)	7	14,0	7	14,0	14	14,0	1,000
Гипертермия	5	10,0	3	6,0	8	8,0	0,715
Гриппоподобное заболевание	3	6,0	5	10,0	8	8,0	0,715
Эритема в месте инъекции	4	8,0	0	0,0	4	4,0	0,117
Зуд в месте инъекции	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Местное повышение температуры в месте введения	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Озноб	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Отек в месте инъекции	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Пирексия	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Всего в системе органов	29	58,0	23	46,0	52	52,0	0,230

Лабораторные и инструментальные данные (76 эпизодов НЯ)							
Снижение числа нейтрофилов	17	34,0	18	36,0	35	35,0	0,834
Положительный результат анализа мочи на эритроциты	8	16,0	5	10,0	13	13,0	0,372
Повышение уровня билирубина в крови	3	6,0	2	4,0	5	5,0	1,000
Наличие белка в моче	1	2,0	2	4,0	3	3,0	1,000
Снижение уровня гемоглобина	1	2,0	2	4,0	3	3,0	1,000
Наличие лейкоцитов в моче	1	2,0	1	2,0	2	2,0	1,000
Повышение уровня щелочной фосфатазы в крови	1	2,0	1	2,0	2	2,0	1,000
Снижение числа лимфоцитов	1	2,0	1	2,0	2	2,0	1,000
Снижение числа тромбоцитов	1	2,0	1	2,0	2	2,0	1,000
Исследование на бактерии (2)	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Наличие глюкозы в моче	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Наличие цилиндров в моче	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Повышение скорости оседания эритроцитов	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Повышение уровня лактатдегидрогеназы в крови	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Повышение уровня холестерина в крови	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Повышение числа лейкоцитов	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Повышение числа эритроцитов	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000

Всего в системе органов	25	50,0	23	46,0	48	48,0	0,689
Нарушения со стороны нервной системы (18 эпизодов НЯ)							
Головная боль	5	10,0	4	8,0	9	9,0	1,000
Сомнолентность	4	8,0	1	2,0	5	5,0	0,362
Головокружение	1	2,0	1	2,0	2	2,0	1,000
Всего в системе органов	9	18,0	5	10,0	14	14,0	0,249
Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани (9 эпизодов НЯ)							
Боль в конечности	0	0,0	3	6,0	3	3,0	0,242
Миалгия	2	4,0	1	2,0	3	3,0	1,000
Артралгия	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Всего в системе органов	2	4,0	5	10,0	7	7,0	0,436
Желудочно-кишечные нарушения (6 эпизодов НЯ)							
Боль в животе	0	0,0	3	6,0	3	3,0	0,242
Рвота	1	2,0	1	2,0	2	2,0	1,000
Сухость во рту	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Всего в системе органов	2	4,0	3	6,0	5	5,0	1,000
Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения (5 эпизодов НЯ)							
Заложенность носа	3	6,0	0	0,0	3	3,0	0,242
Боль в ротоглотке (орофарингеальная)	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Ринорея	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000

Всего в системе органов	3	6,0	1	2,0	4	4,0	0,617
Инфекции и инвазии (3 эпизода НЯ)							
Ротавирусная инфекция	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Фурункул (3)	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Энтеровирусная инфекция	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Всего в системе органов	2	4,0	1	2,0	3	3,0	1,000
Нарушения со стороны сосудов (3 эпизода НЯ)							
Влагалищное кровоизлияние (4)	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Геморрой	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Гиперемия	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Всего в системе органов	3	6,0	0	0,0	3	3,0	0,242
Нарушения метаболизма и питания (1 эпизод НЯ)							
Снижение аппетита	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Нарушения со стороны кожи и подкожной клетчатки (1 эпизод НЯ)							
Сыпь	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Нарушения со стороны крови и лимфатической системы (1 эпизод НЯ)							
Лейкопения	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Нарушения со стороны органа слуха и лабиринта (1 эпизод НЯ)							
Ушная боль	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
Нарушения со стороны почек и мочевыводящих путей (1 эпизод НЯ)							
Поллакиурия	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000

Психические расстройства (1 эпизод НЯ)							
Паническая атака	0	0,0	1	2,0	1	1,0	1,000
Травмы, интоксикации и осложнения процедур (1 эпизод НЯ)							
Пищевое отравление	1	2,0	0	0,0	1	1,0	1,000
<i>Примечания:</i>							
Результаты представлены в форме: число субъектов, у которых зарегистрировано нежелательные явления (НЯ), процент от популяции безопасности в данной группе.							
1 Повышенная чувствительность в месте инъекции. РТ «Болезненные ощущения» соответствует РТ «Tenderness [10043224]».							
2 РТ «Исследование на бактерии» соответствует LLT «Наличие бактерий в моче [10060857]».							
3 РТ «Фурункул» соответствует LLT «Фурункул уха [10017556]», НЯ – «Фурункул ушной раковины слева».							
4 РТ «Влагалищное кровоизлияние» соответствует LLT «Кровянистые выделения из влагалища [10049851]».							

В ходе исследования отмечались нежелательные явления (НЯ) в следующих категориях.

1) Общие нарушения и реакции в месте введения - 76 НЯ:

1/10 дозы: 35 случаев,

1/5 дозы: 22 случая.

2) Системные реакции - 54 НЯ,

1/10 дозы: 29 случаев,

1/5 дозы: 25 случаев.

3) Лабораторные отклонения - 76 НЯ,

1/10 дозы: 44 случая,

1/5 дозы: 32 случая.

При этом связанными с исследуемым препаратом (т.к. оценка связи "возможная", "вероятная" или "определенная") были следующие НЯ: болезненность в месте инъекции, гриппоподобный синдром, утомляемость, субфебрильная температура, чувство жара, заложенность носа возникла сразу после инъекции вакцины, головная боль, боль в горле, кашель, ломота в суставах, общая слабость, боль в животе, паническая атака, снижение нейтрофилов, повышение уровня билирубин.

Для остальных НЯ связь была указана как "сомнительная" или "нет связи". Аллергические реакции на исследуемый препарат не отмечались.

В целом можно сказать, что выявленные в ходе исследования нежелательные явления характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов. случаев развития нежелательных явлений, угрожающих жизни, не было зарегистрировано.

Пример 16.

Определение эффективности иммунизации детей разработанным фармацевтическим средством, по оценке напряженности гуморального иммунитета.

В данном исследовании приняло участие 95 детей в возрасте от 12 до 18 лет. Напряженность гуморального иммунитета определяли путем оценки титра IgG антител, специфичных к RBD домену S белка вируса SARS-CoV-2. Участники исследования были разделены на две группы:

1) последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 фармацевтического средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2) в дозе 1×10^{10} вирусных частиц/1 мл, 47 человек;

2) последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 фармацевтического средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2) в дозе 2×10^{10} вирусных частиц/1 мл, 48 человек.

В качестве референса использовались образцы тех же добровольцев, взятые на 1 день исследования до вакцинации.

Оценка титра антиген-специфичного IgG в первой группе проводили на 21, 28 и 42 дни исследова-

ния, а во второй группе на 21 и 28 дни исследования.

Титр антител определяли с помощью тест-системы для иммуноферментного анализа, которая позволяет определять титр IgG к RBD домену S антигена вируса SARS-CoV-2.

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

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

Результаты определения титра RBD-специфичных IgG антител в первой группе (1×10^{10} вирусных частиц/дозу) представлено на фиг. 3. Как видно из представленных данных, титр антител, специфичных к RBD-домену S белка вируса SARS-Cov2, постепенно нарастает после проведения вакцинации, достигая максимального значения на 42 день. Реципроктное среднее геометрическое в данной точке 13192.К 42 дню исследования сероконверсия наблюдалась у всех 47 добровольцев, составляющих данную группу.

Результаты определения титра RBD-специфичных IgG антител во второй группе (2×10^{10} вирусных частиц/дозу) представлено на фиг. 4. Как видно из представленных данных, титр антител, специфичных к RBD-домену S белка вируса SARS-Cov2, постепенно нарастает после проведения вакцинации 1/5 полной терапевтической дозой вакцины для взрослых, достигая максимального значения на 42 день. Реципроктное среднее геометрическое в данной точке 19292.К 42 дню исследования сероконверсия наблюдалась у всех 49 добровольцев, составляющих данную группу.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что вакцинация детей разработанным иммунобиологическим средством способна приводить к формированию напряженного поствакцинального гуморального иммунитета.

Пример 15.

Определение эффективности иммунизации детей разработанным фармацевтическим средством, по оценке напряженности клеточного иммунитета.

В данном исследовании приняло участие 95 детей в возрасте от 12 до 18 лет. Участники исследования были разделены на две группы:

1) последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 фармацевтического средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2) в дозе 1×10^{10} вирусных частиц/1 мл, 47 человек;

2) последовательное внутримышечное введение компонента 1 и компонента 2 фармацевтического средства по варианту 1 (Ad26-CMV-S-CoV2, Ad5-CMV-S-CoV2) в дозе 2×10^{10} вирусных частиц/1 мл, 48 человек.

Напряженность клеточного иммунитета определяли путем оценки количества пролиферирующих CD4+ и CD8+ лимфоцитов периферической крови добровольцев в культуре *in vitro* после повторной рестимуляции клеток рекомбинантным S белком SARS-CoV-2. Перед иммунизацией, а также через 28 дней, у пациентов отбирали образцы крови, из которых выделяли мононуклеарные клетки методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколла (1,077 g/mL; ПанЭко). Далее выделенные клетки окрашивали флуоресцентным красителем CFSE (Invivogen, США) и высевали на лунки 96л планшета (2×10^5 кл/лунку). Затем проводили повторную стимуляцию лимфоцитов в условиях *in vitro* добавлением в культуральную среду S белка коронавируса (конечная концентрация белка 1мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген. Через 72 часа 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 T лимфоцитов CD3, CD4, CD8 (anti-CD3 Pe-Cy7 (BDBiosciences, клон SK7), anti-CD4 APC (BDBiosciences, клон SK3), anti-CD8 PerCP-Cy5.5 (BDBiosciences, клон SK1)). Пролиферирующие (с меньшим количеством красителя CFSE клеток) CD4+ и CD8+ T лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS AriaIII (BDBiosciences, США). Результирующий процент пролиферирующих клеток в каждом образце определяли путем вычитания результа-

та, полученного при анализе интактных клеток из результата, полученного при анализе клеток рестимулированных антигеном S коронавируса.

Результаты (с проведенной статистической обработкой) определения процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т лимфоцитов на 1 день (до иммунизации) и на 28 день исследования представлены на фиг. 5 и фиг. 6.

Полученные данные показали, что иммунизация детей разработанным средством в обеих выбранных дозах позволяет достоверно повысить процент пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т лимфоцитов после антигенной рестимуляции на 28 день после вакцинации.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что двукратная вакцинация детей разработанным иммунобиологическим средством способна приводить к формированию напряженного поствакцинального клеточного иммунитета.

Таким образом, представленные примеры подтверждают, что в результате проведенной работы было создано безопасное и эффективное средство, которое обеспечивает развитие реакций гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

Промышленная применимость

Все приведенные примеры подтверждают эффективность разработанных средств, обеспечивающих эффективную индукцию иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца и промышленную применимость.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение средства, содержащего компонент 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, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

2. Применение средства, содержащего компонент в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

3. Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую собой компонент 1 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 компонент 2 в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

4. Применение средства, содержащего компонент 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, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

5. Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую собой компонент 1 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 компонент 2 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, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

6. Применение средства, содержащего комбинацию, представляющую компонент 1 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 в виде экспрессионного вектора на основе генома рекомбинантного штамма human adenovirus 5-го серотипа, в котором делетированы E1 и E3 области со встроенной экспрессионной кассетой, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 у детей старше 1 месяца.

7. Применение по пп.1-6, где средство обеспечивает индукцию мукозального иммунного ответа на слизистых оболочках дыхательных путей.

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

9. Применение по п.8, отличающееся тем, что жидкая форма средства содержит буферный раствор, мас. %:

трис - от 0,1831 до 0,3432;
 хлорид натрия - от 0,3313 до 0,6212;
 сахараза - 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.

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

трис - от 0,0180 до 0,0338;
 хлорид натрия - от 0,1044 до 0,1957;
 сахараза - 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.

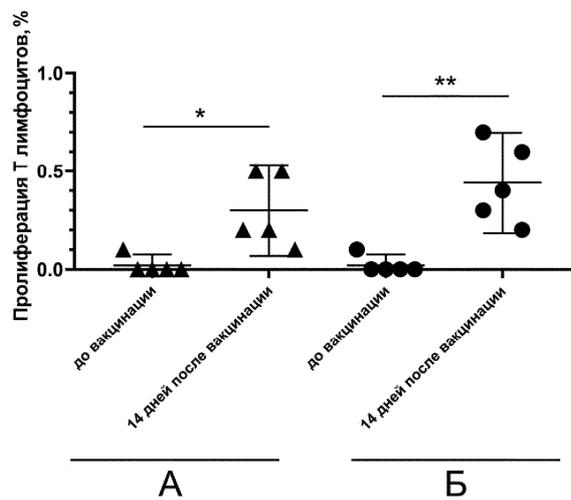
11. Применение по пп.1-10, где компонент и/или компоненты средства предназначены для интраназального и/или внутримышечного введения.

12. Применение по пп.1-10, где средство предназначено для введения в дозе $5 \cdot 10^9$ - $5 \cdot 10^{10}$ вирусных частиц.

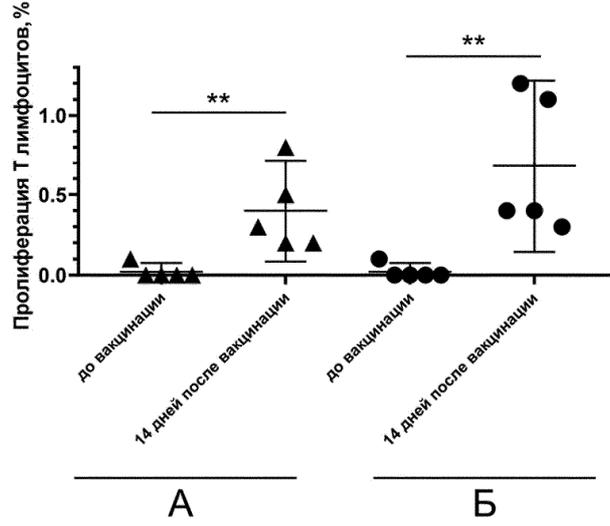
13. Применение по пп.3, 5, 6, 9, 10, где компоненты средства предназначены для последовательного введения с интервалом более 1 недели.

14. Применение по пп.3, 5, 6, 9, 10, где компоненты средства предназначены для одновременного введения.

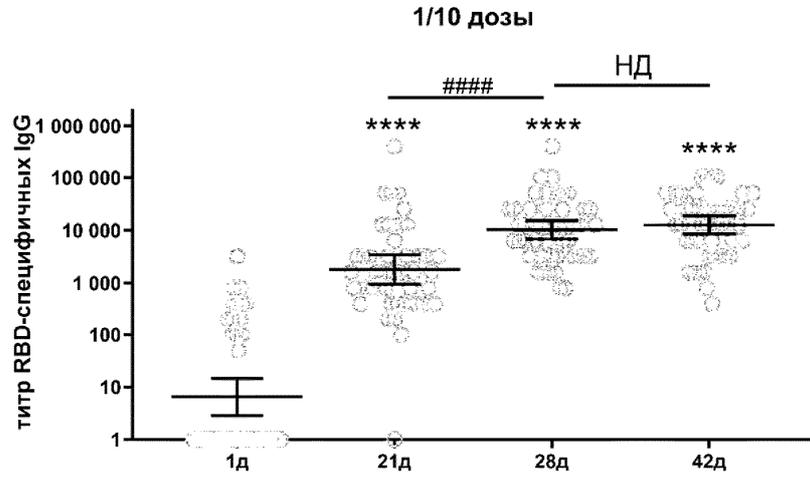
15. Применение по пп.3, 5, 6, 9, 10, отличающееся тем, что компоненты находятся в разных упаковках.



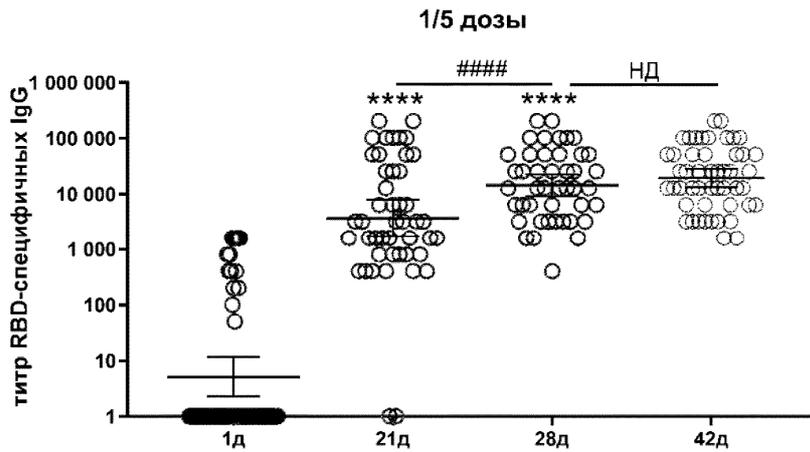
Фиг. 1



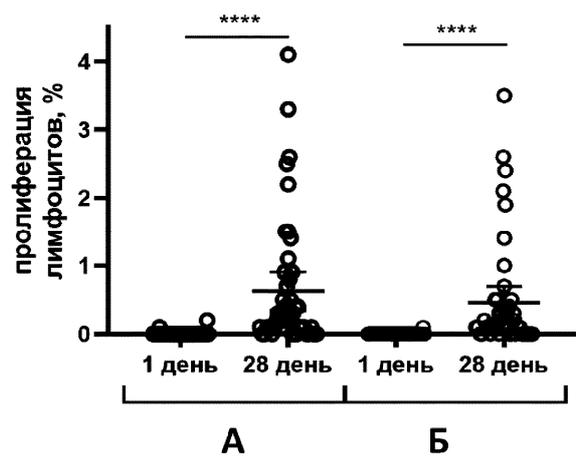
Фиг. 2



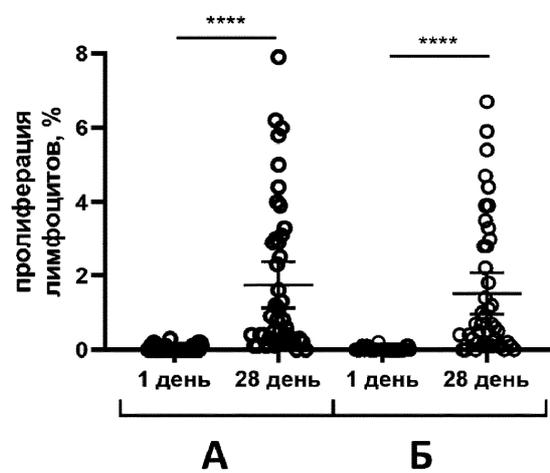
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

