(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292199 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.03

(22) Дата подачи заявки
2021.01.30

(51) Int. Cl. *C07K 14/005* (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ КОРОНАВИРУСА - ВАКЦИНЫ SARS-CoV-2

(31) **62/969,008; 62/994,630; 63/014,467; 63/025,782; 62/705,187; 62/705,308; 63/043,090; 62/706,366; 63/066,147; 62/706,676; 62/706,937; 62/706,958; 63/198,089; 63/198,306; 63/112,900; 3101131; 63/121,482; 63/133,969; 63/135,182; 63/141,913; 63/142,977**

(32) **2020.01.31; 2020.03.25; 2020.04.23; 2020.05.15; 2020.06.15; 2020.06.21; 2020.06.23; 2020.08.12; 2020.08.14; 2020.09.02; 2020.09.18; 2020.09.21; 2020.09.28; 2020.10.09; 2020.11.12; 2020.11.28; 2020.12.04; 2021.01.05; 2021.01.08; 2021.01.26; 2021.01.28**

(33) **US; US; US; US; US; US; US; US; US; US; US; US; US; US; US; CA; US; US; US; US; US**

(86) **PCT/US2021/015946**

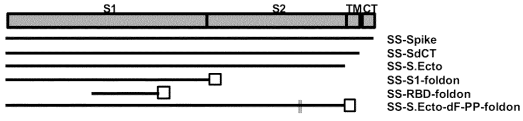
(87) **WO 2021/155323 2021.08.05**

(71) Заявитель:
БЕТ ИЗРАЭЛ ДИКОНЕСС МЕДИКЛ СЕНТЕР, ИНК.; ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Баруш Дэн Х., Лангедейк Йоханнес Петрус Мария, Раттен Люси, Баккерс Марк Йоханнес Герандус, Бос Ринке, Вегман Франк, Зёйдгест Давид Адрианус Теодорус, Вандебос Ан, Ле Гар Матьё Клод Мишель, Сейдофф Джералд К. (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении описаны иммуногенные композиции и вакцины, содержащие белок или полинуклеотид коронавируса (например, коронавирус Юхань (2019-nCoV, называемый также SARS-CoV-2)), кодирующий белок коронавируса (например, коронавирус Юхань (2019-nCoV, называемый также SARS-CoV-2)), и их применение. В изобретении предлагаются также способы лечения и/или профилактики инфицирования от коронавируса (например, коронавирус Юхань (2019-nCoV, называемый также SARS-CoV-2)) при введении иммуногенной композиции или вакцины субъекту (например, человеку). В заявке также описаны способы детектирования или контроля защитного антительного ответа (например, антительного ответа против 2019-nCoV, например ответа, нейтрализующего шиповидный белок) против коронавируса (например, коронавирус Юхань (2019-nCoV, называемый также SARS-CoV-2). В настоящей заявке описаны также изолированная нуклеиновая кислота и/или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая S белок коронавируса, прежде всего S белок SARS-CoV-2, и также S белки коронавируса, и применение указанных нуклеиновых кислот и/или белков для получения вакцины.



202292199 A1

202292199 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ КОРОНАВИРУСА – ВАКЦИНЫ SARS-COV-2

Введение

Изобретение относится к области вирусологии и медицины. Прежде всего изобретение относится к вакцинам для предотвращения заболевания, вызванного SARS-CoV-2.

Перекрестные ссылки на родственные заявки

В настоящем изобретении испрашивается приоритет на следующие заявки: предварительная заявка США No. 62/969008, поданная 31 января 2020, предварительная заявка США No. 62/994630, поданная 25 марта 2020, предварительная заявка США No. 63/014467, поданная 23 апреля 2020, предварительная заявка США No. 63/025782, поданная 15 мая 2020, предварительная заявка США No. 62/705187, поданная 15 июня 2020, предварительная заявка США No. 62/705308, поданная 21 июня 2020, предварительная заявка США No. 63/043090, поданная 23 июня 2020, предварительная заявка США No. 62/706366, поданная 12 августа 2020, предварительная заявка США No. 63/066147, поданная 14 августа 2020, предварительная заявка США No. 62/706676, поданная 2 сентября 2020, предварительная заявка США No. 62/706937, поданная 18 сентября 2020, предварительная заявка США No. 62/706958, поданная 21 сентября 2020, предварительная заявка США No. 63/198089, поданная 28 сентября 2020, предварительная заявка США No. 63/198306, поданная 9 октября 2020, предварительная заявка США No. 63/112900, поданная 12 ноября 2020, заявка на выдачу патента Канады No. 3101131, поданная 28 ноября 2020, предварительная заявка США No. 63/121482, поданная 4 декабря 2020, предварительная заявка США No. 63/133969, поданная 5 января 2021, предварительная заявка США No. 63/135182, поданная 8 января 2021, предварительная заявка США No. 63/141913, поданная 26 января 2021, предварительная заявка США No. 63/142977, поданная 28 января 2021. Каждая заявка включена в виде ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, которые представлены в электронном виде в формате ASCII и включены в полном объеме в настоящее описание в виде ссылок. Копия ASCII, название CRU6043WOPCT, размером 1.36 MB создана 29 января 2021.

Заявление в отношении исследования, финансированного при поддержке правительства

Настоящее изобретение было создано при поддержке правительства в соответствии с Соглашением HHSO100201700018C, заключенным с министерством здравоохранения (HHS) и соцобеспечения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Предпосылки создания настоящего изобретения

SARS-CoV-2 представляет собой коронавирус, который был впервые обнаружен в конце 2019 года в районе Ухань в Китае. SARS-CoV-2 является бета-коронавирусом, как и MERS-CoV и SARS-CoV, при этом все они происходят от летучих мышей. В настоящее время доступно несколько последовательностей от нескольких пациентов из США, Китая и других стран, что предполагает вероятное единичное недавнее происхождение этого вируса от животных-носителей инфекции. Это вызванное вирусом заболевание получило название «коронавирусное заболевание 2019 года», сокращенно COVID-19. Симптомы COVID-19 варьируют от легких симптомов до тяжелого заболевания и летального исхода в случае подтвержденного случая COVID-19.

Как указано выше, SARS-CoV-2 характеризуется строгим генетическим сходством с коронавирусами летучих мышей, от которых он, вероятно, произошел, хотя считается, что в этом участвует промежуточный резервуарный хозяин, такой как ящер (панголин). С таксономической точки зрения SARS-CoV-2 классифицируется как штамм коронавирусов, связанных с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS).

Коронавирусы представляют собой оболочечные РНК-содержащие вирусы. Основным поверхностным белком является большой трехмерный шиповидный гликопротеин (S), который опосредует связывание с рецепторами клетки-хозяина, а также слияние мембран вируса и клетки-хозяина. Белок S состоит из N-концевой субъединицы S1 и C-концевой субъединицы S2, ответственных за связывание с рецептором и слияние с мембраной, соответственно. Данные

недавней крио-ЭМ-реконструкции трехмерных S-структур CoV альфа-, бета- и дельта-коронавирусов свидетельствуют о том, что субъединица S1 состоит из двух отдельных доменов: N-концевого домена (S1 NTD) и связывающегося с рецептором домена (RBD S1). SARS-CoV-2 использует свой RBD S1 для связывания с ангиотензин превращающим ферментом 2 (ACE2) человека.

Быстрое распространение пандемии COVID-19 привело к тому, что разработка вакцины против SARS-CoV-2 стала глобальным приоритетным направлением всемирной организации здравоохранения. С тех пор как новый вирус SARS-CoV-2 был впервые обнаружен у людей в конце 2019 года, более 8 миллионов человек были инфицированы, а сотни тысяч умерли в результате COVID-19. В настоящее время в целом не существуют методов эффективного лечения SARS-CoV-2 и коронавирусов, что приводит к значительной неудовлетворенной медицинской потребности. Кроме того, в настоящее время не существует вакцины для предотвращения заболевания, вызванного коронавирусом (COVID-19). Лучший способ предотвращения заболевания в настоящее время заключается в исключении контакттрования с этим вирусом. Поскольку возникающие инфекционные заболевания, такие как COVID-19, представляют серьезную угрозу для общественного здравоохранения, существует острая необходимость в новых вакцинах, которые можно использовать для предотвращения респираторных заболеваний, вызванных коронавирусом.

Уханьский коронавирус (2019-nCoV, также называемый SARS-CoV-2) представляет собой коронавирус, который стал причиной беспрецедентной текущей эпидемии в Китае. Известно, что 2019-nCoV вызывает респираторные симптомы и лихорадку, которые могут привести к летальному исходу.

Всемирная организация здравоохранения объявила вспышку 2019-nCoV чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение, 30 января 2020 года и подтвердила более 11 000 случаев заболевания в 16 странах. Хотя быстрая разработка безопасной и эффективной вакцины против 2019-nCoV является глобальным приоритетным направлением здравоохранения, в настоящее время очень мало известно об иммунологии и механизмах иммунной защиты 2019-nCoV.

Соответственно существует острая необходимость в области способов терапии 2019-nCoV.

Краткое описание изобретения

При исследовании, которое привело к настоящему изобретению, были сконструированы определенные стабилизированные S белки SARS-CoV-2, которые, как было установлено, можно использовать в качестве иммуногенов для индукции защитной ответной реакции иммунитета против SARS-CoV-2.

В настоящем изобретении предлагается изолированная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, которая кодирует шиповидный S белок 2019-NCOV (также названный в данном контексте S белок SARS-CoV-2), включающая следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а) стабилизирующие мутации аминокислотных остатков пролина в положении 986 и 987,

б) мутации участка расщепления фурином SEQ ID NO: 90).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такие мутации представляют собой только мутации последовательности SEQ ID NO: 29. В других вариантах изолированная молекула нуклеиновой кислоты кодирует шиповидный S белок 2019-NCOV, который включает следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в) делецию сигнальной последовательности.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая белок S 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (SEQ ID NO: 219), предпочтительно опосредует немедленно ранний промотер CMV. В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая S белок 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), включающему по меньшей мере один мотив оператора тетрациклина (TetO). В определенных вариантах промотер CMV, включающий по меньшей мере один мотив TetO, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 219. В еще одних вариантах промотер CMV состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 219. Эти нуклеиновые кислоты обычно формируют часть вектора.

Таким образом в одном объекте настоящее изобретение относится также к изолированным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим стабилизированный S белок коронавируса, прежде всего белок SARS-CoV-2, причем нуклеиновые кислоты, включающие нуклеотидную последовательность.

выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 211-218 или их фрагментов.

В предпочтительном варианте настоящего изобретения предлагается изолированная и/или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая стабилизированный S белок коронавируса, прежде всего S белок SARS-CoV-2, причем указанная нуклеиновая кислота включает нуклеотид SEQ ID NO: 211 или его фрагменты.

В настоящем изобретении предлагается изолированный шиповидный S белок 2019-NCOV (также названный в данном контексте S белок SARS-CoV-2), включающий следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а) стабилизирующие мутации аминокислотных остатков пролина в положении 986 и 987 и

б) мутации участка расщепления фурином SEQ ID NO: 90).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения такие модификации представляют собой только мутации последовательности SEQ ID NO: 29. В других вариантах изолированный S белок 2019-NCOV включает следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в) делецию сигнальной последовательности.

В другом объекте изобретение относится к изолированным и/или рекомбинантным S белкам коронавируса, включающим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 205-210 или их фрагментов, а также к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие S белки коронавируса или их фрагменты.

В предпочтительном варианте изобретение относится к изолированным и/или рекомбинантным S белкам коронавируса, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 или их фрагментов, а также к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие S белки коронавируса или их фрагменты.

В еще одном объекте изобретение относится к векторам, включающим такие нуклеиновые кислоты. В определенных вариантах вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26.

В другом объекте изобретение относится к композициям и вакцинам, включающим такие нуклеиновые кислоты, белки и/или векторы.

В другом объекте изобретение относится к способам вакцинации субъекта против COVID-19, причем способ включает введение субъекту вакцины или композиции по настоящему изобретению.

В другом объекте изобретение относится к изолированной клетке-хозяина, включающей рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок SARS-CoV-2 или его фрагмент.

В другом объекте изобретение относится к способам получения вакцины против COVID-19, включающим обеспечение рекомбинантным аденовирусом человека серотипа 26, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагменты, размножение указанного рекомбинантного аденовируса в культуре клеток-хозяина, выделение и очистку рекомбинантного аденовируса, и включение рекомбинантного аденовируса в состав фармацевтически приемлемой композиции. Рекомбинантный аденовирус человека по данному объекту может представлять собой любой аденовирус, описанный в данном контексте.

В другом объекте изобретение относится к изолированной рекомбинантной нуклеиновой кислоте, которая формулирует геном рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагменты. Аденовирус может также представлять собой любой аденовирус, описанный выше в вариантах осуществления настоящего изобретения.

Изобретение также относится к композиции для применения при предотвращении молекулярно подтвержденного от умеренной до тяжелой/критической степени заболевания COVID-19 у субъекта, нуждающегося в таком предотвращении, включающем введение субъекту композиции или иммуногенной композиции по изобретению, как описано в данном контексте, где композицию вводят в дозе 5×10^{10} вирусных частиц (вч) в схеме однократной дозы (т.е. в режиме одной дозы).

В настоящем изобретении представлены оптимизированные и/или не встречающиеся в природе молекулы и полипептиды нуклеиновых кислот коронавируса (например, 2019-nCoV) для создания ДНК- или РНК-вакцин, антител и иммуногенных композиций и их применение в способах предотвращения, снижения и/или лечения коронавирусной (например, 2019-

nCoV) инфекции у субъекта (например, субъекта-млекопитающего (например, человека)).

В одном объекте изобретения представлена изолированная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 85% идентична аминокислотной последовательности любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84. В некоторых вариантах осуществления: а) полипептид способен вызывать иммунный ответ у субъекта; или б) полипептид характеризуется по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности или в отношении любой полипептидной последовательности SEQ ID NO: 1-84. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления полипептид характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51.

В другом объекте изобретения представлена изолированная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична полноразмерной или части любой последовательностей SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204 или их комплементарным последовательностям. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты характеризуется идентичностью по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% в отношении нуклеотидной последовательности любой из последовательностей SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты или ее часть способна вызывать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 195. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 143. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 204. В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью нуклеотидов 19-3837 SEQ ID NO: 204. В другом объекте предлагается изолированный полипептид, включающий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85% к

полноразмерной или части любой последовательности SEQ ID NO: 1-84. В некоторых вариантах указанный полипептид характеризуется идентичностью аминокислотной последовательности по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, или любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-84. В некоторых вариантах полипептид или его часть способны вызывать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах полипептид характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах полипептид характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51.

В другом объекте предлагается изолированный вектор, включающий одну или более указанных выше молекул нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах вектор представляет собой репликационно-дефектный вектор (например, отсутствует область E1, E3 и/или E4). В некоторых вариантах вектор представляет собой вектор млекопитающих, бактериальный или вирусный вектор. В некоторых вариантах вектор представляет собой экспрессионный вектор. В некоторых вариантах вирусным вектором является вирус, выбранный из группы, состоящей из ретровируса, аденовируса, адено-ассоциированного вируса, парвовируса, коронавируса, отрицательно-цепочечных РНК вирусов, ортомиксовируса, рабдовируса, парамиксовируса, положительно-цепочечных РНК вирусов, пикорнавируса, альфавируса, двухцепочечных ДНК вирусов, вирусов герпеса, вируса Эпштейна-Барра, цитомегаловируса, вируса оспы кур и вируса оспы канареек. В некоторых вариантах вектором является аденовирус. В других вариантах аденовирус выбирают из группы, состоящей из Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52, Ad59 и Pan9. В некоторых вариантах Ad52 представляет собой Ad52-резус или Ad59 представляет собой Ad59-резус. В некоторых вариантах осуществления аденовирус представляет собой Ad26. В других вариантах осуществления аденовирус представляет собой вектор Ad26, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью 19-3837 SEQ ID NO: 204 или полноразмерной нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 204. В другом варианте осуществления аденовирус представляет собой вектор Ad26, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид с идентичностью по меньшей мере на 85% или более (например, 90%, 95%, 99% или 100%) в отношении последовательности полипептида SEQ ID NOL 51.

В другом объекте предлагается изолированное антитело, которое специфически связывается с любым из указанных выше полипептидов. В некоторых вариантах антитело генерируют при иммунизации млекопитающего нуклеиновой кислотой, полипептидом или вектором. В некоторых вариантах млекопитающим является человек, крупный рогатый скот, коза, мышь или кролик. В некоторых вариантах антитело является гуманизированным. В некоторых вариантах антителом является IgG. В некоторых вариантах антитело представляет собой бис-Fab, Fv, Fab, Fab'-SH, $F(ab')_2$, диатело, линейное антитело или scFV.

В другом объекте предлагается способ продуцирования антитела против Уханьского коронавируса anti-2019-Wuhan (2019-nCoV), включающий введение некоторого количества молекулы нуклеиновой кислоты, полипептида и/или вектора субъекту, достаточного для индукции продуцирования нейтрализующей антисыворотки после введения указанному субъекту.

В другом объекте предлагается изолированное антитело anti-2019-nCoV, продуцированное любым из указанных выше способов. В некоторых вариантах антитело связывается с эпитопом в составе любой из последовательностей SEQ ID NO 1-84.

В другом объекте предлагается композиция, включающая молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, векторы или антитело. В некоторых вариантах композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. В некоторых вариантах композиция дополнительно включает адъювант или иммуностимулятор.

В еще одном объекте предлагается иммуногенная композиция, включающая молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор или антитело. В некоторых вариантах иммуногенная композиция представляет собой вакцину. В некоторых вариантах иммуногенная композиция способна излечивать или снижать риск инфицирования коронавирусом (например, инфекции 2019-nCoV) у субъекта, нуждающегося в таком лечении. В некоторых вариантах иммуногенная композиция индуцирует продуцирование нейтрализующей антисыворотки anti-2019-nCoV после введения указанному субъекту. В некоторых вариантах субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах млекопитающим является человек. В некоторых вариантах человек страдает от сопутствующего хронического заболевания. В некоторых вариантах осуществления

сопутствующее хроническое заболевание представляет собой гипертонию, диабет или сердечно-сосудистое заболевание.

В другом объекте предлагается способ идентификации, диагностики и/или прогнозирования восприимчивости субъекта к коронавирусной инфекции, включающий определение наличия у субъекта защитного уровня антикоронавирусного антитела (такого как антитело против шиповидного белка) в образце субъекта, причем предпочтительно защитный уровень представляет собой: i) уровень, при котором титр равен или выше титра по меньшей мере приблизительно 70 по данным анализа нейтрализации псевдовируса, ii) уровень, при котором титр равен или выше титра по меньшей мере приблизительно 25 по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, или (iii) уровень, который составляет по меньшей мере 80% медианного уровня антикоронавирусного антитела в когорте выздоравливающих пациентов по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса. В некоторых вариантах защитный уровень антикоронавирусного антитела представляет собой уровень, достаточный для предотвращена или снижении развития тяжелой степени заболевания. В некоторых вариантах способ дополнительно включает введение эффективного количества композиции или иммуногенной композиции субъекту, у которого содержание антикоронавирусного антитела находится ниже защитного уровня антикоронавирусного антитела. В некоторых вариантах способ дополнительно включает идентификацию подкласса и/или эффекторной функции антикоронавирусного антитела (например, антитела против шиповидного белка). В некоторых вариантах подклассом является IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 или FcgR2A. В некоторых вариантах эффекторная функция представляет собой антитело-зависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антитело-зависимое отложение комплемента (ADCD), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP) или антитело-зависимую активацию NK клеток. В некоторых вариантах образцом является жидкость из организма субъекта, где предпочтительно жидкость из организма представляет собой кровь. В некоторых вариантах коронавирусом является 2019-nCoV.

В другом объекте предлагается способ лечения или снижения риска коронавирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в таком лечении, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества композиции

или иммуногенной композиции указанному субъекту. В некоторых вариантах способ дополнительно включает измерение уровня антикоронавирусного антитела (например, антитела против шиповидного белка) у субъекта. В некоторых вариантах уровень антикоронавирусного антитела у субъекта измеряют до и/или после введения. В некоторых вариантах уровень антикоронавирусного антитела у субъекта измеряют один или более раз приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 недель, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев, 1, 2, 3, 4 или 5 лет после введения. В некоторых вариантах уровень антикоронавирусного антитела у субъекта находится ниже защитного уровня, и при этом способ дополнительно включает повторное введение композиции или иммуногенной композиции или введение другой антикоронавирусной композиции указанному субъекту. В некоторых вариантах защитный уровень составляет уровень, достаточный для снижения симптомов или продолжительности опосредованного коронавирусом заболевания. В некоторых вариантах защитный уровень составляет уровень, достаточный для предотвращения или снижения развития тяжелой степени заболевания (например, которая может характеризоваться потерей массы тела (например, снижение массы тела по меньшей мере приблизительно на 5% (например, по меньшей мере приблизительно на 7,5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 12,5%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25% или более) по сравнению с исходной массой тела субъекта до инфицирования), для предотвращения развития пневмонии и/или дыхательной недостаточности и/или повышенного риска летального исхода). В некоторых вариантах защитный уровень составляет i) уровень, при котором титр равен или выше титра по меньшей мере приблизительно 70 по данным анализа нейтрализации псевдовируса, ii) уровень, при котором титр равен или выше титра по меньшей мере приблизительно 25 по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, или (iii) уровень, который составляет по меньшей мере 80% медианного уровня антикоронавирусного антитела в когорте выздоравливающих пациентов по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса. В некоторых вариантах коронавирусом является 2019-nCoV. В некоторых вариантах способ дополнительно включает измерение вирусной нагрузки коронавируса (например,

2019-nCoV) в образце, взятом у субъекта. В некоторых вариантах образец представляет собой бронхоальвеолярный лаваж (BAL) или мазок из носа (NS). В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой жидкость из организма (например, кровь, например, цельную кровь или плазму) субъекта. В некоторых вариантах образец представляет собой образец ткани (например, образец ткани дыхательных путей) субъекта. В некоторых вариантах вирусная нагрузка представляет собой детектируемый уровень нуклеиновой кислоты (например, субгеномной иРНК) или детектируемый уровень белка (например, уровень нуклеокапсидного белка (N)). В некоторых вариантах детектируемую нуклеиновую кислоту (например, субгеномную иРНК (sgmPHK) определяют с использованием РНК-секвенирования, количественной ОТ-кПЦР, кПЦР, мультиплексной кПЦР или ОТ-кПЦР, LAMP, микрочипового анализа или гибридизации (например, ISH (например, FISH)). В некоторых вариантах детектируемый белок (например, нуклеокапсидный белок (N)) определяют с помощью иммунологического анализа (например, иммуногистохимического (IHC) анализа или иммунохроматографического анализа). В некоторых вариантах детектируемая вирусная нагрузка указывает на то, что субъект предрасположен к заболеванию (например, заболеванию, опосредованному 2019-nCoV, например, COVID-19, например, заболеванию тяжелой степени COVID-19). В некоторых вариантах вирусная нагрузка по меньшей мере более приблизительно 3,85 $\log_{10}$ sgmPHK копий/мл в образце BAL или 3,78 $\log_{10}$ sgmPHK копий/мл в образце NS означает, что субъект предрасположен к заболеванию (например, 2019-nCoV-опосредованное заболевание, например, COVID-19, например, тяжелая степень заболевания COVID-19). В некоторых вариантах вирусная нагрузка по меньшей мере более приблизительно 3,85 $\log_{10}$ sgmPHK копий/мл в образце BAL или 3,78 $\log_{10}$ sgmPHK копий/мл в образце NS означает, что субъект предположен к тяжелой степени заболевания COVID-19.

В некоторых вариантах вирусная нагрузка по меньшей мере более приблизительно 2,0 $\log_{10}$ sgmPHK копий/г ткани указывает, что субъект предположен к тяжелой степени заболевания COVID-19. В некоторых вариантах вирусная нагрузка более приблизительно 8,0 $\log_{10}$ sgmPHK копий/г ткани легких, более приблизительно 7,0 $\log_{10}$ sgmPHK копий/г ткани ноздрей, приблизительно 6,0 $\log_{10}$ sgmPHK копий/г ткани трахеи, приблизительно 5,5 $\log_{10}$ sgmPHK копий/г ткани сердца или приблизительно 2,0 $\log_{10}$ sgmPHK копий/г ткани

желудочно-кишечного тракта, селезенки, печени, почек или мозга указывает на то, что субъект предположен к тяжелой степени заболевания COVID-19. В некоторых вариантах вирусная нагрузка более приблизительно 3% SARS-CoV-2 вРНК при окрашивании методом ISH означает, что субъект предположен к заболеванию. В некоторых вариантах вирусная нагрузка более приблизительно 5% SARS-CoV-2 вРНК при окрашивании методом ISH означает, что субъект предположен к заболеванию тяжелой степени COVID-19. В некоторых вариантах вирусную нагрузку коронавируса (например, 2019-nCoV) измеряют один или более раз приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 недель после инфицирования. В некоторых вариантах субъекту, определенному как предрасположенный к заболеванию (например, 2019-nCoV-опосредованное заболевание, например, COVID-19, например, тяжелая степень заболевания COVID-19), вводят композицию или иммуногенную композицию по настоящему изобретению в отдельности или в комбинации с дополнительным терапевтическим препаратом.

В другом объекте предлагается способ снижения опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции или иммуногенной композиции указанному субъекту. В некоторых вариантах терапевтически эффективное количество является достаточным для достижения логарифма титра антител против шиповидного белка в сыворотке более 2 у субъекта по данным измерения методом анализа ИФА. В некоторых вариантах терапевтически эффективное количество находится в интервале от 15 мкг до 300 мкг композиции или иммуногенной композиции. В некоторых вариантах активность представляет собой титр вируса, распространениевируса, инфицирование или слияние с клетками вируса. В некоторых вариантах титр вируса снижается после введения композиции или иммуногенной композиции. В некоторых вариантах титр вируса снижается на 25% или более. В некоторых вариантах титр вируса снижается на 50% или более. В некоторых вариантах титр вируса снижается на 75% или более. В некоторых вариантах коронавирус не детектируется после указанного введения. В некоторых вариантах введение осуществляют перед контактированием с коронавирусом. В некоторых вариантах введение осуществляют по меньшей мере за 1 ч до контактирования с указанным

коронавирусом. В некоторых вариантах введение осуществляют по меньшей мере за 1 неделю, 1 месяц или 1 год до контактирования с указанным коронавирусом. В некоторых вариантах введение осуществляют после контактирования с коронавирусом. В некоторых вариантах введение осуществляют по меньшей мере через 15 мин после контактирования с указанным коронавирусом. В некоторых вариантах введение осуществляют по меньшей мере через 1 ч, 1 день, 1 неделю после контактирования с указанным коронавирусом. В некоторых вариантах субъекту вводят по меньшей мере 1 дозу молекулы нуклеиновой кислоты, полипептида, вектора, композиции, иммуногенной композиции и антитела. В некоторых вариантах субъекту вводят по меньшей мере 2 дозы. В некоторых вариантах молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор, композицию или иммуногенную композицию вводят указанному субъекту в режиме примирования, стимулирования или примирования/стимулирования иммунной системы. В некоторых вариантах молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор, композицию, иммуногенную композицию или антитело вводят внутримышечным, внутривенным, внутрикожным, чрескожным, внутриартериальным, внутрибрюшинным методом, внутрь очага поражения, внутричерепным, внутрисуставным, внутрь предстательной железы, внутриплевральным, внутритрахеальным, интраназальным, интравитреальным, интравагинальным, интраректальным, местным способами, внутрь опухоли, перитонеальным, подкожным, субконъюнктивальным, внутрипузырным, в слизистую оболочку, внутриперикардиальным, внутрипупочным, внутриглазным, пероральным, локальным способами, с использованием ингаляции, инъекции, вливания, непрерывного вливания, местного вливания, непосредственного омывания клетки-мишени, с использованием катетера, лаважа, через желудочный зонд, в виде кремов или липидных композиций. В некоторых вариантах молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор, композицию, иммуногенную композицию или антитело вводят внутримышечным способом. В некоторых вариантах субъектом является человек. В некоторых вариантах человек страдает от сопутствующего хронического заболевания. В некоторых вариантах сопутствующее хроническое заболевание представляет собой гипертонию, диабет или сердечно-сосудистое заболевание. В некоторых вариантах способ ускоряет развитие иммунного ответа у указанного субъекта. В некоторых

вариантах иммунный ответ представляет собой гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления гуморальный иммунный ответ представляет собой ответ IgG.

В другом объекте предлагается композиция для применения при лечении или снижении коронавирусной инфекции, такой как инфекция 2019-nCoV, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, причем композиция включает терапевтически эффективное количество композиции или иммуногенной композиции. В другом объекте предлагается композиция для применения при снижении опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, причем указанная композиция включает терапевтически эффективное количество композиции или иммуногенной композиции.

В другом объекте предлагается способ приготовления иммуногенной композиции для лечения или снижения риска инфекции коронавируса (например, 2019-nCoV) у субъекта, нуждающегося в таком лечении, причем указанный способ включает следующие стадии: (а) смешивание по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, полипептида, вектора, композиции и антитела с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем, при этом получают иммуногенную композицию, и (б) помещение иммуногенной композиции в контейнер.

В другом объекте предлагается набор, включающий: (а) первый контейнер, включающий по меньшей мере один из следующих компонентов: молекула нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор, композиция, иммуногенная композиция и антитело, (б) второй контейнер, включающий фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. В некоторых вариантах первый контейнер дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель. Набор необязательно включает адъювант и/или иммуностимулятор.

В другом объекте предлагается набор, включающий один или более реагентов для определения присутствия антитела против коронавируса (такого как антитело против шиповидного белка) в образце (например, в образце крови) у субъекта и инструкции для идентификации, диагностирования и/или выявления предрасположенности субъекта к инфекции коронавируса. В некоторых вариантах набор дополнительно включает реагенты для

идентификации подкласса и/или эффекторной функции антитела против коронавируса. В некоторых вариантах набор дополнительно включает стандартные препараты или образцы для сравнения.

Краткое описание фигур

Прилагаемые фигуры включены для иллюстрации вариантов осуществления изобретения и дополнительного более полного понимания его вариантов. Представленное выше краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения будут лучше понятны при прочтении в сочетании с прилагаемыми фигурами. Следует понимать, что изобретение не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на фигурах.

Файл патента или заявки содержит как минимум одну фигуру, выполненную в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветной/ными) фигурой(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

На фиг. 1 представлена схема иммуногенов шиповидного белка. Указанные домены шиповидного белка 2019-nCoV Spike (SEQ ID NO: 1) включающие домены S1 (SEQ ID NO: 4), S2 (аминокислотные остатки 665-1191 SEQ ID NO: 1), TM (SEQ ID NO: 86), и CT (SEQ ID NO: 85). Отмечены следующие белки-иммуногены (SEQ ID NO: 1), SdCT (SEQ ID NO: 2), S.Ecto (SEQ ID NO: 3), S1-foldon (домен сборки) (SEQ ID NO: 9), RBD-foldon (SEQ ID NO: 10) и S.Ecto-PP-foldon (SEQ ID NO: 22). Неокрашенные прямоугольники означают домен, а две пересекающие линии в домене S.Ecto-PP-foldon (foldon=домен сборки) означают приблизительное положение двух стабилизирующих мутаций (замещение пролина в соответствующих положениях аминокислотных остатков K969 и V970 SEQ ID NO: 1.

На фиг. 2 представлен вестерн-блот распознавания рекомбинантных белков 2019-nCoV с использованием поликлональнальной антисыворотки anti-SARS. Клеточные лизаты (левая панель) и супернатанты (правая панель) из клеток, трансфектированных ДНК, кодирующей SS-Spike (трек 1), SS-SdCT (трек 2), SS-S.Ecto (трек 3) и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (трек 4), исследовали с использованием поликлональной антисыворотки anti-SARS. Пронумерованные черные линии слева от каждого пятна указывают приблизительную молекулярную массу в кДа, а числа в верхней части каждого пятна указывают номер дорожки.

На фиг. 3 представлен график, на котором показано распознавание полноразмерного шиповидного белка Spike антителами, продуцированными у мышей, вакцинированных 2019-nCoV. Сыворотку отбирали у мышей через 4 недели после вакцинации ДНК, кодирующей SS-Spike (трек 1), SS-SdCT (трек 2), SS-S.Ecto (трек 3), SS-S1-foldon (трек 4), SS-RBD-foldon (трек 5) и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (трек 6), и анализировали методом ИФА с использованием полноразмерного шиповидного белка (SEQ ID NO: 1). Серые столбцы соответствуют среднему титру ИФА.

На фиг. 4 представлен график, на котором показано распознавание белка S.dTM.PP антителами, продуцированными у мышей, вакцинированных 2019-nCoV. Сыворотку отбирали у мышей через 4 недели после вакцинации ДНК, кодирующей SS-Spike (трек 1), SS-SdCT (трек 2), SS-S.Ecto (трек 3), SS-S1-foldon (трек 4), SS-RBD-foldon (трек 5) и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (трек 6), и анализировали методом ИФА с использованием полноразмерного эктодомена S.Ecto-PP (SEQ ID NO: 19). Серые столбцы соответствуют среднему титру ИФА.

На фиг. 5 представлен график, на котором показана нейтрализующая активность антител, продуцированных у мышей, вакцинированных 2019-nCoV. Сыворотку отбирали у мышей через 4 недели после вакцинации ДНК, кодирующей SS-Spike (трек 1), SS-SdCT (трек 2), SS-S.Ecto (трек 3), SS-S1-foldon (трек 4), SS-RBD-foldon (трек 5) и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (трек 6), и использовали в анализе нейтрализации шиповидного белка псевдовируса 2019-nCoV in vitro. Серые столбцы соответствуют среднему титру ИФА.

На фиг. 6A-6E представлены графики, на которых показаны гуморальные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Гуморальные иммунные ответы оценивали после иммунизации: (фиг. 6A) методом связывания антител ИФА, (фиг. 6B) методом нейтрализации псевдовируса и (фиг. 6C) методом нейтрализации жизнеспособного вируса. (Фиг. 6D). Сравнение титров нейтрализации псевдовируса у вакцинированных макак (все животные и группы SS-Spike/SS-SdCT), когорта 9 выздоравливающих макак и когорта 27 выздоравливающих людей из Бостона, которые выздоровели от инфекции 2019-nCoV. Показаны (фиг. 6E) S- и RBD-специфичческий антитело-зависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антитело-зависимое отложение комплемента (ADCD), антитело-зависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCD) и антитело-зависимая активация NK клеток (секреция IFN-γ, дегрануляция CD107a

и экспрессия MIP-1β). Лепестковые диаграммы показывают распределение характеристик антител по вакцинированным группам. Размер и интенсивность цвета клиньев указывают на медиану признака для соответствующей группы (синий цвет обозначает функции антител, красный цвет обозначает связывание изотипа/подкласса антитела/FcγR). График анализа основных компонентов (PCA) показывает многомерные профили антител по группам. Каждая точка представляет животное, цвет точки обозначает группу, а эллипсы показывают распределение групп с доверительным интервалом 70%, причем предполагается многомерное нормальное распределение. Красные столбцы отражают средние ответы. Пунктирные линии отражают предел обнаружения анализа.

На фиг. 7A-7B представлены графики, на которых показаны клеточные иммунные ответы у вакцинированных макак-резус. Клеточные ответы оценивали после иммунизации: (фиг. 7A) методом IFN-γ ELISPOT, на фиг. 7B показаны данные многопараметрического анализа при окрашивании внутриклеточных цитокинов в ответ на S пептидные фракции. Красные столбцы означают средние ответы.

На фиг. 8A-8D представлены графики, на которых показаны вирусные нагрузки у зараженных вирусом 2019-nCoV макак резус, которых заражали интраназальным и интратрахеальным способами с использованием 2019-nCoV в дозе $1,2x10^{12}$ вч ($1,1x10^{4}$ бляшкообразующих единиц (PFU)). (Фиг. 8A) Log_{10} копий sgmРНК/мл или копий/мазок (предел 50 копий/мл) оценивали в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) и назальных мазков (NS) у контрольных животных (плацебо) через несколько моментов времени после заражения. (Фиг. 8B) Log_{10} копий sgmРНК/мл в образцах BAL и (фиг. 8C) log10 копий sgmРНК/мазок в образце NS у вакцинированных животных. (Фиг. 8D) Пиковые вирусные нагрузки в образцах BAL и NS после заражения. Красные линии отражают среднюю вирусную нагрузку. P-значения означают данные двустороннего анализа Манна-Уитни.

На фиг. 9A-9C представлены графики, на которых показана иммунокорреляция защиты. Корреляция (фиг. 9A) титров антител против псевдовируса NAb и (фиг. 9B) титров NAb против жизнеспособного вируса до заражения с логарифмическим пиком копий sgmРНК/мл в образцах BAL или логарифмическим пиком копий sgmРНК/мазок в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее соотношение между этими переменными.

Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена. (Фиг. 9C) Тепловая карта (верхняя панель) показывает корреляции Спирмена и Пирсона характеристик антител и логарифмического пика копий sgmРНК/мл в образцах BAL (*q<0,05, **q<0,01, ***q<0,001, значения q, полученные с помощью поправки Бенджамини-Хохберга для множественной проверки). На гистограмме (нижняя левая панель) показан ранг корреляции Пирсона наиболее прогностической комбинации или индивидуальных характеристик антител, определенных рекурсивным исключением признаков для частичной регрессии методом наименьших квадратов (PLSR) и регрессии случайного леса (RF). Тепловая карта корреляции (нижняя правая панель) представляет парные корреляции Пирсона между признаками всех животных.

На фиг. 10 представлен график, на котором показана корреляция методов анализа антител NAb псевдовируса и жизнеспособного вируса у вакцинированных макак. Красная линия отражает наилучшее соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 11 представлен график, на котором показана вирусная РНК после заражения животных 2019-nCoV в контрольных образцах (плацебо) в образцах BAL и в образцах NS. Красные линии отражают срединные вирусные нагрузки.

На фиг. 12 представлен график, на котором показана вирусная РНК после заражения 2019-nCoV вакцинированных животных в образцах BAL. Красные линии отражают средние вирусные нагрузки.

На фиг. 13 представлен график, на котором показана вирусная РНК после заражения вакцинированных животных 2019-nCoV в образцах NS. Красные линии отражают средние вирусные нагрузки.

На фиг. 14 представлен график, на котором показан пик вирусной РНК после заражения 2019-nCoV у вакцинированных животных в образцах BAL и в образцах NS. Красные линии отражают среднюю вирусную нагрузку. P-значения означают двусторонние критерии суммы рангов Уилкоксона.

На фиг. 15 представлены корреляции титров log ИФА до заражения и log sgmРНК в образцах BAL и в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 16 представлены корреляции ответов log ELISPOT до заражения и log sgmPHK в образцах BAL и в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 17 представлен график, на котором показаны корреляции ответов log CD4+ ICS до заражения и log sgmPHK в образцах BAL и в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 18 представлен график, на котором показаны корреляции ответов log CD8+ ICS до заражения и log_{10} sgmPHK копий/мл в образцах BAL и log sgmPHK копий/мазок в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 19 представлен график, на котором показаны анамнестические данные ответов ИФА после заражения. Указаны ответы в день 0 и день 14 после заражения. Красные линии означают средние ответы.

На фиг. 20 представлен график, на котором показаны анамнестические данные ответов против псевдовируса после заражения. Указаны ответы в день 0 и день 14 после заражения. Красные линии означают средние ответы.

На фиг. 21 представлен график, на котором показаны анамнестические данные ответов против жизнеспособного вируса после заражения. Указаны ответы в день 0 и день 14 после заражения. Красные линии означают средние ответы.

На фиг. 22 представлен график, на котором показаны анамнестические данные ответов ELISPOT после заражения. Указаны ответы в день 0 и день 14 после заражения. Красные линии означают средние ответы.

На фиг. 23A-23C представлены графики, на которых показаны вирусные нагрузки зараженных вирусом 2019-nCoV макак резус, которым вводили интраназальным и интратрахеальным способами вирус 2019-nCoV в следующих дозах: $1,1x10^6$ PFU (группа 1, N=3), $1,1x10^5$ PFU (группа 2, N=3) или $1,1x10^4$ PFU (группа 3, N=3) 2019-nCoV. (Фиг. 23A) log_{10} вирусной РНК копий/мл (предел 50 копий/мл) оценивали в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) в различные моменты времени после заражения. (Фиг. 23B) log_{10} вирусной РНК

копий/мазок и (фиг. 23C) $\log_{10}$ sgmPHK копий/мазок (предел 50 копий/мазок) оценивали в образцах мазков из носа (NS) в различные моменты времени после заражения. Красные горизонтальные столбцы означают средние вирусные нагрузки.

На фиг. 24A-24F представлены графики, на которых показаны иммунные ответы у макак резус, зараженных 2019-nCoV. Гуморальные иммунные ответы оценивали после заражения методом связывания антител ИФА (фиг. 24A). (Фиг. 24B) Анализ нейтрализации псевдовируса, (Фиг. 24C) анализ нейтрализации жизнеспособного вируса и (фиг. 24D) серологические системные профили, включающие подклассы антител и эффекторные функции в отношении связывающегося с рецептором домена (RBD), растворимого эктодомена шиповидного S белка и белков нуклеокапсида (N) в день 35. Указаны антителозависимое отложение комплемента (ADCD), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCD), антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антителозависимая дегрануляция NK клеток (NKCD107a) и секреция цитокинов (NK MIP1β, NK IFNγ). Клеточные иммунные ответы оценивали также после заражения методами анализа (фиг. 24E) IFN-γ ELISPOT и (фиг. 24F) с использованием многопараметрического анализа при окрашивании внутриклеточных цитокинов в ответ на S пептидные фракции. Красные и горизонтальные столбцы означают средние ответы.

На фиг. 25A-фиг. 25L представлен ряд микрофотографий, на которых показано, что вирус 2019-nCoV индуцирует острую вирусную интерстициальную пневмонию. (фиг. 25A-фиг. 25F) Срезы H&E фиксированной легочной ткани макак-резус, инфицированных 2019-nCoV, через 2 дня после заражения, демонстрирующие (фиг. 25A) интерстициальный отек и региональную консолидацию легких, (фиг. 25B) внутриальвеолярный отек и нейтрофильные инфильтраты (фиг. 25C-25D), отторжение и некроз бронхиолярного эпителия, (фиг. 25E) образование синцитиальных клеток бронхиолярного эпителия и (фиг. 25F) гиалиновые мембраны в альвеолярных септах. (фиг. 25G-25H) иммуногистохимический анализ (IHC) нуклеокапсида SARS, показывающий зараженные вирусом клетки в интерстициальных пространствах, включая (фиг. 25G) вирусную синцитиальную клетку в просвете и (фиг. 25H) инфицированные вирусом клетки альвеолярной выстилки. (фиг. 25I) Воспалительный инфильтрат, в котором указано множество клеток, содержащих РНК 2019-nCoV, полученных

с использованием гибридизации RNASCOPE® in situ. (фиг. 25J-25L) бронхиальный респираторный эпителий, в котором указаны (фиг. 25J) воспаление в подслизистой оболочке и трансмиграция воспалительных клеток в реснитчатый столбчатый респираторный эпителий бронха, (фиг. 25K) РНК 2019-nCoV и (фиг. 25L) нуклеокапсид SARS. Цена деления (фиг. 25A) = 200 мкм, (25C, 25I, 25K-25L) = 100 мкм, (фиг. 25G) = 50 мкм, (фиг. 25B, 25D-25F, 2JK) = 20 мкм и (фиг. 25H) = 10 мкм. H&E=гематоксилин и эозин, IHC = иммуногистохимия, RNAscope = окрашивание РНК 2019-nCoV.

На фиг. 26A-26K представлен ряд микрофотографий, на которых показано, что 2019-nCoV инфицирует альвеолярные эпителиальные клетки у макак резус. Циклическое иммунофлуоресцентное (CyCIF) окрашивание фиксированной легочной ткани инфицированных 2019-nCoV макак-резус через 2 дня после заражения. (фиг. 26A) Цельный препарат легкого с окрашиванием реагентом DAPI ядер клеток, областей консолидации ядер (стрелки) и очагов репликации вируса (прямоугольник). (фиг. 26B) Визуализация с большим увеличением на вставках, на которых показаны (фиг. 26C) нуклеокапсид-положительные клетки SARS (зеленые) и окрашивание DAPI для ядер клеток (синие). (фиг. 26D) IHC светлого поля для нуклеокапсида SARS из соответствующей области легкого, изображенной на фиг. 26B и фиг. 26C. (фиг. 26E-26K) Совместное окрашивание SARS-N и CD206 (фиг. 26E и фиг. 26K), панцитокератином (pan-CK) (фиг. 26G и фиг. 26H), CD68 (фиг. 26I) и Iba-1 (фиг. 26J), при этом показаны инфицированные вирусом эпителиальные клетки и макрофаги рядом с инфицированной эпителиальной клеткой. Цена деления (фиг. 26F-26K) = 50 мкм.

На фиг. 27A-фиг. 27F представлены графики, на которых показаны вирусные нагрузки после повторного заражения вирусом 2019-nCoV макак-резус. В день 35 после исходного заражения (см. фиг. 23A-фиг. 23C и фиг.24A-фиг.24F, макак резус повторно заражали вирусом 2019-nCoV, которым вводили интраназальным и интратрахеальным способами вирус 2019-nCoV в следующих дозах: $1{,}1x10^6$ PFU (группа 1, N=3), $1{,}1x10^5$ PFU (группа 2, N=3) или $1{,}1x10^4$ PFU (группа 3; N=3) 2019-nCoV. В эксперимент повторного заражения были включены три наивных животных в качестве положительного контроля. (Фиг. 27A) $\log_{10}$ вирусной РНК копий/мл (предел 50 копий/мл) оценивали в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) в различные моменты времени после заражения. У одного из наивных животных невозможно было взять образец

лаважа. (Фиг. 27B) Сравнение вирусной РНК в образцах BAL после первичного заражения и повторного заражения (фиг. 27C) log_{10} вирусной РНК копий/мл и (фиг. 27E) log_{10} sgmРНК копий/мазок (предел 50 копий/мазок) оценивали в образцах мазков из носа (NS) в различные моменты времени после заражения. Сравнение (фиг. 27D) вирусной РНК и (фиг. 27F) sgmРНК в образцах NS после первичного и повторного заражения. Красные горизонтальные столбцы отражают среднюю вирусную нагрузку. P-значения означают данные двустороннего анализа Манна-Уитни.

На фиг. 28 представлен ряд графиков, на которых показаны анамнестические данные ответов после повторного заражения макак резус вирусом 2019-nCoV. Вирус-специфичные связывающие антитела оценивали методом связывания антител ИФА, методом нейтрализации псевдовируса, методом нейтрализации жизнеспособного вируса и методом анализа IFN-γ ELISPOT до и через 7 дней после повторного заражения вирусом 2019-nCoV. Красные линии отражают средние ответы. P-значения означают данные двустороннего анализа Манна-Уитни.

На фиг. 29 представлен ряд графиков, на которых показаны вирусные нагрузки у макак резус, которых заражали вирусом 2019-nCoV. Группы 1-3 описаны на фиг. 23. log_{10} вирусной РНК копий/мл (предел 50 копий/мл) оценивали в плазме в различные моменты времени после заражения. Красные горизонтальные столбцы отражают среднюю вирусную нагрузку.

На фиг. 30 представлен ряд графиков, на которых показаны клинические показатели у макак резус, которых заражали вирусом 2019-nCoV. Группы 1-3 описаны на фиг. 23. Полуколичественная клиническая оценка животных на основе внешнего вида, одышки, лежачего положения, аппетита и восприимчивости, респираторного дистресса в несколько моментов времени после заражения. Красные горизонтальные столбцы отражают средние клинические параметры.

На фиг. 31 представлен график, на котором показана гематология макак резус, которых заражали вирусом 2019-nCoV. Указаны число нейтрофилов и число лимфоцитов К/мкл (тыс./мкл). Красные горизонтальные столбцы отражают средние величины.

На фиг. 32 представлен график, на котором показаны вирусные нагрузки у макак резус, которых заражали вирусом 2019-nCoV. Макак резус заражали

вирусом 2019-nCoV и умерщвляли в день 2 (N=2) и день 4 (N=2) после заражения. log_{10} вирусной РНК копий/г ткани (предел 200 копий/г) оценивали в множестве тканей. Красные горизонтальные столбцы отражают средние величины вирусной нагрузки.

На фиг. 33A - фиг. 33J показаны микрофотографии, демонстрирующие, что репликация 2019-nCoV индуцирует полиморфнонуклеарные и мононуклеарные воспалительные инфильтраты, ассоциированные с ответом интерферона типа 1. (фиг. 33A и фиг. 33F) Детектирование РНК 2019-nCoV, (фиг. 33B и фиг. 33G) IHC для миелопероксидазы (MPO), (фиг. 33C и фиг. 33H) двойное окрашивание CD4 (коричневые) и макрофаги (CD68 и CD163, красные), (фиг. 33D и фиг. 33I) CD8 T лимфоциты, и (фиг. 33E и фиг. 33J) MX1 (ген ответа интерферона типа 1) (фиг. 33A-33E) у макак резус, инфицированных вирусом 2019-nCoV в день 2 после заражения и (фиг. 33F-33G) у неинфицированных макак резус. Цена деления = 100 мкм.

На фиг. 34A – фиг. 34B представлен график, на котором показан количественный анализ воспалительных инфильтратов ткани легких. (Фиг. 34A) Полиморфноядерная (PMN) клеточная инфильтрация альвеол легких и (фиг. 34B) степень окрашивания MX1 у макак резус, инфицированных вирусом 2019-nCoV по сравнению с неинфицированными макаками резус. P-значения означают данные двустороннего анализа Манна-Уитни.

На фиг. 35A – фиг. 35J представлены микрофотографии, на которых показаны воспалительные инфильтраты в областях консолидации легких при острой инфекции 2019-nCoV. (Фиг. 35A) Один срез легких через 2 дня после инфицирования, содержащий три исследуемые области (ROI), на которых показана консолидации ткани (ROI 1-3), цена деления = 5 мм). (Фиг. 35B) Ассоциированная с бронхом лимфоидная ткань (BALT) и (Фиг. 35C и Фиг. 35D) бронхиолярный эпителий в исследуемой области ROI 1, на которых показан бронхиолярный некроз (Фиг. 35C) с миграцией CD3+ T-лимфоцитов в бронхиолярный просвет и (Фиг. 35D) перибронхиолярное воспаление с множеством нейтрофилов, экспрессирующих миелопероксидазу (MPO), и макрофаги CD16+, CD3 (серый), CD20 (синий), CD68 (желтый), HLADR (голубой), MPO (пурпурный), E-кадгерин (зеленый); цена деления = 100 мкм. (Фиг. 35E и Фиг 35F) CD16-положительные (красный) в консолидированной ткани (ДНК, серый), (Фиг. 35E, Фиг 35G и Фиг 35I) низкая степень

положительной реакции к 2019-nCoV в исследуемой области (ROI-1) по сравнению (Фиг. 35F, Фиг. 35H и Фиг. 35J) с высокой степенью положительной реакции к 2019-nCoV в исследуемой области ROI-3. Окрашивание SARS-N (зеленый) и pan-CK (эпителий, красный) в исследуемой области ROI-1 (Фиг. 35G) по сравнению (Фиг. 35H) с исследуемой областью ROI 3. Положительная реакция CD3 (серый), CD20 (красный) и CD68 (зеленый) в исследуемой области ROI 1 (низкая степень положительной реакции к SARS CoV2) (Фиг. 35I) по сравнению с ROI 3 (высокая степень положительной реакции к SARS CoV2) (Фиг. 35J); цена деления = 0,5 мм.

На фиг. 36 представлен график, на котором показаны результаты анализа бляшкообразования в образцах BAL и образцах NS после первичного заражения и повторного заражения 2019-nCoV. Указаны пиковые бляшкообразующие единицы (PFU) в мл образцов BAL и образцов NS после первичного заражения и повторного заражения, дни 1-7. Красные горизонтальные столбцы отражают средние титры PFU.

На фиг. 37 представлен график, на котором показаны клинические параметры у макак резус, повторно зараженных вирусом 2019-nCoV. Группы 1-3 описаны на фиг. 23. Полуколичественная клиническая оценка животных на основе внешнего вида, одышки, лежачего положения, аппетита и восприимчивости, респираторного дистресса в несколько моментов времени после заражения.

На фиг. 38A представлена схема, на которой показаны структуры векторов Ad26. Были получены семь векторов Ad26, экспрессирующих варианты S белка SARS-CoV-2: (i) лидерная последовательность tPA, включающая полноразмерный S белок (tPA.S (SEQ ID NO: 1, включающая лидерную последовательность tPA, присоединенную к N-концевому остатку)), (ii) лидерная последовательность tPA, включающую полноразмерный S белок, содержащий мутации в участке расщепления фурином и две стабилизирующие мутации пролина (tPA.S.PP (SEQ ID NO: 23, включающая лидерную последовательность tPA, присоединенную к N-концевому остатку)), (iii) лидерную последовательность, включающая полноразмерный S белок дикого типа (S (SEQ ID NO: 29)), (iv) лидерную последовательность, включающую S белок с делецией цитоплазматического хвоста (S.dCT (SS-SdCT) (SEQ ID NO: 30)), (v) тандем последовательности tPA и лидерной последовательности дикого типа,

включающей полноразмерный S белок (tPA.WT.S (SEQ ID NO: 29, включающая лидерную последовательность tPA, присоединенную к N-концевому остатку)), (vi) лидерную последовательность дикого типа, включающую S белок с делецией трансмембранного фрагмента и цитоплазматического хвоста, представляющая собой растворимый эктодомен, содержащий мутации в участке расщепления фурином, стабилизирующие мутацию пролина и домен тримеризации фолдон-домена (S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) (SEQ ID NO: 56)) и (vii) лидерную последовательность tPA дикого типа, включающую полноразмерный S белок, содержащий мутации в участке расщепления фурином и стабилизирующие мутации пролина (S.PP (SS-Spike-dF-PP) (SEQ ID NO: 51)). Красные треугольники означают лидерную последовательность tPA, черные треугольники означают лидерную последовательность дикого типа, красные знаки X означают мутацию в участке расщепления фурином, красные вертикальные линии означают мутации пролина, не закрашенный квадрат означает домен тримеризации фолдона.

На фиг. 38B представлен вестерн-блоттинг, на котором показано распознавание вариантов SARS-CoV-2 S поликлональными антителами anti-SARS. Данные анализа вестерн-блоттингом экспрессии векторов Ad26, кодирующих tPA.S (трек 1), tPA.S.PP (трек 2), S (трек 3), S.dCT (SS-SdCT) (трек 4), tPA.WT.S (трек 5), S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) (трек 6) и S.PP (SS-Spike-dF-PP) (трек 7), в клеточных лизатах с использованием поликлональных антител anti-SARS.

На фиг. 39A-39D представлены графики, на которых показаны гуморальные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Гуморальные иммунные ответы оценивали через 0, 2 и 4 недели с использованием следующих методов анализа: (фиг. 39A) ИФА, RBD-специфически связывающие антитела, (фиг. 39B) анализ нейтрализации псевдовируса и (фиг. 39C) анализ нейтрализации жизнеспособного вируса. Красные столбцы отражают средние ответы. Пунктирные линии означают предел количественного определения. (фиг. 39D) S- и RBD-специфический антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антителозависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP), антителозависимое отложение комплемента (ADCD) и антителозависимая активация клеток NK (ADNKA) оценивали через 4 недели и эти данные представлены в виде лепестковых диаграмм. Размер и интенсивность цвета

клиньев указывают на медиану признака для соответствующей группы (синий цвет обозначает функции антител, красный цвет обозначает связывание изотипа/подкласса антитела/FcγR). На графике анализа основных компонентов (PCA) указаны многомерные профили антител по группам. Каждая точка представляет животное, цвет точки обозначает группу, а эллипсы показывают распределение групп с доверительным интервалом 70%, причем предполагается многомерное нормальное распределение.

На фиг. 40A-40B представлены графики, но которых показаны клеточные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Клеточные иммунные ответы оценивали через 4 недели после иммунизации (FIG. 40A) методом ИФА IFN-γ ELISPOT и (FIG. 40B) методом окрашивания внутриклеточных Т-клеточных цитокинов IFN-γ+CD4+ и IFN-γ+CD8+ в ответ на S пептидные фракции. Красные столбцы означают средние ответы. Пунктирные линии означают предел количественного анализа.

На фиг. 41A-41D представлен график, на котором показаны вирусные нагрузки у макак резус, которых заражали вирусом SARS-CoV-2 интраназальным и интратрахеальным способами в дозе $1,2x10^8$ вч ($1,1x10^4$ PFU) SARS-CoV-2. (Фиг. 41A-41B) Log_{10} копий sgmРНК/мл (предел определения 50 копий/мл) оценивали в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) у контрольных животных (плацебо) и у вакцинированных животных после заражения. (Фиг. 41C-41D) Log_{10} копий sgmРНК/мазок (предел количественного определения 50 копий/мазок) оценивали в образцах NS у контрольных животных и у вакцинированных животных после заражения. У одного животного из группы S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) не наблюдалось пиковых значений в образцах BAL, отобранных после заражения. Красные линии означают средние значения.

На фиг. 42 представлен график, на котором показаны суммарные пиковые вирусные нагрузки, после заражения после заражения вирусом SARS-CoV-2. Пиковые вирусные нагрузки в образцах BAL и NS после заражения. Различные пиковые вирусные нагрузки наблюдались в дни 1-4 после заражения. Красные линии означают средние вирусные нагрузки. P-значения означают данные двустороннего анализа Манна-Уитни. (*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001).

На фиг. 43A-43D представлены графики, на которых показано, что антитела коррелируют с защитой. Корреляция (фиг. 43A) титров связывания ИФА, (фиг.

43B) титров антител против псевдовируса NAb и (фиг. 43C), титров NAb против жизнеспособного вируса через 2 и 4 недели с логарифмическим пиком копий sgmPHK/мл в образцах BAL после заражения. Красные линии отражают наилучшее линейное соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена. (Фиг. 43D) На тепловой карте показано различие между значениями средних показателей z-оценки между полностью защищенными (N = 17) и частично защищенными и незащищенными (N = 22) животными. Две группы сравнивали с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни, а звездочками обозначены значения q с поправкой Бенджамини-Хохберга (*q <0,05). Точечные графики показывают различия в признаках, которые лучше всего отличают полностью защищенных и частично защищенных животных, включая титры NAb, S-специфическую антителозависимую активацию NK клеток (ADNKA) и антителозависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP). P-значения указывают на результаты двустороннего анализа Манна-Уитни. На гистограмме показана площадь перекрестной проверки под кривыми зависимости характеристик оператора приемника (зависимость чувствительности от частоты ложноположительных заключений) с использованием функций, указанных на оси x в модели логистической регрессии. На гистограмме показаны три лучшие модели с одной и двумя функциями. Столбцы погрешностей означают среднее значение и стандартное отклонение для 100 повторений 10-кратной перекрестной проверки.

На фиг. 44A-44B представлены графики, на которых показаны иммунные ответы после заражения вирусом SARS-CoV-2. (фиг. 44A) Титры NAb против псевдовируса до заражения и в день 14 после заражения, и (фиг. 44B) T клеточные ответы на цитокины IFN-γ+CD8+ и IFN-γ+CD4+, полученные при окрашивании внутриклеточных цитокинов в ответ на отобранные шиповидные белки (S1, S2), белки нуклеокапсида (NCAP), и неструктурные пептиды (N6, N7a, N8) в день 14 после заражения у контрольных животных (плацебо) и у животных, вакцинированных белком Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP). Красные столбцы означают средние ответы. Пунктирные линии означают предел количественного определения для анализа.

На фиг. 45 представлены два графика, на которых показана корреляция титров NAb против псевдовируса и титров ИФА или NAb против

жизнеспособного вируса у вакцинированных макак. Красная линия отражает наилучшее линейное соотношение между этими переменными. Значения P и R означают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 46 представлен график, на котором показано сравнение титров антител против псевдовируса NAb у вакцинированных макак и у выздоравливающих макак и людей. Сравнение антител против псевдовируса NAb у макак, вакцинированных Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP), с опубликованными ранее когортами выздоравливающих макак и выздоравливающих людей, которые выздоровели от инфекции SARS-CoV-2.

На фиг. 47 представлены два графика, на которых показаны гуморальные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. S-специфичные IgG и IgA через 4 недели в образцах BAL по данным ИФА у контрольных животных (плацебо) и у вакцинированных Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP) животных. Красные столбцы означают средние ответы. Пунктирные линии означают предел количественного определения для анализа.

На фиг. 48 представлен ряд графиков, на которых показаны гуморальные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Показаны S- и RBD-специфичный антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антителозависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP), антителозависимое отложение комплемента (ADCD), и антителозависимая активация клеток NK (ADNKA). Красные столбцы означают средние ответы.

На фиг. 49 представлены два графика, на которых показаны клеточные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Данные анализов с проявлением внутриклеточных T клеточных цитокинамов IFN-γ+, IL-2+, IL-4+ и IL-10+ CD4+ в ответ на собранные S пептиды у животных, вакцинированных Ad26-S.dTM.PP (Ad26 SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) и Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP). Красные столбцы означает средние ответы. Пунктирные линии означают предел количественного определения для анализа.

На фиг. 50 представлены два графика, на которых показано, что данные анализа ИФА коррелируют с защитой. Корреляция титров по связыванию ИФА через 2 и 4 недели с пиковыми значениями $\log_{10}$ копий sgmРНК/мазок в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее линейное соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 51 представлены два графика, на которых показано, что титры антител против псевдовируса NAb коррелируют с защитой. Корреляция титров антител против псевдовируса NAb через 2 и 4 недели с пиковыми значениями log_{10} копий sgmРНК/мазок в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее линейное соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 52 представлены два графика, на которых показано, что антитела против жизнеспособного вируса NAb коррелируют с защитой. Корреляция титров антител против жизнеспособного вируса NAb через 2 и 4 недели с пиковыми значениями log_{10} копий sgmРНК/мазок в образцах NS после заражения. Красные линии отражают наилучшее линейное соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 53 представлен ряд графиков, на которых показано, что антитела коррелируют с защитой. Пунктирные линии показывают различие между полностью и частично защищенными животными. P-значения указывают на результаты двустороннего анализа Манна-Уитни.

На фиг. 54 представлен ряд графиков, на которых показаны титры NAb после заражения SARS-CoV-2. Титры антител против псевдовируса NAb перед заражением и в день 14 после заражения у вакцинированных животных. Пунктирные линии означают предел количественного определения для анализа.

На фиг. 55A-55C представлены графики, на которых показано клиническое заболевание у хомяков после инфицирования SARS-CoV-2. Сирийских золотистых хомяков (возраст 10-12 недель, самцы и самки, N=20) заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 в дозе $TCID_{50}$ $5x10^4$ (низкая доза, N=4) или $5x10^5$ $TCID_{50}$ (высокая доза, N=16). (Фиг. 55A) Изменение средней массы тела в процентах после заражения. Числа означают число животных в каждый момент времени. В группе высокой дозы, 4 животных вскрывали в день 2, 4 животных вскрывали в день 4, 4 животных соответствовали критериям умерщвления в день 6 день и 2 животных соответствовали критериям умерщвления в день 7. (Фиг. 55B) Изменение массы тела в процентах после заражения у отдельных животных. Средняя потеря массы тела показана красным цветом. Звездочки указывают на смертность. Серые линии обозначают животных с

запланированными вскрытиями в день 2 и в день 4. (Фиг. 55C) Вирусная нагрузка в тканях, измеренная в виде $\log_{10}$ копий РНК на грамм ткани (предел количественного определения 100 копий/г) при запланированных вскрытиях в день 2 и день 4, и у 2-5 из 6 животных, соответствующих критериям вскрытия в дни 6-7. Расширенные ткани в день 6 не собирали.

На фиг. 56A-55L представлен ряд графиков, на которых указаны патологические признаки у хомяков, инфицированных высокой дозой SARS-CoV-2. (Фиг. 56A) Некроз и воспаление (стрелка) в носовых раковинах, H&E (d2). (Фиг. 56B) Бронхиолярный эпителиальный некроз с клеточным дебрисом и дегенеративными нейтрофилами в просвете (стрелка) и трансмиграция воспалительных клеток в стенку сосуда (острие стрелки), H&E (d2). (Фиг. 56C) Интерстициальная пневмония, кровоизлияние и уплотнение легочной паренхимы, H&E (d2). (Фиг. 56D) в эпителии носовых раковин по данным иммуногистохимического анализа (IHC) (d2) показано сильное положительное действие для SARS-CoV-N. (Фиг. 56E) В бронхиолярном эпителии и клеточном дебрисе просвета по данным IHC (d2) показано сильное положительное действие для SARS-CoV-N. (Фиг. 56F) В пневмоцитах и альвеолярных перегородках показано мультифокальное сильное положительное действие для SARS-CoV-N по данным IHC (d2). (Фиг. 56G) Диффузное окрашивание вРНК с использованием прибора RNASCOPE® внутри легочного интерстиция (стрелка, интерстициальная пневмония) и внутри бронхиолярного эпителия (наконечник стрелки, d2). (Фиг. 56H) Диффузное окрашивание вРНК с использованием методом RNASCOPE® в интерстиции легких (d4). (Фиг. 56I) IHC Iba-1 (макрофаги) в легочном интерстиции (d7). (Фиг. 56J) CD3+ Т-лимфоциты в интерстиции легких, CD3 с использованием IHC (d4). (Фиг. 56K) MPO (миелопероксидаза нейтрофилов) с использованием IHC, указывающая на присутствие интерстициальных нейтрофилов (d7). (Фиг. 56L) Интерферон-ндуцибельный ген MX1, данные IHC указывают на сильное и диффузное положительное действие на всю ткань легких (d4). H&E, гематоксилин и эозин, IHC, иммуногистохимический анализ, Iba1, адаптерный белок 1, связывающий ионизированный кальций. Показаны репрезентативные срезы. Цена деления шкалы = 20 мкм (фиг. 56B, 56D); 50 мкм (фиг. 56A, 56E, 56F), 100 мкм (фиг. 56C, 56G-56L).

На фиг. 57A-57F представлен ряд графиков, на которых показан продольный количественный анализ изображения вирусной репликации и ассоциированного воспаления в легких. Фиг. 57A) площадь легких в процентах, положительных на антисмысловую вирусную РНК SARS-CoV-2 (вРНК) по данным ISH с использованием метода RNASCOPE®. (Фиг. 57B) Число клеток в процентах от общего числа клеток, положительных к белку SARS-CoV-N (ядерный или цитоплазматический) по данным IHC. (Фиг. 57C) Iba-1-положительные клетки на единицу площади по данным IHC. (Фиг. 57D) Число CD3-положительных клеток на единицу площади. (Фиг. 57E) MPO-положительные клетки на единицу площади. (Фиг. 57F) MX1-положительная легочная ткань в процентах в виде доли от общей площади легких. ISH, гибридизация in situ; IHC, иммуногистохимический анализ; нуклеокапсид SARS-N, SARS-CoV; MPO, миелопероксидаза; MX1, белок 1 миксовируса (индуцибельный ген интерферона 1 типа). Каждая точка представляет одно животное.

На фиг. 58A-58O представлен ряд графиков, на которых показана динамика вируса в легких и профили экспрессии рецептора ACE2. Хомяков вскрывали до инфицирования (SARS-CoV-2- отрицательные животные) или после заражения высокой дозой SARS-CoV-2 в день 2 (D2), день 4 (D4), день 7 (D7) и день 14 (D14) после заражения. Серийные срезы легочной ткани проявляли на присутствие антисмысловой вРНК с использованием гибридизации RNASCOPE® (фиг. 58A-58E), на присутствие смысловой вРНК методом RNASCOPE® (фиг. 58F-58J), и ACE2 IHC (фиг. 58K-58O). Для антисмысловой гибридизации RNASCOPE® использовали смысловой зонд; для смысловой гибридизации RNASCOPE® использовали антисмысловой зонд. IHC. Иммуногистохимический анализ. Показаны репрезентативные срезы. Цена деления = 100 мкм.

На фиг. 59A-59L представлен ряд графиков, на которых показана внелегочная патология. (Фиг. 59A) Антисмысловая вирусная РНК SARS-CoV-2 (вРНК) в стволе головного мозга в день 2 после заражения. (Фиг. 59B) Более высокая степень увеличения, показывающего окрашивание цитоплазматической вРНК в нейронах при отсутствии воспаления и патологии. (Фиг. 59C) Окрашивание антисмысловой вРНК SARS-CoV-2 в собственном слое ворсинок тонкой кишки в день 2 после заражения. (Фиг. 59D) Более высокая степень

увеличения, показывающего окрашивание цитоплазматической и ядерной вРНК в отдельной мононуклеарной клетке при отсутствии воспаления и тканевой патологии. (Фиг. 59E) окрашивание антисмысловой вРНК SARS-CoV-2 в миокарде и вдоль эпикардиальной поверхности сердца в день 4 после заражения. (Фиг. 59F) Более высокая степень увеличения, показывающего окрашивание воспалительных мононуклеарных клеточных инфильтратов, соответствующих очаговому миокардиту. (Фиг. 59G) Легочный сосуд с эндотелиитом в день 4 (d4) после заражения. (Фиг. 59H) Легочный сосуд, в котором показано окрашивание CD3+ Т-лимфоцитов с использованием анализа IHC, прилипших к эндотелию и внутри стенки сосуда, d4 после заражения. (Фиг. 59I) Легочный сосуд, в котором показано окрашивание макрофагов Iba-1+ с использованием анализа IHC вдоль эндотелия и около сосудов, d4. (Фиг. 59J) Легочный сосуд с минимальным окрашиванием сосудов для SARS-CoV-N с использованием IHC, d4. (FIG. 59K), из сердца (Фиг. 59E, 59F), в котором показан очаговый лимфоцитарный миокардит, подтвержденный окрашиванием CD3+ Т лимфоцитов (фиг. 59L) с использованием анализа IHC, d4. Цена деления = 500 мкм (фиг. 59A, 59C, 59E); 100 мкм (фиг. 59B, 59D, 59F, 59G-59L).

На фиг. 60A-60L представлен ряд графиков, на которых показан SARS-CoV-2 в мононуклеарных клетках крови и костном мозге. (Фиг. 60A-60C) Окрашивание антисмысловой вРНК SARS-CoV-2 в мононуклеарных клетках тромба легкого в день 2 после заражения. (Фиг. 60D) Костный мозг из носовой раковины через 4 дня после заражения, в котором демонстрируются (фиг. 60E) кроветворные клетки (H&E), которые характеризуются (фиг. 60F) положительным окрашиванием на SARS-CoV-N методом анализа IHC. вРНК, вирусная РНК; H&E, гематоксилин и эозин; IHC, иммуногистохимический анализ. Цена деления = 500 мкм (фиг. 60A); 200 мкм (фиг. 60D); 100 мкм (фиг. 60B, 60C, 60E, 60F).

На фиг. 61A-60F представлены графики, на которых показаны гуморальные иммунные ответы у вакцинированных хомяков. (Фиг. 61A) Иммуногены SARS-CoV-2 шиповидного белка (S) (i) с делецией трансмембранного фрагмента и цитоплазматического хвоста, представляющие собой растворимый эктодомен с доменом тримеризации фолдона (S.dTM.PP) или (ii) полноразмерный S белок S.PP, оба содержащие мутации в участке расщепления фурином и две стабилизирующие мутации пролина. Красные знаки X означают мутацию

участка расщепления фурином, красные вертикальные линии означают мутации пролина. Незакрашенные квадраты означают домен тримеризации фолдона. S1 и S2 означают первый и второй домены S белка, TM означает тренсмембранный фрагмент, а CT означает цитоплазматический домен. Хомяков вакцинировали в дозе 10^{10} вч или 10^{9} вч Ad26-S.dTM.PP или Ad26-S.PP или контрольным плацебо (N=10/группа). Гуморальные иммунные ответы оценивали через 0, 2 и 4 недели (фиг. 61B) с использованием RBD-специфичных связывающих антител методом ИФА и (фиг. 61C) методами анализа нейтрализации псевдовируса. Красные столбцы отражают средние ответы. Пунктирные линии отражают предел обнаружения количественного анализа. (Фиг. 61D) S- и RBD-специфичный подкласс IgG, FcγR и ADCD ответы показаны через 4 недели, при этом эти графики представлены в виде лепестковых диаграмм. Размер и интенсивность цвета клиньев указывают на медиану признака для соответствующей группы (подкласс антитела, красный цвет; связывание FcγR, синий цвет; ADCD, зеленый цвет). (Фиг. 61E) График анализа основных компонентов (PCA) показывает многомерные профили антител по вакцинированным группам. Каждая точка представляет животное, цвет точки обозначает группу, а эллипсы показывают распределение групп с доверительным интервалом 70%, причем предполагается многомерное нормальное распределение. (Фиг. 61F) На тепловой карте показаны различия в средних показателях z-баллов между вакцинированными группами S.PP и S.dTM.PP. Две группы сравнивали с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни, и звездочками обозначены значения q с поправкой Бенджамини-Хохберга (* $q < 0{,}05$, ** $q < 0{,}01$, *** $q < 0{,}001$).

На фиг. 62A-62C представлены графики, на которых показана корреляция титров антител с кривыми выживаемости. (Фиг. 62A) Корреляция титров связывания ИФА с титрами NAb против псевдовируса через 2 недели и 4 недели. Красные линии отражают наилучшее соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена. (Фиг. 62B) Кривая выживаемости в ходе испытания вакцины. Значения P означают точный двусторонний критерий Фишера. N означает число животных в каждой группе. (Фиг. 62C) Комбинированный анализ двух испытаний на хомяках, в которых участвовали все животные, которых заражали в дозе $TCID_{50}$ $5x10^{5}$, и за которыми наблюдали в продолжительный период

времени. Значения P означают точный двусторонний критерий Фишера. N означает число животных в каждой группе.

На фиг. 63A-63D представлены графики, на которых показано клиническое заболевание у хомяков после заражения высокой дозой SARS-CoV-2. (Фиг. 63A) Среднее изменение массы тела в процентах после заражения. (Фиг. 63B) Изменение массы тела в процентах после заражения у отдельных животных. Средняя потеря массы тела показана красным цветом. Звездочки указывают на смертность. Серые линии обозначают животных с запланированными вскрытиями в день 4. (Фиг. 63C) Максимальная потеря массы тела в комбинированных группах Ad26-S.dTM.PP (N=14), Ad26-S.PP (N=14) и контрольной группе плацебо (N=7), за исключением животных, которых вскрывали в день 4. Значения P отражают данные двустороннего анализа Манна-Уитни. (Фиг. 63D) Количественное определение в процентах площади легких в срезах ткани, положительной к антисмысловой вРНК, и полученных от хомяков, вакцинированных Ad26-S.dTM.PP и Ad26-S.PP, по сравнению с контрольными хомяками в день 4 после заражения. Значения P отражают данные двустороннего анализа Манна-Уитни.

На фиг. 64A-64B представлены графики, на которых показано, что антитела коррелируют с клинической защитой. Корреляция титров связывания ИФА (фиг. 64A) и титров NAb псевдовируса (фиг. 64B) через 2 недели и 4 недели с максимальной потерей массы тела после заражения. Красные линии отражают наилучшее линейное соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 65A-65B представлены графики, на которых показана вирусная нагрузка в день 4 и день 14. Вирусную нагрузку в ткани измеряли по величине $\log_{10}$ субгеномной sgmPHK копий/г ткани (предел количественного определения 100 копий/г) (фиг. 65A) в день 4 (N=6 означает обе группы, которым вводили дозу для каждой вакцины) и (фиг. 65B) в день 14 (N=14 означает обе группы, которым вводили дозу для каждой вакцины) после заражения. Красные линии отражают средние значения. Каждая точка означает одно животное.

На фиг. 66A-66D представлены графики, на которых показано, что антитела коррелируют с защитой. Корреляция (фиг. 66A, 66C) титров связывания ИФА и (фиг. 66B, 66D) и титров NAb псевдовируса через 2 недели и 4 недели с представленными величинами $\log_{10}$ sgmPHK копий/г (фиг. 66A, 66B) легких и

(фиг. 66C, 66D) ткани из носовых раковин у животных, которых вскрывали в день 4. Красные линии отражают наилучшее линейное соотношение между этими переменными. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

На фиг. 67A-67B представлены графики, на которых показано, что антитела коррелируют с защитой и анамнестическим ответом. (Фиг. 67A) На тепловых картах показаны данные анализа ранговой корреляции Спирмена между характеристиками антител и потерей массы тела (N=35), между вирусной нагрузкой в легких (N=12) и вирусной нагрузкой в носовых раковинах (N=12). Значительная корреляция обозначена звездочками после множественной корреляции испытаний с использованием процедуры Бенджамини-Хохберга (* q <0,05, ** q <0,01, *** q <0,001). (Фиг. 67B) Титры по данным ИФА и ответы NAb у выживших животных в день 14 после заражения SARS-CoV-2.

На фиг. 68A-68S представлен ряд графиков, на которых показано, что вакцинация Ad26 защищает от патологии SARS-CoV-2. Гистопатологическая оценка срезов H&E (фиг. 68A-68E, 68K-68N) контрольных животных плацебо и (фиг. 68F-J, 68O-R) вакцинированных Ad26-S.PP хомяков свидетельствует в группе контрольных животных (фиг. 68A) о значительной консолидации паренхимы легких и инфильтратах воспалительных клеток, (фиг. 68B) бронхиолярном эпителиальном синтиции и некрозе, (фиг. 68C) SARS-CoV-N положительных (IHC) бронхиолярных эпителиальных клетках, (фиг. 68D) инфильтратах перибронхиолярных CD3+ T лимфоцитов, и (фиг. 68E) инфильтратах перибронхиолярных макрофагов (Iba-1; IHC), и (фиг. 68F-J) минимальных в отношении не соответствующей патологии у вакцинированных Ad26-S.PP животных. MPO окрашивание антисмысловой SARS-CoV-2 RNASCOPE® ISH (фиг. 68K), в интерстициальных CD3+ T лимфоцитах (фиг. 68L) методом IHC, окрашивание MX1 методом IHC (фиг. 68N) у контрольных животных по сравнению с аналогичными областями у вакцинированных Ad26-S.PP животных (фиг. 68O-68R) в день 4 после заражения. Количественное определение площади легких в процентах, положительной к антисмысловой вРНК (фиг. 68S) в срезах ткани у хомяков, вакцинированных Ad26-S.dTM.PP и Ad26-S.PP, по сравнению с контрольными хомяками в день 4 после заражения. Показаны репрезентативные срезы. P-значения означают данные двустороннего

анализа Манна-Уитни. Цена деления шкалы = 20 мкм 68B, 68C, 68G, 68H, 68I); 50 мкм (фиг. 68A, 68D, 68E, 68J); 100 мкм (фиг. 68F, 68K-68R).

На фиг. 69 представлена схема структур некоторых конструктов SARS-CoV-2 S белков (светло-серый цвет - S1, тёмно-серый цвет - S2). В нижней части схемы сигнальный пептид дикого типа (wt) изменен на сигнальный пептид tRA. Вертикальная линия между S1 и S2 означает мутацию в участке расщепления муцином. Пунктирная линия означает двойные мутации пролина в положениях 986 и 987. Delta ERRS означает делецию С-концевых остатков, которые содержат сигнал сохранения эндоплазматического ретикулума.

На фиг. 70 представлено детектирование экспрессии SARS-CoV-2 S с использованием различных антител, специфичных к SARS-CoV-1, на поверхности клетки после трансфекции различными вариантами S белков на основе интенсивности люминесценции с использованием клеточного ИФА. Данные представлены в виде средней величины ± СО.

На фиг. 71 представлено детектирование экспрессии S белка SARS-CoV-2 с использованием некоторых SARS-CoV-1-специфичных антител и антител, специфичных к «пэтчу» с высоким содержанием маннозы, после трансфектирования рядом S вариантов, методом проточной цитометрии. Данные представлены в виде средней величины ± СО.

На фиг. 72 представлены титры сывороточных антител, специфичных к шиповидному S белку SARS-CoV-2 в день 19 по данным ИФА. ULOQ, верхний предел обнаружения, LLOD, нижний предел обнаружения. Статистический анализ: односторонний дисперсионный анализ ANOVA с коррекцией множественных сравнений Бонферрони; н.д., недостоверное значение ($p>0,05$).

На фиг. 73 показано влияние различных сигнальных пептидов на экспрессию белка. Детектирование экспрессии конструктов S белка SARS-CoV-2 с использованием различных сигнальных пептидов с помощью конструктов ACE2-антител и специфичного антитела к SARS-CoV-1 (CR3022) на поверхности клеток на основе интенсивности люминесценции с использованием клеточного ИФА. Данные представлены в виде средней величины ± СО.

На фиг. 74 представлено клонирование последовательности, кодирующей SARS-CoV-2, в линеаризованном векторе-мишени. Два фрагмента ДНК,

кодирующие части шиповидного белка SARS-CoV-2, включены в их вектор-мишень.

На фиг. 75 представлено включение экспрессионной кассеты, кодирующей последовательность SARS-CoV-2, в область E1 вектора Ad26.

На фиг. 76A-76B представлены титры связывающих S белок антител по данным анализа ИФА (фиг. 76A), измеренные через 2 недели (фиг. 76B) через 4 недели. Горизонтальной линией указан средний ответ на группу. Пунктирная линия означает LLOD. Перекрестное сравнение доз Ad26NCOV030 (Ad26COVS1), Ad26NCOV006 и Ad26NCOV028 (данные не показаны) проводили с использованием t-критерия ANOVA с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. *: $p<0,05$. LLOD = нижний предел детектирования.

На фиг. 77A-77B представлены титры нейтрализующих антител по данным измерений с использованием wtVNA цитопатического эффекта (CPE) вирусного изолята Leiden1 (L-001) на клетках Vero E6. (фиг. 77A) через 2 недели; (фиг. 77B) через 4 недели. Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. LLOD обозначен пунктирной линией. Животные с ответом, равным LLOD или ниже, указаны незакрашенными символами. wtVNA = анализ нейтрализации вируса дикого типа. Сравнение доз Ad26NCOV030 (Ad26COVS1), Ad26NCOV006 и Ad26NCOV028 (данные не показаны) проводили с помощью z-критерия для анализа Tobit ANOVA с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. **: $p<0,01$.

На фиг. 78 представлены данные специфического клеточного ответа на S белок SARS-CoV-2 у мышей. Показано суммарное значение синцитийобразующих единиц SFU при стимуляции собранными пептидами 1 и 2. Продуцирование IFN-γ спленоцитами измеряли методом иммуноферментных пятен (ELISpot) через 18 ч после стимуляции пептидом. Пунктирная линия означает LLOD 200 IFN-γ SFU/10^6 нестимулированных спленоцитов, инкубированных в питательной среде и ДМСО. Животные с ответом, равным или менее LLOD, обозначены не закрашенными символами.

На фиг. 79A-79C указано, что концентрацию цитокинов в клеточном супернатанте определяли методом Multiplex ИФА и рассчитывали соотношения. (Фиг. 79A) Соотношение IFNγ/IL-4; (фиг. 79B) соотношение IFNγ/IL-5; (фиг. 79C) соотношение IFNγ/IL-10. Среднее соотношение на группу обозначено горизонтальной линией. Статистически значимое различие между белком

Ad26COVS1 (Ad26NCOV030) и S белком с адъювантом рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни с двукратной поправкой Бонферрони. ***: $p<0,001$.

На фиг. 80A-80C титры связывания S белка с IgG1 и IgG2a определяли методом ИФА. (Фиг. 80A) IgG1, (фиг. 80B) IgG2a. Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирная линия означает LLOD и ULOD для анализа. Животные с ответом, равным или менее LLOD, обозначены не закрашенными символами. Рассчитывали соотношение титров IgG2a/IgG1 (фиг. 80C). Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирная линия означает соотношение IgG2a/IgG1, равное 1. Животные с ответом, равным или менее LLOD по данным ИФА для IgG2a обозначены не закрашенными символами. Статистически значимое сравнение между белком Ad26COVS1 (Ad26NCOV030) и S белком с адъювантом проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни с двукратной поправкой Бонферрони. ***: $p<0,01$.

На фиг. 81A-81B указаны: (Фиг. 81A) Титры связывающих S белок антител по данным измерения ИФА. (Фиг. 81B) Титры нейтрализующих антител по данным определения цитопатического эффекта (CPE) с использованием wtVNA и вирусного изолята Leiden1 (L-001) на клетках Vero E6. Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Нижняя пунктирная линия означает LLOD, равный 1,699 $\log_{10}$ для ИФА и 5,7 для wtVNA. Животные с ответом, равным или менее LLOD, обозначены незакрашенными символами. Сравнение доз проводили с использованием t-критерия ANOVA (ИФА) и критерия Кокрана-Мантеля-Хензеля (wtVNA) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

На фиг. 82 указано продуцирование IFN-γ клетками PBMC, которое измеряли методом ELISpot через 18 ч после стимуляции пептидными фракциями. Показано суммарное значение синцитийобразующих единиц SFU при стимуляции пептидными фракциями 1 и 2. Пунктирные линии означают значение LOB, равное 4,5 IFN-γ SFU/10^6 PBMC, рассчитанное как 95-й процентиль SFU для не стимулированных клеток, инкубированных в среде и ДМСО. Животные с ответом на уровне LOB или ниже показаны незакрашенными символами. Сравнение доз проводили с использованием t-критерия ANOVA с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

На фиг. 83A-83B указаны: (Фиг. 83A) Титры связывающих S белок антител по данным ИФА. Образец Ad26.Empty N=18. (Фиг. 83B) Титры нейтрализующих антител по данным измерения wtVNA цитопатического эффекта (CPE) вирусного изолята Leiden1 (L-001) на клетках Vero E6. Группа Ad26.Empty показана в виде двух групп отобранных сывороток, группа 7 (N=6) и группа 8 (N=6). Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирная линия означает LLOD. Животные с ответом на уровне LLOD или ниже показаны незакрашенными символами. Сравнение данных ИФА на дозу проводили между Ad26COVS1 (Ad26NCOV030) и Ad26.Empty с использованием U-критерия Манна-Уитни. Коррекцию множественных сравнений не проводили. ***: $p<0,001$.

Фиг 84. Репликационно-компетентный вирус ($TCID_{50}$ на г легких) измеряли методом анализа бляшкообразования. Средняя вирусная нагрузка на группу обозначена горизонтальной линией. Животные с ответом на уровне LLOD или ниже показаны незакрашенными символами. Сравнение проводили между группой Ad26.Empty и группами Ad26COVS1 (Ad26NCOV030) и Ad26NCOV006 с использованием U-критерия Манна-Уитни. Коррекцию множественных сравнений не проводили. ***: $p<0,01$.

Фиг. 85. Масса тела, измеренная до заражения в день, связанный с зараженем, [C]0 и в день 4 после заражения в день C4. Относительное изменение массы тела выражали в виде массы тела в процентах относительно к дню C0. Среднее изменение массы тела на группу указано в виде горизонтальной линии. Сравнение проводили между группой Ad26.Empty и группами Ad26COVS1 (Ad26NCOV030) и Ad26NCOV006 с использованием t критерия для анализа ANOVA. Коррекцию множественных сравнений не проводили. ***: $p<0,001$; **: $p<0,01$; *: $p<0,05$.

Фиг. 86A-86D. (Фиг. 86A) Титры связывающих S белок антител по данным анализа ИФА. (Фиг. 86B) Титры нейтрализующих антител, измеренные с использованием ppVNA. (Фиг. 86C) Титры нейтрализующих антител, измеренные с использованием wtVNA и изолята Сиэтл Вашингтон, сконструированных для экспрессии люциферазы и GFP, инкубированных на клетках Vero E6. Титры измеряли с использованием системы анализа Nano-Glo Luciferase Assay. (Фиг. 86D) Продуцирование IFN-γ в клетках PBMC, стимулированных пептидом SARS-CoV-2 по данным измерения методом ELISpot

(методом иммуноферментных пятен). Показано суммарное значение синцитийобразующих единиц SFU при стимуляции пептидными фракциями 1 и 2. Пунктирная линия означает значение LOB 50 IFN-γ SFU/10^6 PBMC. Животные с ответом на уровне LOB или ниже показаны незакрашенными символами. Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирная линия означает LLOD, равный 25 для анализа ИФА, 20 для анализа ppVNA, и 4 для анализа wtVNA. Животные с ответом на уровне LLOD или ниже показаны незакрашенными символами. ppVNA = анализ нейтрализации псевдовируса; SFU = бляшкообразующие единицы; вч = вирусные частицы; wtVNA = анализ нейтрализации вируса дикого типа.

Фиг. 87. Анализ вестер-блотингом экспрессии векторов Ad26, кодирующих tPA.S (трек 1), tPA.S.PP (трек 2), S (трек 3), S.dCT (трек 4), tPA.WT.S (трек 5), S.dTM.PP (трек 6) и S.PP (трек 7), в лизатах клеток с использованием поликлональных антител anti-SARS.

Фиг. 88A-88B. Гуморальные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Гуморальные иммунные ответы оценивали через 0, 2 и 4 недели с использованием (фиг. 88A) RBD-специфичных связывающих антител методом ИФА и (фиг. 88B) методом нейтрализации псевдовируса. Красные (сплошные) столбцы означают средние ответы.

Фиг. 89A-89B. Клеточные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Клеточные иммунные ответы оценивали через 4 недели после иммунизации при окрашивании методами (фиг. 89A) IFN-γ ELISPOT и (фиг. 89B) IFN-γ+CD4+ и IFN-γ+CD8+ T клеточных внутриклеточных цитокинов в ответ на S пептидные фракции. Красные (сплошные) столбцы означают средние ответы.

Фиг. 90A-90D. Вирусные нагрузки после заражения вирусом SARS-CoV-2. Макак резус заражали интраназальным и внутритрахеальным способами в дозе $1{,}2x10^8$ вч ($1{,}1x10^4$ PFU) SARS-CoV-2. (Фиг. 90A, фиг. 90B) Величину $\log_{10}$ sgmPHK копий/мл (предел 50 копий/мл) оценивали в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) у контрольных животных плацебо и у вакцинированных животных после заражения. (Фиг. 90C, фиг. 90D) величину $\log_{10}$ sgmPHK копий/мазок (предел 50 копий/мазок) оценивали в образцах мазков из носа (NS) у контрольных плацебо и вакцинированных животных после заражения. Красные линии означают средние величины.

Фиг. 91. Представлены обобщенные результаты измерения пиковых вирусных нагрузок после заражения SARS-CoV-2. Пиковые вирусные нагрузки в образцах BAL и NS после заражения. В дни 1-4 после заражения наблюдались различные пиковые вирусные нагрузки. Красные линии обозначают средние вирусные нагрузки. P-значения означают данные двустороннего анализа Манна-Уитни (*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001).

Фиг. 92. Иммунные ответы после заражения SARS-CoV-2. Титры NAb псевдовируса до заражения и в день 14 после заражения. Красные линии означают средние ответы.

Фиг. 93. Сравнение титров NAb псевдовируса у вакцинированных макак и выздоравливающих макак и людей. Сравнение титров NAb псевдовируса у макак, вакцинированных Ad26.S.PP, с ранее опубликованными данными по когортам выздоравливающих макак и выздоравливающих людей, которые выздоровели после инфекции SARS-CoV-2.

Фиг. 94. Гуморальные иммунные ответы в образцах BAL у вакцинированных макак резус. S-Специфичные IgG и IgA через 4 недели в образцах BAL по данным метода ИФА у контрольных животных плацебо и животных, вакцинированных Ad26.S.PP. Красные столбцы означают средние ответы.

Фиг. 95. Клеточные иммунные ответы у вакцинированных макак резус. Анализ с окрашиванием Т клеточных внутриклеточных цитокинов IFN-γ+, IL-2+, IL-4+ и IL-10+ CD4+ в ответ на S пептидные фракции у вакцинированных белками Ad26.S.dTM.PP и Ad26.S.PP животных. Красные столбцы означают средние ответы.

Фиг. 96A-96C. (Фиг. 96A) Среднее изменение массы тела в процентах после заражения. Числа означают число животных в каждый момент времени, в группе высокой дозы, 4 животных умерщвляли в день 2, 4 животных умерщвляли в день 4, 4 животных удовлетворяли критериям вскрытия в день 6 и 2 животных удовлетворяли критериям вскрытия в день 7. (Фиг. 96B) Изменение массы тела в процентах после заражения у отдельных животных. Средняя потеря массы тела обозначена красным цветом. Звездочки означают смертность. Серые линии означают животных с запланированным вскрытием в день 2 и день 4. (Фиг. 96C) Вирусную нагрузку в тканях измеряли в виде $\log_{10}$ sgmРНК копий/г ткани (предел количественного определения 100 копий/г) после запланированных

вскрытий в день 2 и день 4, и 2-5 животных из 6 животных. которые удовлетворяли критериям вскрытия в дни 6-7. В день 6 расширенные ткани не собирали.

Фиг. 97A-97L. Патологические признаки у хомяков, инфицированных высокой дозой SARS-CoV-2. (Фиг. 97A) Некроз и воспаление (стрелка) в носовой раковине, H&E (d2). (Фиг. 97B) Бронхиолярный эпителиальный некроз с клеточным дебрисом и дегенеративными нейтрофилами в просвете (стрелка) и трансмиграция воспалительных клеток в стенку сосуда (острие стрелки), H&E (d2). (Фиг. 97C) Интерстициальная пневмония, кровоизлияние и уплотнение легочной паренхимы, H&E (d2). (Фиг. 97D) В эпителии носовых раковин по данным иммуногистохимического анализа (IHC) (d2) показана значительная позитивность для SARS-CoV-N. (Фиг. 97E). В бронхиолярном эпителии и клеточном дебрисе просвета по данным анализа IHC (d2) показана значительная позитивность для SARS-CoV-N. (Фиг. 97F) В пневмоцитах и альвеолярной перегородке по данным анализа IHC (d2) показана значительная позитивность для SARS-CoV-N. (Фиг. 97G) Диффузное окрашивание вРНК с использованием гибридизации RNASCOPE® в интерстиции легких (стрелка, интерстициальная пневмония) и в бронхиолярном эпителии (вершина стрелки, d2). (Фиг. 97H) Диффузное окрашивание вРНК с использованием гибридизации RNASCOPE® в интерстиции легких (d4). (Фиг. 97I) IHC Iba-1 (макрофаги) в легочном интерстиции (d7). (Фиг. 97J) CD3+ Т лимфоциты в интерстиции легких, CD3 с использованием IHC (d4). (Фиг. 97K) MPO (миелопероксидаза нейтрофилов) с использованием IHC, указывающая на присутствие интерстициальных нейтрофилов (d7). (Фиг. 97L) Интерферон-ндуцибельный ген MX1, данные IHC указывают на значительную и диффузную позитивность во всей ткани легких (d4). H&E, гематоксилин и эозин, IHC, иммуногистохимический анализ, Iba1, адаптерный белок 1, связывающий ионизированный кальций. Показаны репрезентативные срезы. Эксперименты повторяли по меньшей мере 3 раза и получали аналогичные результаты. Цена деления шкалы = 20 мкм (b, d), 50 мкм (a, e, f), 100 мкм (c, g-l).

Фиг. 98A-98F. Гуморальные иммунные ответы у вакцинированных хомяков. (Фиг. 98A) Иммуногены на основе шиповидного S белка SARS-CoV-2: (i) белок с делецией трансмембранного фрагмента и цитоплазматического хвоста, представляющий собой растворимый эктодомен с тримеризацией фолдон-домена

(S.dTM.PP) или (ii) полноразмерный S белок (S.PP), оба с мутацией в участке расщепления фурином, стабилизирующими мутациями двух остатков пролина. Красные обозначения X означают мутацию участка расщепления фурином, красные вертикальные линии означают мутации пролина, незакрашенные квадраты означают тримеризацию фолдон-домена. S1 и S2 означают первый и второй домены S белка, TM означает трансмембранный фрагмент, а CT означает цитоплазматический домен. Хомяков вакцинировали в дозе 10^{10} вч или 10^{9} вч Ad26-S.dTM.PP или Ad26-S.PP или контрольным плацебо (N=10/группа). Гуморальные иммунные ответы оценивали через 0, 2 и 4 недели (фиг. 98B) с использованием RBD-специфичных связывающих антител методом ИФА и (фиг. 98C) методоми анализа нейтрализации псевдовируса. Красные столбцы отражают средние ответы. Пунктирные линии отражают предел количественного обнаружения анализа. (Фиг. 98D) S- и RBD-специфичный подкласс IgG, FcγR, и ADCD ответы показаны через 4 недели и эти графики представлены в виде лепестковых диаграмм. Размер и интенсивность цвета клиньев указывают на среднее значение признака для соответствующей группы (подкласс антитела, красный цвет; связывание FcγR, синий цвет; ADCD, зеленый цвет). (Фиг. 98E) График анализа основных компонентов (PCA) показывает многомерные профили антител по вакцинированным группам. Каждая точка представляет животное, цвет точки обозначает группу, а эллипсы показывают распределение групп с доверительным интервалом 70%, причем предполагается многомерное нормальное распределение. (Фиг. 98F) На тепловой карте показаны различия в средних показателях z-баллов между вакцинированными группами S.PP и S.dTM.PP. Две группы сравнивали с помощью двустороннего критерия Манна-Уитни, и звездочками обозначены значения q с поправкой Бенджамини-Хохберга (* $q < 0{,}05$, ** $q < 0{,}01$, *** $q < 0{,}001$).

Фиг. 99A-99C. Клиническое заболевание у хомяков после заражения высокой дозой SARS-CoV-2. (Фиг. 99A) Среднее изменение массы тела в процентах после заражения. (Фиг. 99B) Изменение массы тела в процентах после заражения у отдельных животных. Средняя потеря массы тела показана красным цветом. Звездочки указывают на смертность. Серые линии обозначают животных с запланированными вскрытиями в день 4. (Фиг. 99C) Максимальная потеря массы тела в комбинированных группах Ad26-S.dTM.PP (N=14), Ad26-S.PP (N=14) и контрольной группе плацебо (N=7), за исключением животных,

которых умерщвляли в день 4. Значения P отражают данные двустороннего анализа Манна-Уитни. N означает всех животных, у которых регистрировали потерю массы тела и которых не вскрывали в день 4.

Фиг. 100A-100F. Продольный количественный анализ изображения вирусной репликации и ассоциированного воспаления в легких. (Фиг. 100A) площадь легких в процентах, положительных к антисмысловой вирусной РНК SARS-CoV-2 (вРНК) по данным ISH с использованием метода RNASCOPE®. (Фиг. 100B) Число клеток в процентах от общего числа клеток, положительных к белку SARS-CoV-N (ядерный или цитоплазматический) по данным IHC. (Фиг. 100C) Iba-1-положительные клетки на единицу площади по данным IHC. (Фиг. 100D) Число CD3-положительных клеток на единицу площади. (Фиг. 100E) MPO-положительные клетки на единицу площади. (Фиг. 100F) MX1-положительная легочная ткань в процентах в виде доли от общей площади легких. ISH, гибридизация in situ; IHC, иммуногистохимический анализ; нуклеокапсид SARS-N, SARS-CoV; MPO, миелопероксидаза; MX1, белок 1 миксовируса (индуцибельный ген интерферона 1 типа). Каждая точка представляет одно животное.

Фиг. 101. Участников регистрировали одновременно на бельгийских и американских сайтах. Участников рандомизировали параллельно в соотношении 1:1:1:1:1 в одну из пяти групп вакцинации для введения одной или двух внутримышечных инъекций Ad26.COV2.S с двумя уровнями доз $5x10^{10}$ вч или $1x10^{11}$ вч или плацебо. В каждой когорте, в отсутствии клинически значимых признаков через 24 ч после первой вакцинации пяти «контрольных» участников (по одному на уровень дозы и один плацебо), были вакцинированы еще десять участников во всех группах. Затем перед рандомизацией остальных участников были рассмотрены данные по безопасности до дня 28 внутренней Комиссией по контролю данных.

Фиг. 102A-102C. Блок-схемы для когорты 1a (фиг. 102A), когорты 1b (фиг. 102B) и когорты 3 (фиг. 102C).

Фиг. 103A-103D. Гуморальные и клеточные иммунные ответы. (Фиг. 103A) титры log геометрического среднего (GMT, как показано горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени) сывороточных связывающих SARS-CoV-2 антител, измеренные методом ИФА (единиц ИФА на мл [ед./мл] в исходных условиях и в день 29 после вакцинации у всех

участников согласно схеме испытаний в когортах 1a и 3. Пунктирные линии означают нижний предел количественного обнаружения (LLOQ) и верхний предел количественного определения (ULOQ) анализа, планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал (ДИ). В случае значений ниже LLOQ, на график наносили значения LLOQ/2. (Фиг. 103B) log GMT сывороточных нейтрализующих антител SARS-CoV-2, измеренных методом анализа 50% микронейтрализации (ID_{50} Log GMT, как показано горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени), в исходных условиях и в день 29 после вакцинации, для подгруппы участников, согласно схеме испытаний в когорте 1a и 3. Пунктирные линии означают значения LLOQ и ULOQ для анализа, планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал (ДИ). В случае значений ниже LLOQ, на график наносили значения LLOQ/2. (Фиг. 103C) Экспрессию Th1 (IFNγ и/или IL-2, но не IL-4, IL-5 и IL-13), и Th2 (IL-4 и/или IL-5 и/или IL-13 и CD40L) цитокинов CD4 Т клетками измеряли окрашиванием внутриклеточных цитокинов (ICS). Средние значения (как показано горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени) и индивидуальные значения ответов ICS к пептидным фракциям S белка в мононуклеарных клеток периферической крови в исходных условиях и через 15 дней после вакцинации, для подгруппы участников из когорты 1a и 3 согласно схеме испытаний. Проценты означают долю Т клеток, положительных к цитокинам Th1 или Th2. Пунктирные линии означают значения LLOQ. (Фиг. 103D) Экспрессию цитокинов IFNγ и/или IL-2 Т клетками CD8 Т измеряли методом ICS. Средние значения (обозначенные горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени) и индивидуальные значения ответов ICS к пептидным фракциям S белка в мононуклеарных клетках периферической крови в исходных условиях и через 15 дней после вакцинации, для подгруппы участников из когорты 1a и 3 согласно схеме испытаний. Проценты означают долю CD8 Т клеток, положительных к цитокинам IFNγ и/или IL-2. Пунктирные линии означают значения LLOQ.

Фиг. 104. Графическое представление ответов VNA против SARS-CoV-2 (титры средних геометрических [GMT] с соответствующим 95% ДИ) в зависимости от времени.

На фиг. 105 представлено влияние возраста на ответы нейтрализующих антител в день 29.

На фиг. 106 представлены ответы нейтрализующих антител и частота положительного ответа на лечение в когортах испытаний.

На фиг. 107 представлены кривые обратного кумулятивного распределения для группы вакцинированных пациентов в дозе 5×10^{10} вч и группы вакцинированных пациентов в дозе 1×10^{11} вч.

На фиг. 108 показано графическое представление ответов антител, связывающих S белок SARS-CoV-2, измеренных методом ИФА.

На фиг. 109 показан эффект возраста на ответ связывающих антител в день 29.

На фиг. 110 показано графическое представление ответов антител, связывающих S белок SARS-CoV-2, измеренных методом ИФА.

На фиг. 111 представлены кривые обратного кумулятивного распределения для группы вакцинированных пациентов в дозе 5×10^{10} вч и группы вакцинированных пациентов в дозе 1×10^{11} вч.

На фиг. 112 показано, что титры wtVNA строго коррелируют с титрами ИФА как в день 15, так и в день 29, коэффициенты корреляции Спирмана составляют 0,734 и 0,72, соответственно.

На фиг. 113 показана доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1), а не цитокины Th2, и экспрессирующие IL-4 и/или IL-5/IL-13 и CD40L (Th2).

На фиг. 114 показан профиль схем комбинированных испытаний.

На фиг. 115 показана описательная статистика для Т клеток CD8+, продуцирующих IFNγ и/или IL-2 в ответ на стимуляцию S пептидом SARS-CoV-2.

На фиг. 116 показан профиль схем комбинированных испытаний.

Фиг. 117A-117C. SARS-CoV-2-специфические гуморальные иммунные ответы у взрослых макак резус после вакцинирования по схеме однократной дозы и двухкратной дозы Ad26.COV2.S. (Фиг. 117A) Уровни связывающих шиповидный S белок антител измеряли в течение времени модифицированным методом ИФА для образцов человека с использованием трехмерного, растворимого, стабилизированного S белка, продуцированного в клетках млекопитающих в качестве белка для покрытия планшета. Уровни для отдельных животных обозначены серыми точками и парные измерения соединены серыми линиями. Средние геометрические титры (GMT) ответов

связывающих антител на группу обозначены красной линией. Пунктирная линия означает нижний предел обнаружения (LLOD) и нижний предел количественного определения (LLOQ). (Фиг. 117B) Уровни нейтрализующих S белок антител измеряли в течение времени с использованием соответствующего метода psVNA для образцов человека, с использованием частиц вируса, псевдотипированного модифицированной цепью вируса везикулярного стоматита (VSVΔG) и содержащих S гликопротеин SARS-CoV-2. Ответ нейтрализующих антител измеряли как величину, обратную разведению образца, при котором достигается 50% нейтрализация (IC_{50}). Уровни индивидуальных животных показаны серыми точками, а парные измерения соединены серыми линиями. GMT ответов нейтрализующих антител на группу указано красной линией. Пунктирные линии указывают LLOD и LLOQ. (Фиг. 117C) Корреляция между уровнями S-специфичных связывающих антител и титрами нейтрализующих антител для животного во всех группах во все моменты времени за исключением контрольной группы плацебо и недели 0 (исходные условия). Пунктирные линии означают LLOD для каждого анализа.

Фиг. 118A-118C. SARS-CoV-2-специфические гуморальные и клеточные иммунные ответы у взрослых макак резус после вакцинирования. (Фиг. 118A) Уровни антител, связывающих шиповидный S белок, измеряли в течение времени с использованием модифицированного метода ИФА для образцов человека с использованием трехмерного, растворимого, стабилизированного S белка, продуцированного в клетках млекопитающих в качестве белка для покрытия планшета. Уровни для отдельных животных обозначены серыми точками и парные измерения соединены серыми линиями. Средние геометрические титры (GMT) ответов связывающих антител на группу обозначены красной линией. Пунктирная линия означает нижний предел обнаружения (LLOD) и нижний предел количественного определения (LLOQ). (Фиг. 118B) Титры нейтрализующих SARS-CoV-2 антител измеряли в течение времени с использованием метода wtVNA. Уровни индивидуальных животных показаны серыми точками, а парные измерения соединены серыми линиями. Титры GMT на группу обозначены красной линией. Пунктирная линия означает LLOD (Фиг. 118C) Корреляция между уровнями S-специфичных связывающих антител и титрами нейтрализующих антител для животного во всех группах и во все моменты времени за исключением контрольной группы плацебо и недели 0.

Пунктирные линии означают LLOD для каждого анализа. Пунктирная линия означает нижний предел обнаружения (LLOD)

Фиг. 119A-119C. SARS-CoV-2-специфичные клеточные иммунные ответы у взрослых макак резус после вакцинирования. (Фиг. 119A) T клеточные ответы на шиповидный S белок, измеряли методом ELISpot при двойном окрашивании IFN-γ/IL-4 в указанные моменты времени. GMT на группу обозначен горизонтальной линией. Значения для образцов, полученные при вычитании фона и составлявшие 0 или менее, устанавливали на 10 для целей визуализации, обозначены пунктирной линией. (Фиг. 119B) шиповидный S белок-специфичные T клеточные ответы, измеренные окрашиванием внутриклеточных цитокинов в указанные моменты времени. Частота экспрессирующих цитокины CD4+CD69+ T клеток. Средние геометрические титры (GMT) ответов на группу обозначены горизонтальной линией. Пунктирная линия означает технический предел обнаружения. GMT ответа обозначены горизонтальной линией. Незакрашенные символы означают образцы, значения для которых равны техническому пределу. (Фиг. 119C) Соотношение CD4+CD69+ T клеток, экспрессирующих цитокины Th1 (IFN-γ или IL-2) или Th2 (IL-4, IL-5, IL-13). Незакрашенные символы означают значения для клеток, экспрессирующих Th1, Th2 или любой другой цитокин, равны техническому пределу. Пунктирная горизонтальная линия установлена на соотношении, равном 1, для целей визуализации.

Фиг. 120. Шиповидный S белок-специфичные CD4+CD69+ T-клеточные ответы, измеренные окрашиванием внутриклеточных цитокинов в указанные моменты времени. Частота экспрессирующих цитокины CD4+CD69+ T-клеток. Средние геометрические титры (GMT) ответов на группу обозначены горизонтальной линией. Пунктирная линия означает технический предел обнаружения. Незакрашенные символы означают образцы, значения для которых равны техническому пределу обнаружения или менее.

Фиг. 121A-121D. Средние геометрические титры (GMT, как указано горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени), антител, связывающих шиповидный S белок SARS-CoV-2, в сыворотке по данным измерений методом ИФА (единиц ИФА на мл [ед./мл] в исходных условиях и в день 29 после вакцинации у всех участников, и в день 57 и день 71 для пациентов, доступных в когорте 1a, согласно схеме испытаний в когорте 1a (возрастом 18-55 лет) (фиг. 121A), и в когорте 3 (возрастом >65 лет) (фиг. 121B).

Пунктирной линией обозначен нижний предел количественного определения (LLOQ) и верхний предел количественного определения (ULOQ) для анализа, планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал (ДИ). В случае значений ниже LLOQ, на график наносили значения LLOQ/2.

Значения log GMT сывороточных нейтрализующих антител SARS-CoV-2, измеренных методом анализа 50% нейтрализации (ID_{50} Log GMT, как показано горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени), в исходных условиях и в день 29, день 57 и день 71 после вакцинации, для подгруппы участников, согласно схеме испытаний в когорте 1a (18-55 лет) (Фиг.121C) и в когорте 3 (>65 лет) (Фиг. 121D) Пунктирные линии означают значения LLOQ и ULOQ для цикла анализа, который проводили с текущим предварительным разведением, использованным для образцов вакцины, планки погрешностей указывают на 95% доверительный интервал (ДИ). В случае значений ниже LLOQ, на график наносили значения LLOQ/2.

Фиг. 122A-122F. Значения log GMTs сывороточных нейтрализующих SARS-CoV-2 антител (wtVNA), измеренных методом анализа 80% нейтрализации (IC_{80} Log GMT, как показано черными точками и числами под каждым моментом времени), в исходных условиях и в день 29, день 57 и день 71 после вакцинации, для подгруппы участников, согласно схеме испытаний в когорте 1a (возраст 18-55 лет) и в дни 1, 15 и 29 после вакцинации в когорте 3 (>65 лет).

Фиг. 123. График корреляции между титрами нейтрализующих антител Ad26 и SARS-CoV-2: Ad26 VNA исходные условия по сравнению wtVNA в день 29, и Ad26 VNA в день 57 по сравнению с wtVNA в день 71.

Фиг. 124A-124C. Экспрессию цитокинов Th1 (IFN-γ и/или IL-2, а не цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13) (фиг. 124A), и Th2 (IL-4 и/или IL-5 и/или IL-13 и CD40L) (фиг. 124B) Т клетками CD4+ измеряли методом (ICS) при окрашивании внутриклеточных цитокинов. Указаны средние значения (как показано горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени) и индивидуальные ответы ICS на пептидную фракцию S белка SARS-CoV-2 в мононуклеарных клетках периферической крови в исходных условиях и в день 15 после вакцинации для подгруппы участников в когорте 1a (возраст 18-55 лет) и в когорте 3 (возраст >65 лет) согласно схеме испытаний. На оси Y указана доля в процентах Т клеток, положительных к цитокинам Th1 или Th2.

Пунктирные линии означают значения LLOQ. В случае значений ниже LLOQ, на график наносили значения LLOQ/2.

Фиг. 124C. Экспрессию цитокинов IFN-γ и/или IL-2 Т клетками CD8+ измеряли методом ICS. Указаны средние значения (как показано горизонтальными столбцами и числами под каждым моментом времени) и индивидуальные ответы ICS на пептидную фракцию S белка SARS-CoV-2 в мононуклеарных клетках периферической крови, в исходных условиях и в день 15 после вакцинации для подгруппы участников в когорте 1a (возраст 18-55 лет) и в когорте 3 (возраст >65 лет) согласно схеме испытаний. На оси Y указана доля в процентах CD8+ Т клеток, положительных к цитокинам IFN-γ и/или IL-2. Пунктирные линии означают значения LLOQ. В случае значений ниже LLOQ, на график наносили значения LLOQ/2.

Фиг. 125A-125B. Относительная продуктивность очищенного материала Ad26NCOV030 (JNJ 78436735) и Ad26NCOV028 в клетках sPER.C6 и PER.C6 TetR.

A). Клетки sPER.C6 cells B) sPER.C6 TetR. Клетки трандуцировали в матрасах для шейкера очищенным материалом вектора Ad26 (70 или 300 вч/клетка). Образцы отбирали в дни 0, 1, 2, 3 и 4 дня после заражения и концентрацию частиц вектора определяли методом VP-кПЦР. Стандартный контроль (Ad26.ZEBOV) и контроль с низкой концентрацией (26ZIK001). вч, вирусные частицы; кПЦР количественная полимеразная цепная реакция, TetR, репрессор тетрациклина.

Фиг. 126A-126E. Титрование дозы заражения SARS-CoV-2 и гистопатологический анализ у сирийских золотистых хомяков. Сирийских золотистых хомяков (N=12 на группу) заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 в дозе $TCID_{50}10^2$, $10^{3.3}$, $10^{4.6}$ или $10^{5.9}$, или заражали клеточным супернатантом Vero E6 (контроль плацебо). Каждый день отбирали мазки из горла и в дни 2, 3, 4 и 7 после инъекции, 3 хомяков на группу умерщвляли и собирали ткань из носа и легких для вирусологического и гистопатологического анализа. Нагрузку репликационно-компетентного вируса (фиг. 126A) в ткани легких, (фиг. 126B) ткани носа, и (фиг. 126C) мазках из горла, определяли методом анализа $TCID_{50}$ с использованием клеток Vero E6. Значение LLOD рассчитывали на одного животного на грамм или мл ткани, и ответ животных, равный LLOD или менее, обозначен незакрашенными

символами. (Фиг. 126D) Ткань легких анализировали и оценивали на наличие и тяжесть альвеолита, альвеолярного повреждения, альвеолярного отека, альвеолярного кровоизлияния, гиперплазии пневмоцитов II типа, бронхита, бронхиолита, перибронхиальной и периваскулярной инфильтрации. Сумма баллов представлена как сумма параметров заболевания LRT (возможный диапазон: 0–24). (Фиг. 126E) Ткань из носа анализировали и оценивали на тяжесть ринита по шкале баллов от 0 до 3. Пунктирные линии означают минимальные и максимальные значения гистопатологического анализа. Средние ответы на группу указаны горизонтальными линиями, планки погрешностей на панели с указывают диапазон. P.i. = после заражения; LLOD = нижний предел обнаружения; LRT = нижние дыхательные пути; N = количество животных; TCID50/г = 50% инфекционной дозы тканевой культуры на грамм ткани; TCID50/мл = 50% инфекционной дозы тканевой культуры на мл образца, вч = вирусные частицы.

Фиг. 127A-127C. Ответ нейтрализующих антител SARS-CoV-2, вызванный при вакцинировании по схемам 1- и 2-дозами Ad26.COV2.S у сирийских хомяков. (Фиг. 127A) Сирийских хомяков иммунизировали в дозе 10^9 или 10^{10} вч (N=12 на каждый уровень дозы) кандидатов вакцин на основе Ad26 или в дозе 10^{10} вч вектора Ad26 без вставки гена в качестве контроля (Ad26.empty, N=6). Через 4 недели после иммунизации половине хомяков на группу вводили вторую дозу вакцины (тот же уровень дозы кандидата вакцины на основе Ad26 (N=6 на группу). (Фиг. 127B) Титры нейтрализующих SARS-CoV-2 антител определяли через 4 недели после введения дозы 1 и (фиг. 127C) через 4 недели введения дозы 2 с использованием VNA дикого типа при определении ингибирования цитопатического эффекта SARS-CoV-2 на клетках Vero E6. В качестве отрицательного контроля отбирали сыворотки в двух группах сирийских хомяков, иммунизированных образцами Ad26.empty. Средние ответы на группу обозначены горизонтальной линией. Пунктирная линия означает предел обнаружения LLOD. Животные с ответом, равным LLOD или менее, обозначены незакрашенными символами на линии LLOD. CPE = цитопатический эффект; LLOD = нижний предел обнаружения; p.i. = после заражения; VNA = анализ нейтрализации вируса; вч = вирусные частицы.

Фиг. 128A-128C. Ответ связывающих шиповидный белок SARS-CoV-2 антител и отношение к ответам нейтрализующих антител, вызванным при

вакцинировании по схемам 1 и 2 дозами Ad26 у сирийских хомяков. Сирийских хомяков иммунизировали в дозе 10^9 или 10^{10} вч кандидатов вакцин на основе Ad26 Ad26.S, Ad26.dTM.PP или Ad26.COV2.S, или в дозе 10^{10} вч вектора Ad26 без вставки гена в качестве контроля плацебо (Ad26.empty). Через 4 недели после иммунизации половине хомяков на группу вводили вторую дозу вакцины (тот же уровень дозы кандидата вакцины на основе Ad26 (N=6 на группу). Через 2 и 4 недели после первой иммунизации и через 1, 2 и 4 недели после второй иммунизации (недели 5, 6 и 8, соответственно), отбирали образцы крови и сывороток для серологического анализа. (Фиг. 128A) Титры специфичных связывающих шиповидный белок SARS-CoV-2 антител у хомяков после двух иммунизаций (N=6 на группу) измеряли методом ИФА. (Фиг. 128B) Титры нейтрализующих антител измеряли через 4 недели после введения дозы 1 (хомяки после первой иммунизации, N=6) и (фиг. 128C) через 4 недели после введения дозы 2 (хомяки после двух иммунизаций, N=6). Соотношение нейтрализующих антител SARS-CoV-2и связывающих антител рассчитывали при делении титров антител, измеренных с использованием wtVNA, на титры антител, измеренных методом ИФА. Животные с нейтрализующими титрами, равными LLOD или менее, обозначены незакрашенными символами. Средние ответы на группу обозначены горизонтальной линией. LLOD = нижний предел обнаружения; ИФА = иммуноферментный анализ; wtVNA = анализ нейтрализации вируса дикого типа; вч = вирусные частицы.

Фиг. 129A-129C. Ответ связывающих шиповидный белок SARS-CoV-2 и нейтрализующих антител, вызванный при вакцинировании по схемам 2 доз вакцины Ad26 у новозеландских белых кроликов. Новозеландских белых кроликов иммунизировали внутримышечно по схеме иммунизации 2 дозами $5x10^9$ вч или $5x10^{10}$ вч Ad26.S, Ad26.dTM.PP, Ad26.COV2.S, или солевым раствором (фиг. 129A). Сыворотку отбирали перед иммунизацией (день 3) и дни 14, 21, 35, 42, 56, 63, 70, 84 и при умерщвлении (дни 99-101, обозначены на графике как день 100). (Фиг. 129B) Титры связывающих специфичных к шиповидному белку SARS-CoV-2 измеряли методом ИФА. (Фиг. 129C) Титры нейтрализующих антител измеряли в дни 14, 35, 56 и 70, а также перед умерщвлением. Средние ответы на группу обозначены горизонтальной линией, вертикальные линии означают интервалы групп. ИФА = иммуноферментный анализ, wtVNA = анализ нейтрализации вируса дикого типа, LLOQ = нижний

предел обнаружения, ULOQ = верхний предел обнаружения, вч = вирусные частицы.

Фиг. 130A-130F. Защита от репликации вируса SARS-CoV-2 у сирийских хомяков, иммунизированных кандидатами вакцин на основе Ad26. Сирийских хомяков иммунизировали по схемам с 1 дозой и 2 дозами Ad26.S, Ad26.dTM.PP, Ad26.COV2.S, или Ad26.empty (вектор Ad26, не кодирующий любые антигены SARS-CoV-2). Хомяков заражали интраназально дозой 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 штамм BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 через 4 недели после введения дозы 1 (неделя 4) или через 4 недели после введения дозы 2 (неделя 8). (Фиг. 130A, 130B) Ткань правого легкого и (Фиг. 130C, 130D) правые носовые раковины, отобранные при завершении 4-го дня фазы заражения для анализа вирусной нагрузки. Репликационно-компетентный вирус оценивали методом анализа $TCID_{50}$. (Фиг. 130E, 130F) Образцы мазков из горла отбирали каждый день после заражения и площадь вирусной нагрузки под кривой в течение 4 дней наблюдения рассчитывали по уравнению $TCID_{50}$/мл x день. Средняя вирусная нагрузка на группу обозначена горизонтальной линией. Значения LLOD рассчитывали на каждого животного и животные с ответом, равным LLOD или менее, обозначены незакрашенными символами. Сравнение по уровням доз проводили между группами Ad26.S, Ad26.dTM.PP и Ad26.COV2.S и группами Ad26.empty с помощью U критерия Манна-Уитни. Статистические различия обозначены звездочками: *: $p<0,05$; **:$p<0,01$. LLOD = нижний предел обнаружения; $TCID_{50}$/г = 50% инфекционной дозы для тканевой культуры на грамм ткани; TCID50/мл = 50% инфекционной дозы для тканевой культуры на мл образца; вч = вирусные частицы.

Фиг. 131A-131D. Защита от SARS-CoV-2, оцененная методами IHC и гистопатологического анализа в тканях легких сирийских хомяков, иммунизированных кандидатами вакцин на основе Ad26. Сирийских хомяков иммунизировали внутримышечно по схемам 1 дозы и 2-х доз Ad26.S, Ad26.dTM.PP, Ad26.COV2.S, или Ad26.empty (вектор Ad26, не кодирующий любой антиген SARS-CoV-2). Хомяков заражали интраназально дозой 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 штамм BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 через 4 недели после введения дозы 1 (неделя 4) или через 4 недели после введения дозы 2 (неделя 8). Ткань левого легкого, извлеченная через 4 дня после заражения для иммуногистохимического анализа с окрашиванием SARS-CoV-NP и

гистопатологического анализа. Из-за технической неисправности удалось проанализировать ткани только 2 из 8 хомяков, иммунизированных одной дозой Ad26.Emtpy. (Фиг.131A и 131B). Присутствие SARS-CoV-2 NP определяли с помощью иммуногистохимического окрашивания. (Фиг.131C и 131D). Легочную ткань оценивали на наличие и тяжесть альвеолита, альвеолярного повреждения, альвеолярного отека, альвеолярного кровоизлияния, гиперплазии пневмоцитов II типа, бронхита, бронхиолита, перибронхиальной и периваскулярной инфильтрации. Сумма баллов представлена как сумма параметров заболевания LRT. Средние значения на группу обозначены горизонтальными линиями. Сравнение по уровням доз проводили между группами вакцинирования и группой Ad26.empty с помощью U критерия Манна-Уитни, за исключением панели c. Статистические различия обозначены звездочками: *: $p<0,05$; **:$p<0,01$. LLOD = нижний предел обнаружения, вч = вирусные частицы, NP = нуклеокапсидный белок, LRT = нижние дыхательные пути.

Фиг. 132A-132D. Защита от SARS-CoV-2, оцененная методами IHC и гистопатологического анализа в назальных тканях сирийских хомяков, иммунизированных кандидатами вакцин на основе Ad26. Сирийских хомяков иммунизировали внутримышечно по схемам 1 дозы и 2-х доз Ad26.S, Ad26.dTM.PP, Ad26.COV2.S, или Ad26.empty (вектор Ad26, не кодирующий любой антиген SARS-CoV-2). Хомяков заражали интраназально дозой 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 штамм BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 через 4 недели после введения дозы 1 (неделя 4) или через 4 недели после введения дозы 2 (неделя 8). Ткань из левой ноздри извлекали через 4 дня после заражения для иммуногистохимического анализа с окрашиванием SARS-CoV-NP и гистопатологического анализа. Из-за технической неисправности удалось проанализировать ткани только 5 из 8 хомяков, иммунизированных одной дозой Ad26.Emtpy. (Фиг.132A и 132B). Присутствие SARS-CoV-2 NP определяли с помощью иммуногистохимического окрашивания. (Фиг.132C и 132D). Носовую ткань оценивали в баллах на тяжесть ринита. Средние значения на группу обозначены горизонтальными линиями, пунктирными линиями указаны LLOD. Сравнение по уровням доз проводили между группами вакцинирования и группой Ad26.empty с помощью U критерия Манна-Уитни. Статистические различия обозначены звездочками: *: $p<0,05$; **:$p<0,01$. LLOD = нижний предел

обнаружения, вч = вирусные частицы, NP = нуклеокапсидный белок, IHC = иммуногистохимический анализ.

Фиг. 133A-133D. Дозозависимая реакция Ad26.COV2.S на иммуногенность и вирусную нагрузку в легких у хомяков. Сирийских хомяков иммунизировали внутримышечно в дозе 10^7, 10^8, 10^9 или 10^{10} вч Ad26.COV2.S N=8 на группу или 10^{10} вч Ad26.Irr (вектор Ad26, не кодирующий любых антигенов SARS-CoV-2, N=8). Через четыре недели после первой иммунизации определяли титры связывающих антител, специфичных к шиповидному белку SARS-CoV-2 (Фиг. 133A), и титры в нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 (Фиг. 133B). Средние ответы на группу обозначены горизонтальной линией. Пунктирная линия означает предел обнаружения LLOD. Животные с ответом, равным LLOD или менее, обозначены незакрашенными символами. Хомяков заражали интраназально дозой 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 штамм BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 через 4 недели после иммунизации (неделя 4). Ткань из правого легкого извлекали через 4 дня после заражения для вирусологического и иммуногистохимического анализа. (Фиг. 133C) Вирусную нагрузку в легких определяли методом анализа $TCID_{50}$ на клетках Vero E6. Средние ответы на группу обозначены горизонтальной линией. LLOD рассчитывали на животное и животные с ответом, равным LLOD или менее, обозначены незакрашенными символами. (Фиг. 133D) Присутствие SARS-CoV-2 NP определяли при иммуногистохимическом проявлении. Сравнение по уровням доз проводили между группами Ad26.COV2.S с группой Ad26.Irr с помощью U критерия Манна-Уитни. Статистические различия обозначены звездочками: *:$p<0,05$; **:$p<0,01$; ***:$p<0,001$. Ad26.Irr = вектор Ad26 не кодирует любой антиген SARS-CoV-2. LLOD = нижний предел обнаружения, N = число животных, $TCID_{50}$/г = 50% инфекционной дозы для тканевой культуры на грамм ткани, вч = вирусные частицы, NP = нуклеокапсидный белок.

Фиг. 134. У иммунизированных Ad26 сирийских хомяков, зараженных вирусом SARS-CoV-2, не наблюдалось никаких симптомов VAERD через 4 дня после заражения IN дозой 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 (N = 8 на группу), а) ткань легкого извлекали и оценивали на наличие и тяжесть альвеолита, альвеолярного повреждения, альвеолярного отека, альвеолярного кровоизлияния, гиперплазии пневмоцитов II типа, бронхита, бронхиолита, перибронхиальной и периваскулярной инфильтрации. Сумма баллов представлена как сумма

параметров заболевания LRT. б) Через четыре дня после заражения ткань из носа извлекали и оценивали по степени тяжести воспаления (ринита).

Горизонтальные линии означают степень патологии 0 баллов, указывающую на отсутствие гистопатологии. Символы красного цвета обозначают образцы от хомяков с прорывной вирусной нагрузкой в легких ($>10^2$ TCID50/г). Сравнения проводили по уровню дозы между группами Ad26.COV2.S и группой Ad26.Irr с использованием U-критерия Манна-Уитни. Статистические различия отмечены звездочками: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001. Ad26.Irr = вектор Ad26, не кодирующий любые антигены SARS-CoV-2; LRT = нижние дыхательные пути; N = количество животных; вч = вирусные частицы.

Фиг. 135A-135D. Связывающие и нейтрализующие антитела коррелируют с защитой. Защиту каждого вакцинного конструкта определяли как вирусную нагрузку ниже 10^2 $TCID_{50}$/г ткани легких, независимо от схемы вакцинирования и уровня дозы (см. фиг. 129A и B, и Fig 133C). Сирийских хомяков иммунизировали один или два раза в дозе 10^9 или 10^{10} вч Ad26.S или Ad26.dTM.PP (N=24 на конструкт) или 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10} вч Ad26.CoV.S (N=56). Хомяков заражали в дозе 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 и через четыре дня умерщвляли для вирусологического анализа легочной ткани. Перед заражением вирусом образцы сывороток анализировали для определения титров (фиг. 135A) связывающих антител и (фиг.135B) титров нейтрализующих антител. Средние ответы антител на группу обозначены горизонтальными линиями. Пунктирная линия означает предел обнаружения LLOD. (Фиг. 135C) Модели логистической регрессии вероятности защиты были построены с поправкой Ферта на титры связывающих и нейтрализующих антител из комбинированных схем и уровней доз Ad26.COV2.S. Пунктирные линии указывают 95% доверительный интервал. LLOD = нижний предел обнаружения, N = число животных, $TCID_{50}$/г = 50% инфекционной дозы для тканевой культуры на грамм ткани, вч = вирусные частицы.

Фиг. 136A-136C. Быстрая индукция связывающих и нейтрализующих антител после вакцинации белком Ad26.COV2.S. (Фиг. 136A) S-специфичные связывающие антитела по данных анализа ИФА, и (фиг. 136B) RBD-специфичные связывающие антитела по данным анализа ИФА, и (фиг. 136C) нейтрализующие псевдовирус антитела (psVNA) в день 1 и день 8 у реципиентов с высокой дозой (HD) и низкой дозой (LD) Ad26.COV2.S или плацебо (PL).

Красные столбцы означают средние геометрические титры (GMT). Значения P отражают данные двустороннего анализа Манна-Уитни.

Фиг. 137A-137B. Кинетика и значение связывающих и нейтрализующих антител после вакцинации Ad26.COV2.S. (A) S- и RBD-специфические связывающие антитела по данным анализа ИФА и (B) ответы нейтрализующих псевдовирус SARS-CoV-2 (psVNA) антител и нейтрализующих вирус Ad26 антител (Ad26 VNA), после вакцинации Ad26.COV2.S. LD, низкая доза; HD, высокая доза; PL, плацебо. Красные столбцы означают средние геометрические титры (GMT). Пунктирные линии отражают нижние пределы количественного определения.

Фиг. 138. Корреляция гуморальных иммунных ответов. Корреляция титров $\log_{10}$ S-специфичных антител по данным ИФА, $\log_{10}$ RBD-специфичных антител по данным ИФА, и титров $\log_{10}$ нейтрализующих антител (NAb) в день 29. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

Фиг. 139A-139B. Перекрестная реактивность антител после вакцинации белком Ad26.COV2.S. Электро-хемилюминесцентный анализ (Meso Scale Discovery SARS-CoV-2 IgG панель 2, K15369U-2) для оценки ответов связывающих антител к белку S из (фиг. 139A) SARS-CoV-2 и SARS-CoV-1, а также (фиг. 139B) CoV-229E, CoV-HKU1, CoV-NL63 и CoV-OC43 после вакцинации белком Ad26.COV2.S. LD, низкая доза; HD, высокая доза; PL, плацебо. Красные столбцы означают средние геометрические ответы (GMT). Пунктирные линии отражают нижние пределы количественного определения.

Фиг. 140A-140B. Кинетика и значение клеточных иммунных ответов после вакцинации Ad26.COV2.S. (Фиг. 140A) Ответы IFN-γ и IL-4 ELISPOT и (фиг. 140B) IFN-γ клеток центральной памяти, CD27+ CD45RA- CD4+ и CD8+ T клеточные ответы по данным анализа ICS после вакцинации белком Ad26.COV2.S. Анализ ICS проводили в подгруппе участников с достаточным количеством мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в день 71/85. SFC – клетка, образующая «ореол», LD, низкая доза; HD, высокая доза; PL, плацебо. Красные столбцы означают средние геометрические титры (GMT). Пунктирные линии отражают нижние пределы количественного определения.

Фиг. 141. Корреляция клеточного и гуморального иммунных ответов. Корреляция ответов $\log_{10}$ ELISPOT с титрами $\log_{10}$ S-специфичных антител

методом ИФА, и $\log_{10}$ RBD-специфичных титров методом ИФА, и log10 нейтрализующих антител (NAb) в день 29. Значения P и R отражают данные двустороннего анализа ранговой корреляции Спирмена.

Фиг. 142. Кумулятивная заболеваемость молекулярно подтвержденными случаями COVID-19 от умеренной до тяжелой/критической формы тяжести с началом развития заболевания по меньшей мере через 1 день после вакцинации, полный набор анализов.

Фиг. 143. Кумулятивная заболеваемость молекулярно подтвержденными случаями COVID-19 от умеренной до тяжелой/критической формы тяжести с началом развития заболевания по меньшей мере через 1 день после вакцинации до дня 29 по серостатусу, полный набор анализов.

Фиг. 144. Кумулятивная заболеваемость молекулярно подтвержденными случаями COVID-19 тяжелой/критической формы тяжести с началом развития заболевания по меньшей мере через 1 день после вакцинации полный набор анализов.

Фиг. 145. Сила (интенсивность) инфицирования. Плацебо-уровень заболеваемости COVID-19 в различных странах.

Подробное описание настоящего изобретения

Определения

Использованный в данном контексте термин «приблизительно» означает ± 10% от указанной величины.

Термины «вектор аденовируса» и «аденовирусный вектор» используются взаимозаменяемо и относятся к сконструированному методом генной инженерии аденовирусу, созданному для включения исследуемого полинуклеотида (например, полинуклеотид, кодирующий иммуноген 2019-nCoV) в эукариотическую клетку, например, в клетку таким образом, чтобы затем экспрессировать полинуклеотид. Примеры аденовирусов, которые можно использовать в качестве вирусного вектора включают векторы, которые содержат вирусы или их производные следующих серотипов Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52 (например, RhAd52), Ad59 (например, RhAd59) и Pan9 (также известный как AdC68), или получены из них, например, аденовирусы человека, шимпанзе или макак резус. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения аденовирусом является вирус Ad26.

Термин «адъювант» означает фармакологический или иммунологический агент, который модифицирует эффект других агентов (например, вакцин), в то же время практически не оказывает прямых эффектов при введении самого по себе. Их часто включают в вакцины для усиления иммунного ответа реципиента на вводимый антиген, сводя при этом к минимуму инъецируемый чужеродный материал.

Используемый в данном контексте термин «введение» означает способ введения фармацевтической композиции (например, иммуногенной композиции (например, вакцины) (например, вакцины против коронавируса Ухань (2019-nCoV)) субъекту. Композиции, используемые в описанных в данном контексте способах, можно вводить, например, следующими способами: внутримышечным, внутривенным, внутрикожным, чрескожным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутриочаговым, внутричерепным, внутрисуставным, внутрипростатическим, внутриплевральным, внутритрахеальным, интраназальным, интравитреальным, интравагинальным, интраректальным, местным, внутриопухолевым, перитонеальным, подкожным, субконъюнктивальным, внутрипузырным, через слизистую оболочку, интраперикардиальным, внутрипупочным, внутриглазным, пероральным, местным, локальным, ингаляционным, инъекционным, вливанием, непрерывным вливанием, локальным вливанием, обмыванием клеток-мишеней напрямую, через катетер, с использованием лаважа, через желудочный зонд, в виде кремов или липидных композиций. Предпочтительный способ введения можно изменять в зависимости от различных факторов (например, предназначенные для введения компоненты композиции и тяжесть подлежащего лечению состояния).

Термины «антитело» и «иммуноглобулин (Ig)» используются взаимозаменяемо в самом широком смысле и включают моноклональные антитела (например, полноразмерные или интактные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность) и могут также включать определенные фрагменты антитела. Антитело обычно включает как «легкие цепи», так и «тяжелые цепи». Легкие цепи антител (иммуноглобулинов) любых видов позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных

доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей иммуноглобулины можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно разделить на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Использованный в данном контексте термин «кодон» относится к любой группе трех последовательных нуклеотидных оснований в данной молекуле информационной РНК, или кодирующей цепи ДНК, которая определяет конкретную аминокислоту или начальный или стоп-сигнал для трансляции. Термин «кодон» также относится к триплетам оснований в цепи ДНК.

В описании и формуле настоящего изобретения слово «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать, что оно включает указанное целое число или группу целых чисел, но не исключает любое другое целое число или группы целых чисел.

Используемый в данном контексте термин «выздоравливающий» относится к субъектам, которые выздоровели или выздоравливают от коронавирусной инфекции (например, 2019-nCoV). «Когорта выздоравливающих людей» относится к группе людей, которые имеют общие характеристики (например, пол, возраст, масса тела, история болезни, раса, этническая принадлежность или окружающая среда) и выздоровели или выздоравливают от коронавирусной инфекции (например, 2019-nCoV). Предпочтительно, чтобы когорта выздоравливающих людей имела общие характеристики с субъектом из группы риска заражения 2019-nCoV или подозреваемым в восприимчивости к коронавирусной инфекции. Предпочтительно образцы от выздоравливающих людей получают по меньшей мере через 7 дней после документально подтвержденного выздоровления (например, определяемого с помощью отрицательного мазка из носа).

Термины «эктодомен» или «межклеточный домен» относятся к части шиповидного полипептида коронавируса, которая выходит за пределы трансмембранного домена в межклеточное пространство. Эктодомен опосредует связывание шиповидного белка с одним или несколькими рецепторами

коронавируса (например, ACE2). Например, эктодомен включает домен S1 (например, SEQ ID NO: 4) и RBD (например, SEQ ID NO: 5) шиповидного полипептида.

«Носитель для доставки гена» определен, как любая молекула, которая может нести вставленные полинуклеотиды в клетку-хозяина. Примерами носителей для доставки гена являются липосомы, биосовместимые полимеры, включающие природные полимеры и синтетических полимеры, липопротеины, полипептиды, полисахариды, липополисахариды, искусственные вирусные оболочки, частицы металла и бактерии или вирусы, такие как бакуловирус, аденовирус и ретровирус, бактериофаг, космида, плазмида, грибковые векторы и другие рекомбинантные носители, обычно используемые в данной области техники, которые были описаны для экспрессии в ряду эукариотических и прокариотических хозяев, и их можно использовать в генной терапии, а также для простой экспрессии белка.

Термины «ген для доставки», «ген для переноса» и тому подобные, использованные в данном контексте, относятся к включению экзогенного полинуклеотида (иногда используется как «трансген») в клетку-хозяина, независимо от метода, использованного для включения. Такие методы включают ряд технологий, таких как, например, вектор-опосредованный перенос гена (например, вирусная инфекция/трансфекция, или различные другие комплексы для доставки генов на основе белков или липидов), а также технологии для ускорения доставки «оголенных» полинуклеотидов (такие как электропорация, «генная пушка» и ряд других технологий, используемых для включения полинуклеотидов). Включенный полинуклеотид может стабильно или временно присутствовать в клетке-хозяина. Для стабильного присутствия обычно требуется, чтобы включенный полинуклеотид либо содержал источник репликации, совместимый с клеткой-хозяина, либо мог интегрировать в репликон клетки-хозяина, такой как внехромосомный реликон (например, плазмида) или ядерная или митохондриальная хромосома. Ряд векторов способны опосредовать перенос генов в клетки млекопитающих.

«Генный продукт» означает, что он включает иРНК или другие нуклеиновые кислоты (например, микроРНК), транскрибированные из гена, а также полипептиды, транслированные из таких иРНК. В некоторых вариантах генным продуктом является продукт из вируса (например, 2019-nCoV) и может

включать, например, любой один или более вирусных белков или их фрагментов, описанных в данном контексте.

Термин «молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты» означает нуклеотидную последовательность, которая может кодировать белки, происходящие или полученные из патогенных организмов, таких как вирусы, которые могут быть включены в полинуклеотид или вектор. Гетерологичные нуклеиновые кислоты могут также кодировать синтетические или искусственные белки, такие как иммуногенные эпитопы, сконструированные для индукции иммунитета. Примером молекулы гетерологичной нуклеиновой кислоты является нуклеиновая кислота, которая кодирует один или более иммуногенных пептидов или полипептидов, происходящих из коронавируса (например, 2019-nCoV). Молекулой гетерологичной нуклеиновой кислоты является нуклеиновая кислота, которая обычно не ассоциирована с другими молекулами нуклеиновой кислоты, которые найдены в полинуклеотиде или векторе, в который включена молекула гетерологической нуклеиновой кислоты.

Термин «клетка-хозяина» означает клетки, в которые вставлена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяина включают «трансформант» и «трансформированные клетки», которые включают первичную трансформированную клетку и потомство, происходящее из них независимо от количества пересевов. Клетки-хозяина включают клетки в организме субъекта (например, субъекта-млекопитающего (например, человека), в которые была вставлена экзогенная нуклеиновая кислота.

«Иммуноген» означает любой полипептид, который может индуцировать иммунный ответ у субъекта после введения. В некоторых вариантах иммуноген кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, которую можно вставить, например, в полинуклеотид или вектор для последующей экспрессии иммуногена (например, исследуемый генный продукт или его фрагменты (например, полипептид)).

Термин «иммуногенная композиция», использованный в данном контексте, определен, как материал, используемый, чтобы вызвать иммунный ответ, и может усилить иммунитет после введения иммуногенной композиции субъекту.

Термин «иммуностимулирующий агент» относится к веществам (например, лекарственным веществам и питательным веществам), которые стимулируют иммунную систему, индуцируя активацию или повышение активности любого из

ее компонентов. Иммуностимулирующий агент включает цитокин (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и интерферон (например, IFN-α и/или IFN-γ).

Термин «выделенный» означает отделенный, регенерированный или очищенный материал от компонентов его природной окружающей среды. Например, молекулу нуклеиновой кислоты или полипептида можно выделить из компонентов его природной окружающей среды в количестве 1% (2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20% , 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%) или более.

«Фармацевтическая композиция» означает любую композицию, которая содержит терапевтически или биологически активный агент, такой как иммуногенная композиция или вакцина (например, молекула нуклеиновой кислоты, вектор и/или полипептид 2019-nCoV), предпочтительно включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую исследуемый антигенный продукт гена или его фрагмента, который является пригодным для введения субъекту и который оказывает лечебное или профилактическое действие на заболевание (например, инфицирование 2019-nCoV) или снижает или смягчает один или более симптомов заболевания (например, титр вируса 2019-nCoV, распространение, инфицирование и/или слияние с клетками вируса). Для осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции включают вакцины и фармацевтические композиции являются пригодными для доставки терапевтически или биологически активного агента, и могут включать, например, таблетки, желатиновые капсулы, капсулы, пилюли, порошки, грануляты, суспензии, эмульсии, растворы, гели, гидрогели, пасты, глазные капли, мази, кремы, пластыри, капельницы, устройства для доставки, суппозитории, клизмы, инъекционные препараты, имплантаты, спреи или аэрозоли. Любую из этих композиций можно получить хорошо известными и общепринятыми способами в данной области техники. См., например, статьи Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21-е изд.), ред. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, (2005) и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, ред. J. Swarbrick, Informa Healthcare (2006), которые включены в описание в качестве ссылок.

Термины «присоединенный» или «соединение» или «связь», использованные в данном контексте, означают ковалентное соединение двух

аминокислотных последовательностей или последовательностей двух нуклеиновых кислот через пептидную или фосфодиэфирную связь, соответственно, при этом такое соединение может включать любое количество дополнительных аминокислотных или нуклеиновых последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновой кислоты, которые были присоединены.

«Молекула нуклеиновой кислоты» или «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо и означают полимеры нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги или любой субстрат, который можно вставить в полимер с использованием ДНК или РНК полимеразы, или реакции химического синтеза. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Модификацию нуклеотидной структуры, если она присутствует, можно осуществлять до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов можно прерывать ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после синтеза, например, при конъюгации с меткой.

«Вакцина на основе нуклеиновой кислоты» означает вакцину, которая включает молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты под контролем промотера для экспрессии у субъекта. Молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты можно включать в экспрессионный вектор, такой как плазмида. «Вакцина на основе ДНК» относится к вакцине, в составе которой нуклеиновой кислотой является ДНК. «Вакцина на основе РНК» относится к вакцине, в составе которой нуклеиновой кислотой является РНК (например, иРНК).

Нуклеиновая кислота является «оперативно присоединенной», если она расположена в структурной или функциональной зависимости от другой последовательности нуклеиновой кислоты. Например, один сегмент ДНК можно функционально соединить с другим сегментом ДНК, если они расположены относительно друг друга в одной и той же непрерывной молекуле ДНК и если они характеризуются структурной или функциональной взаимосвязью, такие как промотер или энхансер, которые расположены относительно кодирующей последовательности, чтобы ускорить транскрипцию кодирующей последовательности; сайт связывания рибосом, который расположен

относительно кодирующей последовательности таким образом, чтобы ускорить трансляцию; или пре-последовательность или секреторную лидерную последовательность, которая расположена относительно кодирующей последовательности таким образом, чтобы ускорить экспрессию предшественника белка (например, пре-белок, который принимает участие в секреции кодируемого полипептида). В других примерах операционно связанные последовательности нуклеиновой кислоты не являются смежными, а расположены таким образом, что они характеризуются функциональной связью друг с другом как нуклеиновые кислоты или как белки, которые ими экспрессируются. Энхансеры, например, необязательно должны быть смежными. Присоединение может завершаться за счет лигирования с пригодными сайтами рестрикции или с использованием синтетических адапторов олигонуклеотидов или линкеров.

Термин «оптимизированный» означает иммуногенный полипептид, который не является природным пептидом, полипептидом или белком, таким как неприродный вирусный полипептид (например, полипептид шиповидного белка). Оптимизированные последовательности вирусных полипептидов первоначально создают при модификации аминокислотной последовательности одного или более природных продуктов вирусного гена (например, пептиды, полипептиды и белки) для увеличения степени, интенсивности, глубины или продолжительности противовирусного иммунного ответа (например, клеточного или гуморального иммунных ответов), генерируемого при иммунизации (например, при включении в композицию, например, вакцину) субъекта (например, человека). Таким образом, оптимизированный вирусный полипептид может соответствовать «исходной» последовательности вирусного гена; в другом варианте, оптимизированный вирусный полипептид может не соответствовать конкретной последовательности "исходного" вирусного гена, но может соответствовать аналогичным последовательностям из различных штаммов или квазивидов вируса. Модификации последовательности вирусного гена, которые можно включать в оптимизированный вирусный полипептид, включают добавления, замены и делеции аминокислот. В одном варианте полипептидом является полипептид шиповидного белка, который в последствии изменяют для включения лидерной/сигнальной последовательности (например, сигнальная последовательность шиповидного белка или сигнальная

последовательность tPA) для максимальной экспрессии белка, сайта фактора Xa, домена тримеризации фолдона (см. например, SEQ ID NO: 87), и/или последовательностей линкера или спейсера (например, SEQ ID NO: 88 или 89). Оптимизированный полипептид может, но не обязательно, включать также мутацию (мутации) участка расщепления (например, мутацию участка расщепления фурином (например, SEQ ID NO: 91)). Методы конструирования оптимизированного вирусного полипептида описаны, например, в статье Fisher и др. “Polyvalent Vaccine for Optimal Coverage of Potential T-Cell Epitopes in Global HIV-1 Variants,” *Nat. Med.* 13(1):100-106 (2007) и в международной заявке WO 2007/024941, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок. Как только последовательность оптимизированного вирусного полипептида сконструирована, соответствующий полипептид можно продуцировать или вводить стандартными методами (например, рекомбинантные вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы, описанные в международных заявках WO 2006/040330 и WO 2007/104792, которые включены в данное описание в качестве ссылок) и необязательно его можно собрать в форму стабилизированного тримера полипептида.

Термины «оптимизированный кодон» и «кодон оптимизированный», использованные в данном описании, относятся к последовательности кодона, которую можно модифицировать в соответствии с частотами кодонов в организме-мишени (например, субъекте) или в организме хозяина, но которая не изменяет аминокислотную последовательность исходного транслируемого белка.

«Фармацевтически приемлемый разбавитель, эксципиент, носитель или адъювант» означает разбавитель, эксципиент, носитель или адъювант, который является физиологически приемлемым для субъекта при сохранении терапевтических свойств фармацевтической композиции, в составе которой его вводят. Типичным фармацевтически приемлемым носителем является физиологический раствор. Другие физиологически приемлемые носители, эксципиенты, носители или адьюванты и их составы известны специалистам в данной области техники (см., например заявку США Pub. No. 2012/0076812).

Термины “сегмент” или “фрагмент” означает часть целого. Сегмент может включать по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% всей длины полинуклеотида или области полипептидной последовательности. В случае полинуклеотидов, например, фрагмент может

включать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 или более смежных нуклеотидов эталонной молекулы полинуклеотида. В случае полипептидов, например, фрагмент может включать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 или более смежных аминокислот эталонной молекулы полипептида.

В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-шиповидного белка (SEQ ID NO: 121). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-Spike-dF-PP (SEQ ID NO: 143 и 204). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-SdCT (SEQ ID NO: 122). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-S.Ecto (SEQ ID NO: 123). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-S1-foldon (SEQ ID NO: 129). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-RBD-foldon (SEQ ID NO: 130). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-S.Ecto-dF-foldon (SEQ ID NO: 136 или 193). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать

по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, или более нуклеотидов полинуклеотида SS-S.Ecto-PP-foldon (SEQ ID NO: 142). В некоторых случаях фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, или более смежных нуклеотидов полинуклеотида SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (SEQ ID NO: 195).

В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, или более смежных аминокислот полипептида SS-Spike (SEQ ID NO: 29). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, или более смежных аминокислот полипептида SS-SdCT (SEQ ID NO: 30). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, или более смежных аминокислот полипептида SS-Spike-dF-PP (SEQ ID NO: 51). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, или более смежных аминокислот полипептида SS-S.Ecto (SEQ ID NO: 31). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, или более смежных аминокислот полипептида SS-S1-foldon (SEQ ID NO: 37). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, или более смежных аминокислот полипептида SS-RBD-foldon (SEQ ID NO: 38). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, или более смежных аминокислот полипептида SS-S.Ecto-dF-foldon (SEQ ID NO: 44). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, или более смежных аминокислот полипептида S.Ecto-PP-foldon (SEQ ID NO: 50). В

некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, или более смежных аминокислот полипептида SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (SEQ ID NO: 56). В некоторых случаях фрагмент полипептида может включать по меньшей мере 20, 25, 50, 75, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, или более смежных аминокислот полипептида prM-Env, содержащего JEV Stem/TM (SEQ ID NO: 27).

В некоторых случаях введение фрагмента полинуклеотида (например, SEQ ID NO: 93-181, 190-195, и 199-204) и/или полипептида (например, SEQ ID NO: 1-84, например, SEQ ID NO: 51) субъекту может вызвать иммунный ответ у субъекта.

«Промотер» означает последовательность нуклеиновой кислоты, обеспечивающей инициацию транскрипции последовательности гена в иРНК, причем инициация транскрипции происходит при связывании РНК полимеразы с промотером или вблизи его окружающей среды.

Словосочетание «ускоряющий иммунный ответ» означает вызывающий гуморальный ответ (например, выработку антител) или клеточный ответ (например, активацию Т-клеток, макрофагов, нейтрофилов и/или природных клеток-киллеров), направленный, например, против одного или более инфекционных агентов (например, вирус (например, 2019-nCoV)) или белковых мишеней у субъекта, которому вводили фармацевтическую композицию (например, иммуногенную композицию или вакцину).

Термин «заболевание, опосредованное 2019-nCoV» используется взаимозаменяемо с термином «заболевание коронавирусом 2019 (COVID-19)", использованный в данном контексте, а также его грамматические варианты, относится к любой патологии или последствиям, которые, как известно в данной области техники, вызваны (отдельно или в сочетании с другими медиаторами), усилены или связаны с инфекцией или воздействием 2019-nCoV (SARS-CoV-2) у субъекта, страдающего от заболевания. Заболевание может представлять собой острую форму (например, лихорадка) или хроническую (например, хроническая усталость), легкую (например, выпадение волос) или тяжелую форму (например, органная недостаточность) форму заболевания и форму с ранним началом (например, через 2–14 дней после заражения) или с поздним началом (например,

через 2 недели после заражения). Неограничивающие примеры тяжелой формы заболевания включают пневмонию, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), острую дыхательную недостаточность, отек легких, органную недостаточность или летальный исход. Неограничивающие примеры симптомов включают потерю массы тела, лихорадку, кашель, затрудненное дыхание, утомляемость, головную боль, потерю вкуса или обоняния, выпадение волос, сыпь, боль в горле, тошноту и диарею. Симптомы могут являться легкими или тяжелыми (например, потеря массы более чем на 5% в течение недели и высокая температура) и временными или постоянными.

«Защитный уровень» относится к количеству или уровню маркера (например, антитела, клетки (например, иммунной клетки, например, Т клетки, В клетки, NK клетки или нейтрофила)), который свидетельствует о частичной или полной защите от коронавирусной инфекции или заболевания. Количество или уровень маркера, превышающие защитный уровень, указывают на защиту от коронавирусной инфекции (например, инфицирования 2019-nCoV) или тяжелой формы заболевания (например, заболевания, опосредованного 2019-nCoV, например, COVID-19, например, тяжелого течения заболевания COVID-19). Количество или уровень маркера ниже защитного уровня указывают на предрасположенность к коронавирусным инфекции или заболеванию (например, опосредованным 2019-nCoV, например, COVID-19, например, тяжелая форма клинического заболевания). Маркер может представлять собой один показатель (например, уровень нейтрализующего антитела) или маркер может представлять собой комбинацию нескольких показателей (например, уровень нейтрализующего антитела и уровень RBD-специфического IgG2). В некоторых случаях защитный уровень представляет собой титр антител против коронавируса по меньшей мере приблизительно 70 при измерении с использованием анализа нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте, титр антител против коронавируса по меньшей мере приблизительно 25 при измерении с использованием описанного в данном контексте анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, или титр антител против коронавируса, который превышает уровень по меньшей мере приблизительно на 80% медианного или среднего уровня когорты выздоравливающих пациентов, по данным определения с использованием анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном

контексте. В некоторых случаях защитный уровень представляет собой титр антител против коронавируса по меньшей мере приблизительно 100 по данным определения с использованием анализа нейтрализации псевдовируса.

Использованный в данном контексте термин «образец» представляет собой полученную или происходящую от субъекта композицию, содержащую клеточный и/или другой молекулярный материал, который необходимо охарактеризовать и/или идентифицировать, например, на основании физических, биохимических, химических и/или физиологических характеристик. Образец может представлять собой твердую ткань из свежего, замороженного и/или консервированного органа, образец ткани, биоптат и/или аспирационный биоптат, кровь или любые компоненты крови, такие как плазма; жидкости организма, такие как спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость, перитонеальная жидкость или интерстициальная жидкость. Образец также может представлять собой первичные или культивируемые клетки или клеточные линии. Образец может содержать соединения, которые в природных условиях не смешиваются с тканями, такие как консерванты, антикоагулянты, буферные вещества, фиксаторы, воск, питательные вещества, антибиотики и т.п.

«Идентичность последовательностей» или «сходство последовательностей» означают, что идентичность или сходство, соответственно, двух или более аминокислотных последовательностей или двух или более нуклеотидных последовательностей выражают в терминах идентичности или сходства последовательностей. Идентичность последовательностей можно определять в «процентах (%) идентичности», при этом более высокий процент указывает на большую идентичность последовательностей. Сходство последовательностей можно определять в процентах сходства (которое учитывает консервативные аминокислотные замены), при этом чем выше процент, тем больше общего между последовательностями. Гомологи или ортологи нуклеиновых или аминокислотных последовательностей характеризуются относительно высокой степенью идентичности/сходства последовательностей при выравнивании с использованием стандартных способов. Идентичность последовательностей можно определять с использованием программного обеспечения, установленного по умолчанию (например, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Такое программное обеспечение может

сопоставлять сходные последовательности, присваивая степени гомологии различным заменам, делециям и другим модификациям. Идентичность/сходство последовательностей можно определить для всех или определенной части двух или более сравниваемых последовательностей.

«Сигнальный пептид» означает короткий пептид (например, длиной 5-30 аминокислот, например длиной 17 аминокислот, например, SEQ ID NO: 92) в N-концевом фрагменте полипептида, который направляет полипептид на секреторный путь (например, внеклеточное пространство). Сигнальный пептид обычно отщепляется в ходе секреции полипептида. Сигнальная последовательность может направлять полипептид в внутриклеточное пространство или органеллу, например, в аппарат Гольджи. Сигнальную последовательность можно идентифицировать по гомологии или биологической активности пептида с известной функцией полипептида, направляющей пептид в конкретную область клетки. Специалист в данной области техники может идентифицировать сигнальный пептид с помощью легкодоступного программного обеспечения (например, пакета программного обеспечения для анализа последовательностей компании Genetics Computer Group, Биотехнологического центра Университета Висконсина, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST или PILEUP/PRETTYBOX). Сигнальный пептид может являться пептидом, который, например, в значительной степени идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92.

Использованный в данном контексте термин «специфически связывается» означает реакцию связывания, определяющей присутствие антигена в гетерогенной популяции белков и других биологических молекул, которые распознаются, например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с подробной характеристикой. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с антигеном, будут связываться с антигеном, при этом K_D составляет менее 100 нМ. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с антигеном, причем K_D составляет величину до 100 нМ (например, от 1 пМ до 100 нМ). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не проявляют специфического связывания с конкретным антигеном или его эпитопом, характеризуются величиной K_D более 100 нМ (например, более 500 нМ, 1 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ или 1 мМ) для этого конкретного антигена или

его эпитопа. Для выбора антител, характеризующихся специфической иммунореактивностью в отношении конкретного белка или углевода, можно использовать различные форматы иммунологического анализа. Например, анализы твердофазного ИФА обычно используют для выбора антител, характеризующихся специфической иммунореактивностью в отношении белка или углевода. См. статьи Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, New York (1988) и Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Press, New York (1999), в которых описаны форматы и условия иммунологического анализа, которые можно использовать для определения специфической иммунореактивности.

Использованный в данном контексте термин «стабилизированный тример полипептида» или «стабилизированный тример» означает, но не ограничиваясь перечисленным, олигомер, который включает последовательность белка и/или полипептида, которая повышает стабильность (например, за счет присутствия одного или более доменов олигомеризации) в трехмерной структуре (например, снижает диссоциацию тримера на мономерные субъединицы.) Стабилизированный тример полипептидв, например, может представлять собой гомотример. «Домен олигомеризации» означает, но не ограничиваясь перечисленным, последовательность полипептида, которую можно использовать для повышения стабильности олигомерного белка оболочки, например, для повышения стабильности тримера шиповидного белка. Домены олигомеризации можно использовать для повышения стабильности гомоолигомерных полипептидов, а также гетероолигомерных полипептидов. Домены олигомеризации хорошо известны в данной области техники и включают «домены тримеризации». Домен тримеризации означает домен олигомеризации, который стабилизирует тримерные полипептиды (например, тримеры, состоящие из одного или более полипептидов шиповидного белка). Примеры доменов тримеризации включают, но не ограничиваясь перечисленным, домен тримеризации Т-4-фибритин «фолдона», домен суперспиральной тримеризации, полученный из GCN4 (Yang et al. J. Virol. 76:4634 (2002)); и каталитическая субъединица аспартат-транскарбамоилазы *E. coli* в качестве тримерной метки (Chen et al. J. Virol. 78:4508 (2004)).

«Субъект» представляет собой позвоночное животное, такое как млекопитающее (например, примат и человек, прежде всего человек с

сопутствующими заболеваниями (например, гипертонией, диабетом или сердечно-сосудистым заболеванием)). Млекопитающие также включают, но не ограничиваясь ими, сельскохозяйственных животных (таких как КРС), спортивных животных (например, лошадей), домашних животных (таких как кошки и собаки), мышей, крыс, летучих мышей, циветт и енотовидных собак. Субъект, подлежащий лечению в соответствии со способами, описанными в данном контексте (например, субъект, нуждающийся в защите от инфекции 2019-nCoV или страдающий от инфекции 2019-nCoV), может представлять собой субъекта, у которого практикующий врач диагностировал такую потребность или инфекционное заболевание. Диагностика может быть выполнена любым пригодным способом. Субъекту, у которого рекомендуется предотвратить развитие инфекции, может быть поставлен или не поставлен такой диагноз. Специалисту в данной области представляется очевидным, что субъекта, нуждающегося в лечении по настоящему изобретению, можно обследовать с использованием стандартных методов анализа или его можно без обследования отнести в группу субъектов, у которых предполагается инфицирование или высокий риск инфицирования из-за присутствия одного или нескольких факторов риска (например, воздействие вируса 2019-nCoV, например, из-за поездки в район, где преобладает инфекция 2019-nCoV). Кроме того, люди с сопутствующими заболеваниями (например, гипертонией, диабетом или сердечно-сосудистыми заболеваниями) идентифицируются как субъекты с высоким риском заражения коронавирусом (например, 2019-nCoV). Таким образом, способы лечения субъекта композицией прежде всего являются пригодными для лечения, снижения и/или предотвращения инфекции 2019-nCoV у людей с сопутствующими заболеваниями.

Использованный в данном контексте термин «трансфекция» относится к любой из множества различных технологий, обычно используемых для включения молекулы экзогенной нуклеиновой кислоты (например, ДНК, такая как вектор экспрессии) в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорация, липофекция, осаждение фосфатами кальция, трансфекция DEAE-декстраном и т.п.

Используемый в данном контексте и как хорошо известно в данной области техники, термин «лечение» относится к подходу для получения благоприятных или требуемых результатов, таких как клинические результаты. Благоприятные

или требуемые результаты могут включать, го не ограничиваясь только ими, облегчение или улучшение одного или нескольких следующих симптомов (например, лихорадку, боль в суставах, сыпь, конъюнктивит, мышечную боль, головную боль, ретроорбитальную боль, отек, лимфаденопатию, недомогание, астению), боль в горле, кашель, тошнота, рвота, диарея и гематоспермия) или состояния (Zammarchi et al., J. Clin. Virol. 63:32-5, 2015; Waddell et al., PLoS One 11(5): e0156376 , 2016); уменьшение степени заболевания, расстройства или состояния; стабилизацию (например, отсутствие ухудшения) течения заболевания, расстройства или состояния; предотвращение распространения болезни, расстройства или состояния; задержку или замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния; улучшение или временное облегчение заболевания, расстройства или состояния; и ремиссию (частичная или полная), определяемую или неопределяемую. «Смягчение» заболевания, расстройства или состояния означает, что степень и/или нежелательные клинические проявления заболевания, расстройства или состояния уменьшаются и/или прогрессирование замедляется или удлиняется по сравнению со степенью или продолжительностью течения заболевания при отсутствии лечения. Лечение может включать одно или более терапевтических средств, таких как одна или более композиций, описанных в данном контексте, и/или одно или более дополнительных терапевтических средств. Дополнительные терапевтические агенты могут включать агенты, которые стимулируют (например, интерфероны) или ингибируют (например, противовоспалительный агент, такой как кортикостероиды, например, дексаметазон) иммунный ответ. Лечение может включать одно или несколько терапевтических вмешательств, таких как хирургическое вмешательство или положение лицом вниз.

Используемый в данном контексте термин «вакцина» означает материал, используемый для индукции иммунного ответа и обеспечивающий иммунитет на определенный период времени после введения вакцины субъекту.

«Вектор» означает конструкт ДНК, который включает один или более полинуклеотидов или их фрагментов, таких как полинуклеотиды вируса 2019-nCoV различных видов. Вектор можно использовать для заражения клеток субъекта, что приводит к трансляции полинуклеотидов вектора в белковый продукт. Одним из типов вектора является «плазмида», которая относится к

кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяина, в которую они введены (например, бактериальные векторы с репликацией бактериального происхождения и векторы на основе эписомальной ДНК млекопитающих). Другие векторы (например, векторы млекопитающих не-эписомального происхождения) можно интегрировать в геном клетки-хозяина при включении в клетку-хозяина и, таким образом, обеспечивается их репликация наряду с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы называются в данном контексте «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «рекомбинантными векторами»). Как правило, векторы экспрессии, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании «плазмида» и «вектор» иногда могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Другие векторы включают, например, вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы (например, вектор Ad26), прежде всего, описанные в данном описании.

Термин «вирус», использованный в данном контексте определен как инфекционный агент, который не способен расти или воспроизводиться вне клетки-хозяина и который инфицируют млекопитающих (например, человека).

Термин «вирусный вектор» означает рекомбинантным способом продуцированный вирус или вирусный материал, то есть частица, которая содержит полинуклеотид для доставки в клетку-хозяина. Примеры вирусных векторов включают ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы (например, см. заявку PCT № WO 2006/002203), альфавирусные векторы и т.п.

В объектах настоящего изобретения, в которых перенос гена опосредуется ДНК-вирусным вектором, таким как аденовирус (Ad (например, Ad26)) или аденоассоциированный вирус (AAV), векторный конструкт относится к полинуклеотиду, содержащему вирусный геном или его часть, и трансгену. Векторы Ad представляют собой относительно хорошо охарактеризованную гомогенную группу вирусов, включающую более 50 серотипов (WO 95/27071). Векторы Ad, можно продуцировать простым методом, и при этом не требуется интеграция в геном клетки-хозяина. Также были сконструированы

рекомбинантные векторы, полученные из Ad, прежде всего векторы, которые снижают возможность рекомбинации и генерации вируса дикого типа (WO 95/00655 и WO 95/11984). Векторы, которые содержат как промотер, так и сайт клонирования, в который можно оперативно присоединять полинуклеотид, известны в данной области техники. Такие векторы способны обеспечивать транскрипцию РНУ in vitro или in vivo. Для оптимизации экспрессии и/или транскрипции in vitro может потребоваться удаление, добавление или изменение 5' и/или 3' нетранслированных областей клонов с целью удаления экстракодонов, потенциально несоответствующих альтернативных кодонов инициации трансляции или других последовательностей, которые могут препятствовать экспрессии или уменьшать экспрессию либо на уровне транскрипции, либо на уровне трансляции.

Другие признаки и преимущества представляются очевидными из следующего подробного описания, фигур и формулы изобретения.

Подробное описание настоящего изобретения

В изобретении предлагается молекула изолированной нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, которая кодирует шиповидный белок 2019-NCOV (S) (называемый также в данном контексте SARS-CoV-2 S). включающий следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а) стабилизирующие мутации аминокислотных остатков пролина в положении аминокислотных остатков 986 и 987,

б) мутации участка расщепления фурином (SEQ ID NO: 90).

Последовательность SEQ ID NO: 29 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного шиповидного белка 2019-NCOV Spike (S), см. также NCBI Reference Sequence: YP_009724390.1. Стабилизирующие мутации расположены от исходной аминокислоты в этой последовательности до пролина. Исходная аминокислота в положении 986 является лизином (lys, K), а в положении 987 - валином (val, V) как показано в последовательности SEQ ID NO: 29.

Участок расщепления фурином в белке 2019-NCOV Spike (S) включает последовательность RARR (SEQ ID NO: 90) или характеризуется ею. Пригодные мутации могут включать мутацию SRAG (SEQ ID NO: 225) или GGSG (SEQ ID NO: 91). Мутацию SRAG осуществляют при включении в аминокислотную

последовательность мутаций R682S и R685G. Мутацию осуществляют при включении мутации GGSG за счет включения в аминокислотную последовательность мутаций R682G, R683G, A684S и R685G.

В некоторых вариантах указанные изменения являются единственными модификациями, внесенными в последовательность SEQ ID NO: 29. Таким образом, предпочтительная молекула нуклеиновой кислоты кодирует полноразмерный белок 2019-NCOV Spike (S) со стабилизирующими мутациями и мутациями в участке расщепления фурином в качестве единственных модификаций.

В других вариантах выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок Spike (S) 2019-NCOV, который содержит следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в. Делеция сигнальной последовательности.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая белок Spike (S) 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), при этом предпочтительно CMV опосредует ранний промотер. В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая белок Spike (S) 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), включающему по меньшей мере один мотив оператора тетрациклина (TetO). В определенных вариантах промотер цитомегаловируса (CMV), включающий по меньшей мере один мотив TetO, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 219. В некоторых вариантах промотер CMV состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 219. Эти нуклеиновые кислоты обычно образуют часть вектора. Векторы подробно описаны в данном контексте в следующем разделе.

В изобретении предлагается также изолированный белок 2019-NCOV Spike (S) (называемый также в данном контексте белок SARS-CoV-2 S), включающий следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а. стабилизирующие мутации аминокислотных остатков пролина в положении аминокислотных остатков 986 и 987,

б) мутации участка расщепления фурином (SEQ ID NO: 90).

В некоторых вариантах указанные изменения являются единственными модификациями, внесенными в последовательность SEQ ID NO: 29. В других вариантах изолированный белок 2019-NCOV Spike (S), включает следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в) делеция сигнально последовательности.

Термин «рекомбинантный» в отношении нуклеиновой кислоты, белка и/или аденовируса, использованный в данном контексте, означает, что они модифицированы вручную, например, в случае аденовектора изменены концевые фрагменты, которые активно клонированы в нем, и/или он содержит гетерологичный ген, т.е. он не является природным аденовирусом дикого типа.

В данном контексте представлены нуклеотидные последовательности в направлении от 5’ до 3’, как принято в данной области техники.

Семейство коронавирусов включает роды *Alphacoronavirus, Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. Все эти роды содержат патогенные вирусы, которые могут инфицировать множество животных, включая птиц, кошек, собак, КРС, летучих мышей и человека. Эти вирусы вызывают ряд заболеваний, включая кишечные и респираторные заболевания. Диапазон хозяев в первую очередь определяется вирусным шиповидным белком (S белком), который опосредует проникновение вируса в клетки-хозяина. Коронавирусы, которые могут инфицировать человека, относятся как к роду *Alphacoronavirus*, так и к роду *Betacoronavirus*. Известные коронавирусы, вызывающие респираторные заболевания у людей, являются членами рода *Betacoronavirus*. К ним относятся SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и MERS, OC43 и HKU1.

Как описано выше, SARS-CoV-2 может вызывать тяжелую форму респираторных заболеваний у человека. Для прекращения пандемии COVID-19 может потребоваться безопасная и эффективная вакцина против SARS-CoV-2.

Шиповидный S белок SARS CoV-2 связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), который является рецептором проникновения, используемым вирусом SARS-CoV-2. ACE2 представляет собой трансмембранную металлокарбоксипептидазу I типа, гомологичную ACE, ферменту, хорошо известному как ключевой компонент в ренин-ангиотензиновой системе (RAS) и как мишень для лечения гипертонии. Он

экспрессируется, среди прочих, в эндотелиальных клетках сосудов, эпителии почечных канальцев и в клетках Лейдига в семенниках. ПЦР-анализ свидетельствует о том, что ACE-2 также экспрессируется в легких, почках и желудочно-кишечном тракте, то есть в тканях, которые, как было показано, содержат SARS-CoV-2. Шиповидный S белок коронавирусов является основным поверхностным белком и мишенью для нейтрализующих антител у инфицированных пациентов (Lester et al., Access Microbiology;1 (2019)) и поэтому считается потенциальным защитным антигеном для разработки вакцины. В ходе исследования, которое привело к созданию настоящего изобретения, было разработано несколько антигенных конструктов на основе S белка вируса SARS-CoV-2. Неожиданно было обнаружено, что нуклеиновая кислота по изобретению (т.е. SEQ ID NO: 211) обладает высокой иммуногенностью при экспрессии. и что аденовекторы, содержащие эту нуклеиновую кислоту, можно получать с высокими выходами. Вектор Ad26, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS CoV-2 с последовательностью SEQ ID NO: 205, индуцирует устойчивае ответы нейтрализующих антител и обеспечивает полную защиту в бронхоальвеолярном лаваже и/или практически полную защиту в мазках из носа после заражения SARS-CoV-2. Кроме того, как показано в разделе Примеры, однократная вакцинация обеспечивает надежную защиту от SARS-CoV-2 у нечеловекообразных приматов.

В одном объекте в настоящего изобретения предлагаются изолированные и/или рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие стабилизированный белок S коронавируса, прежде всего SARS-CoV-2 S, при этом указанные нуклеиновые кислоты включают нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 211-218, или их фрагментов.

В предпочтительном варианте в настоящем изобретении предлагается изолированная и/или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая стабилизированный S белок коронавируса, прежде всего SARS-CoV-2 S, при этом указанная нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, включающую или состоящую из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 211 или ее фрагментов.

В изобретении предлагаются также изолированные и/или рекомбинантные S белки коронавируса, включающие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 205-210 или их фрагментов, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие такие S белки коронавируса или их фрагментов.

В предпочтительном варианте предлагается изолированный и/или рекомбинантный S белок коронавируса, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 или его фрагменты, а также нуклеиновые кислоты, кодирующие такие S белки коронавируса или их фрагменты. S Белок может включать или может не включать сигнальный пептид (или лидерную последовательность). Сигнальный пептид может включать аминокислоты 1-13 последовательности SEQ ID NO: 205. В определенных вариантах S белок коронавируса состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 205 без сигнального пептида.

Специалисту представляется очевидным, что множество различных нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же полипептид или белок в результате вырождения генетического кода. Следует также понимать, что специалисты в данной области могут, используя стандартные методики, осуществлять замены нуклеотидов, которые не влияют на аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеиновыми кислотами, чтобы отразить использование кодонов любым конкретным организмом-хозяина, в котором должны экспрессироваться полипептиды. Следовательно, если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки и РНК, могут включать интроны.

Таким образом, изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим S белок коронавируса, прежде всего, S белок SARS-CoV-2 с последовательностью SEQ ID NO: 205, или его фрагмент. В некоторых вариантах нуклеиновая кислота оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетках человека.

Термин «фрагмент», используемый в данном документе, относится к белку или (поли)пептиду, который характеризуется N-концевой и/или С-концевой

и/или внутренней делецией, но при том оставшаяся аминокислотная последовательность является идентичной в соответствующих положениях в последовательности S белка SARS-CoV-2, например, в полноразмерной последовательности S белка SARS-CoV-2. Следует понимать, что для индукции иммунного ответа и в основном для целей вакцинации, не требуется использовать полноразмерный белок и не требуется, чтобы этот белок обладал всеми функциями белка дикого типа, и в равной степени пригодными являются фрагменты белка (без сигнального пептида).

Фрагмент по изобретению представляет собой иммунологически активный фрагмент и обычно включает по меньшей мере 15 аминокислот или по меньшей 30 аминокислот S белка SARS-CoV-2. В определенных вариантах фрагмент включает по меньшей мере 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или 550 аминокислот S белка SARS-CoV-2.

Специалисту в данной области техники также представляется очевидным, что в белок можно вносить изменения, например, за счет аминокислотных замен, делеций, добавлений и т. д., например, с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Как правило, консервативные аминокислотные замены могут применяться без потери функции или иммуногенности полипептида, что можно подтвердить простым способом в соответствии с обычными методиками, хорошо известными специалисту в данной области техники.

В настоящем изобретении, кроме того, предлагается вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению.

В некоторых вариантах вектор представляет собой аденовирусный вектор, такой как рекомбинантный аденовирусный вектор человека. Аденовирус по изобретению принадлежит к семейству *Adenoviridae* и предпочтительно относится к роду *Mastadenovirus*. Такой вирус может представлять собой аденовирус человека, а также аденовирус, инфицирующий другие виды, включая, но не ограничиваясь перечисленным, аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус крупного рогатого скота 3, BAdV3), аденовирус собаки (например, CAdV2), аденовирус свиньи (например, PAdV3 или 5), или аденовирус приматов (который включает аденовирус приматов и аденовирус обезьянообразных, такой как аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Предпочтительно аденовирус представляет собой аденовирус человека (HAdV, или AdHu), или аденовирус обезьянообразных, таких как аденовирус шимпанзе

или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV) или аденовирус обезьян резус (RhAd). В изобретении аденовирус человека означает, если упоминается Ad без указания вида, например, краткое обозначение “Ad26” означает аденовирус HAdV26, который представляет собой аденовирус серотипа 26 человека. Также использованное в данном контексте обозначение “rAd” означает рекомбинантный аденовирус, например, “rAd26” означает рекомбинантный аденовирус 26 человека.

Наиболее передовые исследования проводили с использованием аденовирусов человека, и аденовирусы человека являются предпочтительными в соответствии с некоторыми объектами изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах рекомбинантный аденовирус по изобретению основан на аденовирусе человека. В предпочтительных вариантах рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе человека серотипов 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49, 50, 52 и т. д. Согласно прежде всего предпочтительному варианту изобретения аденовирус представляет собой аденовирус человека серотипа 26. Преимущества этих серотипов включают низкую серопревалентность и/или низкие титры ранее существовавших нейтрализующих антител в популяции человека, а также опыт испытаний на людях в условиях клинических испытаний.

Аденовирусы обезьянообразных, как правило, также характеризуются низкой серопревалентностью и/или низкими титрами ранее существовавших нейтрализующих антител в популяции человека, и сообщается о значительном количестве работ с использованием аденовирусных векторов шимпанзе (например, US6083716, WO 2005/071093, WO 2010/086189), WO 2010/085984, Farina et al., J Virol 75: 11603-11613 (2001), Cohen et al., J Gen Virol 83: 151-155 (2002), Kobinger et al., Virology 346: 394-401 (2006), Tatsis et al. al., Molecular Therapy 15: 608-617 (2007), см. также обзор Bangari and Mittal, Vaccine 24: 849-862 (2006), и обзор Lasaro and Ertl, Mol Ther 17: 1333-1339 (2009). Следовательно, в других вариантах рекомбинантный аденовирус по изобретению основан на аденовирусе обезьянообразных, например, аденовирусе шимпанзе. В некоторых вариантах рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе обезьянообразных типа 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P. В некоторых вариантах рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе

шимпанзе, таком как ChAdOx 1 (см., например, WO 2012/172277), или ChAdOx 2 (см., например, WO 2018/215766). В некоторых вариантах рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе шимпанзе, таком как BZ28 (см., например, WO 2019/086466). В некоторых вариантах рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе гориллы, таком как BLY6 (см., например, WO 2019/086456), или BZ1 (см., например, WO 2019/086466).

В предпочтительно варианте векторы аденовируса включают капсидные белки редких серотипов, включая Ad26. В типичном варианте вектором является вирус rAd26. «Капсидный белок аденовируса» означает белок капсида аденовируса (например, векторы Ad26, Ad35, rAd48, rAd5HVR48), которые принимают участие в определении серотипа или тропизма конкретного аденовируса. Капсидные белки аденовируса обычно включают белки фибрилл, пентона и/или гексона. Используемый в данном контексте термин «капсидный белок» для конкретного аденовируса, такой как «капсидный белок Ad26», может являться, например, гибридным капсидным белком, который включает по меньшей мере часть капсидного белка Ad26. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок представляет собой целый капсидный белок Ad26. В некоторых вариантах гексон, пентон и фибриллы представляют собой элементы из вируса Ad26.

Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что элементы, полученные из множества серотипов, можно комбинировать в едином рекомбинантном векторе аденовируса. Таким образом, можно получить гибридный аденовирус, который обладает комбинированными требуемыми свойствами из различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах в гибридный аденовирус по изобретению может сочетать отсутствие ранее существовавшего иммунитета первого серотипа с такими характеристиками, как температурная стабильность, сборка, заякоривание, выход продуцирования, перенаправленное или улучшенное заражение, стабильность ДНК в клетке-мишени и т.п. (См., например, WO 2006/040330 для гибридного аденовируса Ad5HVR48, который включает основную цепь Ad5 с частичными капсидами вируса Ad48, а также, например, WO 2019/086461 для гибридных аденовирусов Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, которые включают основную цепь вируса Ad26, включающую частичные капсидные белки Ptr1, Ptr12 и Ptr13, соответственно).

В некоторых предпочтительных вариантах вектор рекомбинантного аденовируса, используемый в настоящем изобретении, получен в основном или полностью из Ad26 (то есть вектор rAd26). В некоторых вариантах аденовирус является дефицитным по репликации, например, за счет того, что содержит делецию в области E1 генома. Для аденовирусов, полученных из аденовирусов, не входящих в группу C, таких как Ad26 или Ad35, типично заменять кодирующую последовательность E4-orf6 аденовируса на E4-orf6 аденовируса человека подгруппы C, такого как Ad5. Такая замена позволяет размножать такие аденовирусы в хорошо известных дополняющих клеточных линиях, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т.п. (см., например, Havenga, et al., J. Gen Virol 87: 2135-2143 (2006), WO 03/104467). Однако такие аденовирусы неспособны к репликации в не-дополняющих клетках, которые не экспрессируют E1 гены Ad5.

Получение векторов рекомбинантных аденовирусов хорошо известно в данной области техники. Получение векторов rAd26 описано, например, в заявке WO 2007/104792 и в статье Abbink и др., Virol 81(9): 4654-4663 (2007). Типичные последовательности генома Ad6 можно найти в банке данных GenBank Accession EF 153474 и в последовательности SEQ ID NO: 1 в заявке WO 2007/104792. Примеры векторов, используемых в изобретении, например, включают векторы, описанные в заявке WO2012/082918, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Обычно вектор, использованный в изобретении, продуцируют с использованием нуклеиновой кислоты, включающей полный геном рекомбинантного аденовируса (например, плазмида, космида или вектор бакуловируса). Таким образом, в изобретении также предлагаются изолированные молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют векторы аденовируса по изобретении. Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут присутствовать в форме РНК или в форме ДНК, которые получают при клонировании или с использованием химического синтеза. ДНК может яыляться собой двухцепочечной или одноцепочечной.

Векторы аденовируса, пригодные для использования в настоящем изобретении, обычно являются дефицитными по репликации. В этих вариантах дефицитный по репликации вирус получают при делеции или инактивации участков, которые являются особо важными (ключевыми) для репликации

вируса, таких как область E1. Такие участки могут быть в значительной степени удалены или инактивированы, например, за счет включения исследуемого гена, такого как ген, кодирующий синтетический S белок SARS CoV2 (обычно присоединенный к промотеру), или ген, кодирующий антигенный полипептид SARS CoV2 S (обычно присоединённый к промотеру) в пределах участка. В некоторых вариантах векторы по изобретению могут содержать делеции в других участках, таких как участки E2, E3 или E4, или вставки гетерологичных генов, присоединённых к промотеру в одном или более таких участков. В случае E-2 и/или E-4-мутированных аденовирусов, в основном используют E-2 и/или E-4- линии дополняющих (комплементарных клеток) для генерирования рекомбинантных аденовирусов. Мутации в участке E3 аденовируса не обязательно должны быть дополнены клеточной линией, поскольку E3 не требуется для репликации.

В некоторых вариантах рекомбинантный аденовирус человека содержит делецию в участке E1, делецию в участке E3 или делецию как в участке E1, так и в участке E3 аденовирусного генома. Таким образом, в некоторых вариантах аденовирусный вектор по настоящему изобретению лишен по крайней мере одной важной функции гена участка E1, например, участка E1a и/или участка E1b аденовирусного генома, который необходим для репликации вируса. В некоторых вариантах вектор аденовируса по изобретению не включает по меньшей мере часть не существенного участка E3. В некоторых вариантах вектор лишен по меньшей мере одной существенной функции гена в участке E1 и по меньшей мере одной части не существенного участка E3. Вектор аденовируса может представлять собой «многократно лишенный» вектор, то есть вектор аденовируса лишен одной или более важных функций гена в каждом из двух или более участков генома аденовируса. Например, указанные выше E1-лишенные или E1-, E3-лишенные векторы аденовируса могут представлять собой дополнительно лишенные по меньшей мере в одном существенном гене участка E4 и/или по меньшей мере в одном существенном гене участка E2 (например, участок E2A и/или участок E2B).

В некоторых вариантах вектор представляет собой рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26 (векторы rAd26). Этот серотип обычно характеризуется низкой серопревалентностью и/или низкими титрами ранее существовавших нейтрализующих антител в популяции человека. Получение

векторов rAd26 описано, например, в заявке WO 2007/104792 и в статье Abbink et al., Virol 81(9): 4654-4663(2007). Примеры геномных последовательностей Ad26 можно найти в базе данных GenBank Accession EF 153474 и в последовательности SEQ ID NO:1 WO 2007/104792.

В предпочтительном варианте аденовирус является репликационно-дефективным, например, поскольку содержит делецию в участке E1 генома. Специалисту в данной области техники известно, что в случае делеций существенных участков из генома аденовируса, функции, кодирующие эти участки, должны быть представлены в транс-активной форме. Предпочтительно в клетке-продуценте, то есть, когда части или целые участки E1, E2 и/или E4, удалены из аденовируса, и они должны присутствовать в клетке-продуценте, например, интегрированы в ее геном, или в форме так называемого аденовируса-хелпера или в плазмидах-хелперах. Аленовирус может также характеризоваться делецией в участке E3, который является необязательным для репликации и следовательно, такая делеция не должна быть дополняющей. В предпочтительном варианте рекомбинантный репликационно-некомпетентный вектор аденовируса человека тип 26 (Ad26) конструировали для кодирования шиповидного S белка SARS CoV-2, стабилизированного в его конформации доя слияния. Предпочтительно аденовирус включает нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 205.

Линию «пакующих клеток» обычно используют для получения достаточного количества аденовирусных векторов для использования в изобретении. Пакующая клетка представляет собой клетку, которая содержит гены, которые подвергали делеции или инактивации в векторе с отсутствием репликации, и таким образом пакующая клетка обеспечивает репликацию вируса в клетке. Пригодные линии пакующих клеток для аденовирусов с делецией в участке E1 включают, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

В предпочтительном варианте вектором является вектор аденовируса, и более предпочтительно вектор rAd26, наиболее предпочтительно вектор rAd26 по крайней мере с одной делецией в участке E1 аденовирусного генома, например, как описано в статье Abbink, J Virol. 81(9): p. 4654-4663 (2007), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Обычно последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетические антигены SARS CoV-2 S, клонируют в участки E1 и/или E3 генома аденовируса.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая S белок коронавируса, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), включающему по меньшей мере один мотив оператора тетрациклина (TetO). Такая структура обеспечивает экономически эффективное крупномасштабное получение аденовирусных частиц, содержащих вставку S белка SARS CoV-2. Не ограничиваясь теорией, предполагается, что S белок SARS CoV-2 приводит к более низким уровням продуцирования аденовирусных частиц. Добавление мотива TetO в промотеру CMV обеспечивает более высокие уровни продуцирования аденовирусных частиц.

Использованный в данном контексте термин «промотер» означает последовательность нуклеиновой кислоты, позволяющую инициировать транскрипцию последовательности гена в иРНК, причем такая транскрипция инициируется при связывании РНК-полимеразы на промотере или рядом с ним.

Как определено выше, в некоторых вариантах промотер представляет собой промотер цитомегаловируса, содержащий по меньшей мере один мотив тетрациклинового оператора (TetO). Мотив TetO можно отнести к «регуляторной последовательности» или «регуляторному элементу», использованному в данном контексте для определения сегмента нуклеиновой кислоты, который обычно, но не ограничиваясь перечисленным, модулирует транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты, к которой он оперативно присоединен и таким образом действует как транскрипционный модулятор. Регуляторная последовательность в большинстве случаев включает последовательности нуклеиновой кислоты, которые представляют собой транскрипционные домены связывания и которые распознаются доменами связывания нуклеиновой кислоты в составе транскрипционных белков и/или факторов транскрипции, энхансеров или репрессоров и т.п. Например, можно оперативно соединить последовательность репрессора с промотером, при этом указанную последовательность репрессора можно присоединить к белку-репрессору, который может снизить или предотвратить экспрессию трансгена в линии клеток-продуцентов, которые экспрессируют белок-репрессор. Такой конструкт может улучшить генетическую стабильность и/или уровни экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в ходе пересева, и/или когда они продуцируются в больших количествах в линии клеток-продуцентов. Такие системы описаны в данной области техники. Регуляторная последовательность

может включать один или более мотивов/последовательностей оператора тетрациклина (TetO) и таким образом экспрессия ингибируется в присутствии белка-репрессора (TetR). В отсутствии тетрациклина белок TetR способен связываться с участками TetO и подавлять транскрипцию трансгена (например, антигена SARS CoV-2 S), оперативно присоединенного к мотивам/последовательностям TetO. В определенных вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая S белок SARS CoV-2, если присутствует в векторе аденовируса, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), включающему по меньшей мере один мотив оператора тетрациклина (TetO), и таким образом экспрессия S белка SARS CoV-2 ингибируется в рекомбинантных аденовирусах, которые продуцируются в линии клеток-продуцентов, в которых экспрессируется белок TetR. Экспрессия не ингибируется, если вектор рекомбинантного аденовируса введен субъекту или в клетки, которые не экспрессируют белок TetR. Однако изобретение не ограничивается применением промотера цитомегаловируса, включающего по меньшей мере один мотив оператора TetO.

Использованный в данном контексте термин «репрессор» относится к молекулам (например, белкам), обладающим способностью ингибировать, препятствовать, замедлять и/или подавлять продуцирование гетерологичного белкового продукта рекомбинантного вектора экспрессии (например, аденовирусного вектора). Репрессор может ингибировать экспрессию, взаимодействуя с участком связывания в соответствующем месте экспрессионного вектора, например, в кассете экспрессии (например, TetR может связывать мотив TetO в промотере CMV). Подавление экспрессии векторного трансгена во время размножения вектора может предотвратить нестабильность трансгена и может увеличить выход векторов, содержащих трансген, во время продуцирования.

Нуклеиновая кислота является «оперативно присоединенной», когда она находится в структурной или функциональной взаимосвязи с последовательностью другой нуклеиновой кислоты. Например, один сегмент ДНК можно оперативно присоединить к другому сегменту ДНК, если они расположены относительно друг друга в той же самой непрерывной молекуле ДНК и находятся в структурной или функциональной взаимосвязи, например, промотер или энхансер, который расположен относительно кодирующей

последовательности таким образом, что ускоряет транскрипцию кодирующей последовательности; сайт связывания рибосом, который расположен относительно кодирующей последовательности таким образом, чтобы ускорять трансляцию; или последовательность-предшественник или секреторная лидерная последовательность, которая расположена относительно кодирующей последовательности таким образом, чтобы ускорить экспрессию белка-предшественника (например, белок-предшественник, который принимает участие в секреции кодируемого полипептида). В других примерах, оперативно присоединённые последовательности нуклеиновой кислоты не являются смежными, а расположены таким образом, что они находятся в функциональной взаимосвязи друг с другом в качестве нуклеиновых кислот или в качестве белков, которые ими экспрессируются. Энхансеры, например, не обязательно должны являться смежными. Связывание можно осуществлять с использованием лигирования в удобных сайтах рестрикции или с использованием синтетических олигонуклеотидных адаптеров или линкеров.

В некоторых вариантах промотер CMV, включающий по меньшей мере один мотив TetO, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 219, предпочтительно промотер CMV состоит из последовательности SEQ ID NO: 219.

В предпочтительном варианте вектор аденовируса продуцируется в клетках PER.C6-тетрациклин-репрессор (TetR).

В изобретении дополнительно предлагаются композиции, включающие нуклеиновую кислоту, белок и/или вектор по изобретению. Согласно изобретению для введения человеку используют фармацевтические композиции, включающие нуклеиновую кислоту, белок и/или вектор и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В данном контексте термин «фармацевтически приемлемый» означает, что носитель или эксципиент в дозировках и концентрациях, в которых их используют, не оказывают нежелательных или вредных эффектов на субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты хорошо известны в данной области техники (см. статьи Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th изд., A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990), Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000) и пособие Handbook of Pharmaceutical Excipients,

3rd edition, A. Kibbe, ред., Pharmaceutical Press (2000)). Очищенные нуклеиновую кислоту, белок и/или вектор предпочтительно включают в состав и вводят в виде стерильного раствора, хотя также можно использовать лиофилизированные препараты. Стерильные растворы получают с использованием стерильной фильтрации или других способов, известных в данной области техники. Затем растворы лиофилизируют или расфасовывают в контейнеры для фармацевтических доз. Величина pH раствора обычно находится в диапазоне от 3,0 до 9,5, предпочтительно в диапазоне от 5,0 до 7,5. Нуклеиновая кислота, белок и/или вектор обычно содержатся в растворе, содержащем фармацевтически приемлемое буферное вещество, а раствор обычно содержит соль. Не обязательно может присутствовать стабилизирующий агент, такой как альбумин. В некоторых вариантах добавляют ПАВ. В некоторых вариантах нуклеиновую кислоту, белок и/или вектор можно включать в состав и получать препарат для инъекции. Такие составы содержат эффективные количества нуклеиновой кислоты, белка и/или вектора и включены либо в состав стерильных жидких растворов, жидких суспензий или лиофилизированных препаратов и необязательно содержат стабилизаторы или эксципиенты.

Например, аденовирус можно хранить в буферном растворе, который также используют для получения мирового стандарта аденовирусов (Hoganson и др., Hoganson и др., Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing March, p. 43-48 (2002)): 20 мМ трис, pH 8, 25 мМ NaCl, 2,5% глицерин. Другой пригодный буферный состав, пригодный для введения людям, представляет собой 20 мМ трис, 2 мМ MgCl2, 25 мМ NaCl, 10 мас.% сахарозы, полисорбат-80 0,02 мас.%. Представляется очевидным, что можно использовать многие другие буферные растворы, и несколько типичных составов для хранения и фармацевтического введения очищенных (адено)вирусных препаратов можно найти, например, в Европейском патенте № 0853660, патенте США № 6225289 и в международных патентных заявках WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763, WO 03/078592, WO 03/061708.

В некоторых вариантах композиция аденовируса представляет собой стерильную суспензию для внутримышечной инъекции, содержащую следующие неактивные компоненты:

- моногидрат лимонной кислоты
- дигидрат тринатрий цитрата

- этанол
- 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин (HBCD)
- полисорбат 80
- хлорид натрия
- гидроксид натрия
- вода для инъекций

и необязательно соляная кислота,

и где продукт не содержит консервантов.

В предпочтительном варианте исходный срок хранения вакцины на основе вектора аденовируса составляет 24 месяца при хранении в условиях от -25°C до -15°C (от -13°F до 5°F), и в течение указанных 24 месяцев, 3 месяцев при хранении от 2°C до 8°C (от 36°F до 46°F). В определенных вариантах композиция по изобретению включает (адено)вектор по изобретению в комбинации с дополнительным активным компонентом. Такие дополнительные активные компоненты могут включать один или более антигенов белка SARS-CoV-2, например, белок SARS-CoV-2 по изобретению или любой другой антиген на основе белка SARS-CoV-2 или дополнительные векторы, включающие нуклеиновую кислоту, кодирующую аналогичные или другие антигены SARS-CoV-2. И опять такие векторы могут представлять собой не-аденовирусный или аденовирусный материал, причем последний может представлять собой аденовирус любого серотипа.

В определенных вариантах композиция, включающая аденовирус, дополнительно включает один или более адъювантов. В данной области техники известно, что адъюванты повышают иммунный ответ на введенную антигенную детерминанту, и фармацевтические композиции, включающие аденовирус и пригодные адъюванты, например, описаны в заявке WO 2007/110409, которая включена в данное описание в качестве ссылки. Термины «адъювант» и «иммуностимулятор» используются взаимозаменяемо и означают одно или более веществ, которые вызывают стимуляцию иммунной системы. В данном контексте для усиления иммунного ответа на аденовирусные векторы по изобретению используют адъювант. Типичные пригодные адъюванты включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции масло-эмульсия (или композиции масло-в-воде), включая эмульсии сквален-вода, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы сапонина,

такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, US 5057540, WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620), бктериальные или микробные производные, примеры которых включают монофосфориллипид A (MPL), 3-O-деацетилированный MPL (3dMPL), содержащие CpG-мотив олигонуклеотиды, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутанты, такие как термолабильный энтеротоксин E. coli LT, холерный токсин CT и т.п. Можно также использовать - кодируемый вектором адъювант, например, при использовании гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние домена олигомеризации C4-связывающего белка (C4bp) с исследуемым антигеном (например, Solabomi и др, Infect Immun 76: 3817-23 (2008)). В некоторых вариантах композиции по изобретению включают алюминий в качестве адъюванта, например, в форме гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинаций в концентрации 0,05 – 5 мг, например, от 0,075 до 1,0 мг алюминия в дозе.

В других вариантах композиции не включают адъюванты.

В настоящем изобретении также предлагаются вакцины против COVID-19, включающие нуклеиновую кислоту, белок и/или вектор по изобретению. Термин «вакцина» означает агент или композицию, содержащие активный компонент, эффективный для индукции терапевтической степени иммунитета у субъекта против определенного патогена или заболевания. Согласно настоящему изобретению вакцина может содержать эффективное количество рекомбинантного аденовируса серотипа 26, который кодирует S белок SARS CoV-2, прежде всего белок SARS CoV-2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, или его антигенный фрагмент, который вызывает иммунный ответ, предпочтительно защитный иммунный ответ, против S белка SARS CoV-2. Вакцину по изобретению можно использовать в способе предотвращения тяжелой формы заболевания нижних дыхательных путей, приводящего к госпитализации, и снижения частоты осложнений, таких как пневмония и бронхиолит, вследствие инфицирования и репликации SARS-CoV-2 у субъекта. Вакцину также можно использовать для так называемой вторичной (постконтактной) профилактики (PEP), то есть для профилактики заболевания после потенциального или документально подтвержденного контактирования с коронавирусом и/или для снижения риска вторичного распространения

инфекции. «Вакцина» по изобретению обычно включает фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент. Она может содержать или не содержать дополнительные активные ингредиенты.

В определенных вариантах вакцина может представлять собой комбинированную вакцину, которая дополнительно включает другие компоненты, которые индуцируют иммунный ответ, например, против других белков SARS CoV-2 и/или против других инфицирующих агентов.

В определенных вариантах вакцина может представлять собой комбинированную вакцину, которая включает вектор по изобретению и S белок SARS CoV-2 и необязательно адъювант, где вектор и белок SARS CoV-2 предназначены для одновременного введения. Белок SARS CoV-2 может являться белком, который описан в данном контексте, или любой другой пригодный S белок SARS CoV-2, известный в данной области техники. Согласно изобретению, вектор и белок предпочтительно предназначены для одновременного введения (то есть их вводят одновременно). «Одновременное введение или совместное введение», в контексте введения вектора и белка субъекту, означает применение вектора и белка в комбинации, где указанные вектор и белок вводят субъекту в течение 24 ч.

В определенных вариантах белок и вектор вводят в одном составе, например, с фармацевтически приемлемым буферным веществом, носителем, эксципиентом и/или адъювантом в составе единой композиции для введения, например, в составе смеси, и вводить их субъекту в одно и то же время. В других вариантах вектор и белок вводят в состав, например, с фармацевтически приемлемым буферным веществом, носителем, эксципиентом и/или адъювантом, в составе отдельных композиций и вводят субъекту в виде отдельных композиций в течение 24 ч, например, в течение в течение 12 ч, 10 ч, 8 ч, 6 ч, 4 ч, 2 ч или 1 ч или менее, например, одной и той же группе или двум группам субъектов приблизительно в одно и то же время.

В изобретении предлагаются способы активной иммунизации для предотвращения коронавирусной болезни 2019 (COVID-19), вызванной тяжелой формой острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2), у лиц возрастом 18 лет и старше.

В изобретении предлагаются способы активной иммунизации для предотвращения коронавирусной болезни 2019 (COVID-19), вызванной тяжелой

формой острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2), у лиц возрастом 16 лет или старше.

В изобретении предлагаются способы активной иммунизации для предотвращения коронавирусной болезни 2019 (COVID-19), вызванной тяжелым острым респираторным синдромом коронавирусом 2 (SARS-CoV-2), у лиц возрастом 12 лет или старше.

В изобретении предлагаются способы активной иммунизации для предотвращения коронавирусной болезни 2019 (COVID-19), вызванной тяжелой формой острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2), у лиц возрастом 2 месяца или старше.

В изобретении предлагаются способы активной иммунизации для предотвращения коронавирусной болезни 2019 (COVID-19), вызванной тяжелой формой вариантов острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2).

Варианты SARS-CoV-2 предпочтительно выбирают из группы, состоящей из следующих вариантов: UK вариант (SARS-CoV-2 lin. B.1.1.7), South Africa (SARS-CoV-2 501Y.V2) и Denmark вариант (Cluster 5).

Варианты SARS-CoV-2 могут включать один или более мутантов, выбранных из группы, состоящей из вариантов del69-70, del145, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, L242H, R246I, K417N, E484K, N501Y, Y435F, I1692V, M1229I и A701V.

Варианты SARS CoV-2 могут включать мутацию E484K и одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из мутаций del69-70, del145, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, D80A, D215G, L242H, R246I, K417N, E484K, N501Y, Y435F, I1692V, M1229I и A701V. Примеры включают, например, варианты SARS CoV-2 B.1.351, B.1.1.7, P.1 и CAL20C.

В изобретении также предлагается способ индукции SARS CoV-2 связывающих антител у субъекта, нуждающегося в таком лечении, измеренных, например, методом ИФА, включающий введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте.

В изобретении также предлагается способ индукции SARS CoV-2 нейтрализующих антител у субъекта, нуждающегося в таком лечении, измеренных, например, методом VNA, включающий введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте.

В изобретении также предлагается способ индукции SARS CoV-2 специфичного Т клеточного ответа у субъекта, нуждающегося в таком лечении, по данным оценки, например, методом проточной цитометрии после пептидной стимуляции мононулеарных клеток периферической крови (PBMC) S белком SARS CoV-2 с использованием внутриклеточного проявления, при этом указанный способ включает введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте.

В изобретении предлагается также способ снижения инфекции и/или репликации SARS-CoV-2 или его вариантов, например, в носовых каналах и легких субъекта, включающий введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте. При таком введении снижаются побочные эффекты, возникающие в результате заражения субъекта вирусом SARS-CoV-2, и, таким образом, что способствует защите субъекта от таких побочных эффектов. В некоторых вариантах побочные эффекты инфекции вируса SARS-COV-2 можно в значительной степени предотвратить, то есть снизить до таких низких уровней, что они не будут иметь клинического значения. Рекомбинантный аденовирус может существовать в форме вакцины по изобретению, включая варианты осуществления, описанные выше. Введение других активных компонентов можно, например, осуществлять при отдельном введении или введении комбинированных продуктов вакцины по изобретению.

В изобретении предлагается также способ профилактики молекулярно подтвержденного COVID-19 от умеренной до тяжелой/критической формы, включающий введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте, при введении в виде одной или двух доз вакцины. В определенном варианте в изобретении предлагается способ профилактики молекулярно подтвержденного COVID-19 от умеренной до тяжелой/критической формы по сравнению с плацебо у взрослых, серонегативных в отношении SARS-CoV-2, включающий введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте, в виде одной или двух доз вакцины.

В изобретении предлагается также способ профилактики молекулярно подтвержденного COVID-19 тяжелой/критической формы, включающий введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте, при введении в виде одной или двух доз вакцины. В определенном варианте в изобретении предлагается способ профилактики молекулярно подтвержденного

COVID-19 тяжелой/критической формы по сравнению с плацебо у взрослых, серонегативных в отношении SARS-CoV-2, включающий введение субъекту композиции или вакцины, как описано в данном контексте, при в виде одной или двух доз вакцины.

Согласно изобретению, умеренная степень COVID-19 определена как SARS-CoV-2 положительный результат анализа ОТ-ПЦР или результат молекулярного теста с использованием любого имеющегося в наличии образца из дыхательных путей или другого образца, молекулярно подтвержденного в центральной лаборатории, И

в любое время в течение периода наблюдения до исчезновения признаков и симптомов:

любой 1 из следующих новых или ухудшающихся признаков или симптомов:

частота дыхания ≥20 вдохов/мин; аномальное насыщение кислородом (SpO2), но все еще >93% в комнатном воздухе на уровне моря, кинические или рентгенологические признаки пневмонии, рентгенологические признаки DVT,

одышка или затрудненное дыхание, ИЛИ

любые 2 из следующих новых или ухудшающихся признаков или симптомов:

лихорадка (≥38,0°C или ≥100,4°F), частота сердечных сокращений (ЧСС ≥90 уд/мин, озноб или мышечная ригидность,

новые или изменяющиеся обонятельные или вкусовые расстройства, больное горло, недомогание, головная боль, кашель,

мышечная боль (миалгия), симптомы в желудочно-кишечном тракте, покраснение или ушибы ноги или пальцев ног.

Согласно изобретению, тяжелая/критическая форма COVID-19 определена как SARS-CoV-2 положительный результат анализа ОТ-ПЦР или результат молекулярного теста или молекулярного теста с использованием любого имеющегося в наличии образца из дыхательных путей или другого образца, молекулярно подтвержденного в центральной лаборатории, И

клинические признаки в покое, свидетельствующие о тяжелом системном заболевании (частота дыхания ≥30 вдохов/мин, частота сердечных сокращений ≥125 ударов/мин, SpO2 ≤93% в комнатном воздухе на уровне моря или PaO2/FiO2 <300 мм рт.ст.),

дыхательная недостаточность (определяется как потребность в высокопоточной оксигенации, неинвазивной вентиляции, механической вентиляции или ЭКМО (экстракорпоральной мембранной оксигенации)),

признаки шока (определяемые как систолическое артериальное давление <90 мм рт.ст., диастолическое артериальное давление <60 мм рт.ст. или требующие сосудосуживающих факторов),

значительная острая почечная, печеночная или неврологическая дисфункция,

госпитализация в отделение интенсивной терапии,

летальный исход.

В некоторых вариантах тяжелая форма COVID-19 определяется руководством FDA.

Согласно изобретению, легкая форма COVID-19 определена как SARS-CoV-2 положительный результат анализа ОТ-ПЦР или результат молекулярного теста или молекулярного теста с использованием любого имеющегося в наличии образца из дыхательных путей или другого образца, молекулярно подтвержденного в центральной лаборатории, И

один из следующих симптомов:

лихорадка (≥38,0°C или ≥100,4°F), больное горло, головная боль, мышечная боль (миалгия), симптомы в желудочно-кишечном тракте, кашель, чувство стеснения в груди, насморк, хрипы, кожная сыпь, раздражение или выделения из глаз, озноб, новые или изменяющиеся обонятельные или вкусовые расстройства, покраснение или ушибы ноги или пальцев ног, озноб или мышечная ригидность, недомогание (потеря аппетита, общее недомогание, быстрая утомляемость, физическая слабость).

Случай считается легким, если он соответствует приведенному выше определению случая, но не соответствует определению от умеренного до тяжелого/критического случая.

Бессимптомная или недетектированная инфекция SARS CoV-2 определяется следующим образом:

участник испытаний не соответствует критериям подозрения на COVID-19 на основании признаков и симптомов, А ТАКЖЕ

наблюдается положительный результат ОТ-ПЦР или молекулярного теста на SARS-CoV-2 для любого доступного образца из дыхательных путей

(например, образец мазка из носа, образец мокроты, образец мазка из горла, образец слюны) или другой образец,

ИЛИ

наблюдается положительный серологический тест (не S белок) (серологическая конверсия).

В изобретении предлагается также способ снижения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 по данным анализа с использованием количественной полимеразной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) у участников с молекулярно подтвержденной формой от умеренного до тяжелого/критического заболевания COVID-19.

В изобретении также предлагается способ предотвращения или снижения развития пневмонии, связанной с любым подтвержденным на молекулярном уровне COVID-19, по сравнению с плацебо.

В изобретении также предлагается способ уменьшения симптомов, вызванных инфекцией SARS CoV-2.

В изобретении также предлагается способ предотвращения или снижения частоты госпитализаций, связанных с любым молекулярно подтвержденным COVID-19. по сравнению с плацебо.

В изобретении также предлагается способ предотвращения или уменьшения развития острого респираторного дистресс-синдрома, связанного с любым молекулярно подтвержденным COVID-19, по сравнению с плацебо.

В изобретении также предлагается способ предотвращения или уменьшения развития сепсиса, связанного с любым молекулярно подтвержденным COVID-19, по сравнению с плацебо.

В изобретении также предлагается способ предотвращения или уменьшения развития септического шока, связанного с любым молекулярно подтвержденным COVID-19, по сравнению с плацебо.

В изобретении также предлагается способ предотвращения или уменьшения смертности, связанной с любым молекулярно подтвержденным COVID-19.

В предпочтительном варианте способы включают введение композиции или вакцины в единой дозе 0,5 мл, включающей 5×10^{10} вч, в составе вакцины по изобретению.

В некоторых вариантах действие вакцины (то есть индукция SARS CoV-2 связывающих и/или нейтрализующих антител и/или индукция SARS CoV-2

специфичного Т клеточного ответа) происходит уже через 8 дней после введения вакцины.

В некоторых вариантах действие вакцины происходит по меньшей мере через 14 дней после введения 1-ой дозы исследуемой вакцины в зависимости от схемы испытаний. В некоторых вариантах действие вакцины происходит по меньшей мере через 28 дней после введения 1-ой дозы в зависимости от схемы испытаний. В предпочтительных вариантах в изобретении предлагается способ предотвращения молекулярно подтвержденного COVID-19 от умеренной до тяжелой формы заболевания.

Композиции или вакцины по изобретению предпочтительно могут характеризоваться эффективностью вакцины на уровне по меньшей мере 50, 55, 60, 65 или 70% против молекулярно подтвержденного COVID-19 от умеренной до тяжелой формы заболевания.

Предпочтительно композиции или вакцины по изобретению характеризуются эффективностью вакцины на уровне по меньшей мере 60, предпочтительно по меньшей мере 65% против молекулярно подтвержденного COVID-19 от умеренной до тяжелой формы заболевания с началом действия по меньшей мере через 14 дней после вакцинации.

Согласно изобретению композиции или вакцины проявляют эффективность против COVID-10, вызванного SARS-CoV-2, а также, по крайней мере, против некоторых циркулирующих вариантов SARS-CoV-2, которые связаны с быстро растущим числом случаев заболевания и характеризуются значительной распространенностью в Великобритании (B1.1.7/501Y.V1), Южной Африке 212 (501Y.V2) и Бразилии (B1.1.28/501.V3).

Согласно изобретению, было установлено, что одна доза вакцины проявляет эффективность при предотвращении от умеренной до тяжелой/критической формы COVID-19, при этом эффективность вакцины (VE) составляет 66% как через 14 дней, так и через 28 дней после вакцинации.

Эффективность вакцины против умеренной/тяжелой формы заболевания через 28 дней составляет 71% в США, 66% в Бразилии и 57% в Южной Африке, при этом большинство штаммов (90%) составлял вариант 501Y.V2 (южноафриканский вариант), Высокая эффективность вакцины (в общей сложности 85%) была отмечена против тяжелого/критического течения COVID-19 с эффективностью более 90% в возрасте 18-59 лет. Этот вывод соответствовал

результатам во всех странах и регионах (Северная и Южная Америка, Южная Африка), включая Южную Африку, где почти все случаи были вызваны новым вариантом SARS-CoV-2.

Начало проявления эффективности оценивали в день 14, при этом эффективность увеличивалась в день 56, прежде всего в отношении тяжелой формы заболевания, что согласуется с обнаружением титров нейтрализующих антител, обнаруживаемых в день 14 и далее, которые продолжали увеличиваться до дня 56 без признаков снижения до дня 85.

Композиции или вакцины по изобретению можно вводить субъекту, например, человеку. Общая доза аденовируса, обеспечиваемая субъекту при одном введении, обычно составляет от 1×10^{7} вирусных частиц (вч) до 1×10^{12} вч, предпочтительно от 1×10^{8} до 1×10^{11} вч, например, от 3×10^{8} до 5×10^{10} вч, например, от 10^{9} до 3×10^{10} вч.

В предпочтительном варианте вакцину по изобретению вводят человеку в дозе $1{,}25\times10^{10}$, $2{,}5\times10^{10}$, 5×10^{10} или 1×10^{11} вч при однократной или двухкратной схеме введения, где дозы вводят приблизительно через 1, 2 или 3 месяца.

В определенных вариантах вакцину по изобретению вводят субъекту-человеку в дозе 1×10^{11} вч в ходе схемы однократного введения, а затем в ходе второй вакцинации вводят ту же самую дозу через 6, 12 или 24 месяца.

В предпочтительном варианте вакцину по изобретению вводят субъекту-человеку в дозе 5×10^{10} вч в ходе схемы при однократном введении.

В другом предпочтительном варианте вакцину по изобретению вводят субъекту-человеку в дозе 1×10^{11} вч в ходе схемы с однократным введением.

В другом предпочтительном варианте вакцину вводят субъекту-человеку в ходе двухкратной схемы, включающей первое введение в дозе 5×10^{10} вч и второе введение в дозе 5×10^{10} вч приблизительно через 2 месяца (8 недель или 56 дней).

В определенных вариантах вакцину вводят субъекту-человеку в ходе двухкратной схемы в дозе 5×10^{10} вч, при этом лозу вводят через 2 месяца (8 недель), а затем в ходе дополнительной вакцинации с использованием той же самой дозы через 8 месяцев, 14 месяцев и 26 месяцев (то есть через 6 месяцев, 12 месяцев или 24 месяца после завершения схемы с двухкратным введением).

В предпочтительном варианте композицию вводят в дозе 5×10^{10} вч в ходе однократной схемы.

Введение аденовирусных композиций можно осуществлять с использованием стандартных методов введения. Неограничивающие варианты включают парентеральное введение, такое как инъекция, например, внутримышечная, внутрикожная и т.д., или подкожное, чрескожное введение или введение через слизистую оболочку, например, интраназальное, пероральное и т.п. Однако согласно настоящему изобретению прежде всего предпочтительно вводить вакцину внутримышечно. Преимущество внутримышечного введения заключается в том, что оно простое и хорошо зарекомендовавшее себя, и не связано с проблемами безопасности при интраназальном введении у детей младше 6 месяцев. В одном варианте композицию вводят внутримышечной инъекцией, например, в дельтовидную мышцу руки или латеральную широкую мышцу бедра.

Субъектом, использованным в данном контексте, предпочтительно является млекопитающее, например, грызуны, например, мышь, хлопковый хомяк или не-человекообразный примат или человек. Предпочтительно субъектом является человек. Возраст субъекта может быть любым, например, от 1 месяца до 100 лет, например, от приблизительно 2 месяцев до приблизительно 80 лет, от приблизительно 6 месяцев до приблизительно 3 лет, от приблизительно 3 лет до приблизительно 18 лет, от приблизительно 12 лет до приблизительно 18 лет, от приблизительно 18 лет до приблизительно 56 лет, от приблизительно 50 лет до приблизительно 75 лет и т.д. В определенных предпочтительных вариантах субъектом является человек возрастом от 2 лет. В других предпочтительных вариантах возраст субъекта-человека составляет от 18 лет, предпочтительно человек возрастом от 60 лет, или человек возрастом от 65 лет.

В определенных вариантах композицию или вакцину вводят субъекту более одного раза, например, раз в год. В некоторых вариантах способ вакцинации состоит из однократного введения субъекту композиции или вакцины. Можно также проводить одно или более вторых (или бустерных вакцинаций) введений вакцины по изобретению. Если проводят вторую вакцинацию, как правило, такую вторую вакцинацию проводят тому же субъекту в момент времени от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев, после введения композиции субъекту в первый раз (что в таких случаях иногда называют «прайминг-вакцинацией»).

В изобретении также предлагаются изолированные клетки-хозяина, включающие рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагмент.

Клеткой-хозяина (иногда также называемой в данной области техники и в настоящем документе «пакующей клеткой», или «комплементирующей клеткой», или «клеткой-продуцентом»), которую можно использовать, может являться любая клетка-хозяина, в которой может размножаться требуемый аденовирус. Линию клеток-хозяина обычно используют для получения достаточного количества аденовирусных векторов по изобретению. Клетка-хозяина представляет собой клетку, которая включает такие гены, которые подвергали делеции или инактивации в дефектном по репликации векторе, что таким образом обеспечивает репликацию вируса в клетках. Пригодные клеточные линии включают, например, линии PER.C6, 911, 293, and E1 A549.

В определенных вариантах клетка-хозяина дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-репрессор тетрациклина (TetR). Нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TetR, можно, например, встроить в геном клетки-хозяина. В качестве примера, нуклеотидную последовательность, кодирующую белок TetR, можно встроить в хромосому 1. Линия клетки-хозяина может, например, представлять собой клетку PER.C6.

В предпочтительном варианте клетка-хозяина представляет собой клетку PER.C6, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-репрессор тетрациклина (TetR). Такие клетки «PER.C6 TetR» представляют собой клетки PER.C6 (клетки сетчатки человека, иммортализованные с использованием E1), в которые был встроен нуклеотид, кодирующий TetR, как описано в заявке PCT/EP2018/053201 (включенной в настоящие описание в качестве ссылки). В таких вариантах аденовирус предпочтительно включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагмент, который оперативно соединен с промотером, включающем один или более мотивов оператора Tet (TetO). В предпочтительных вариантах промотером является промотер CMV, включающий один или более мотивов TetO. Предпочтительно промотер представляет собой промотер CMV, включающий два мотива TetO. Предпочтительно промотер представляет собой промотер CMV и включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 219. В некоторых

вариантах промотер состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 219.

Кроме того, в изобретении предлагаются способы получения вакцины против коронавируса SARS (SARS-COV-2), включающие получение рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26, включающего нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-COV-2 или его фрагмент, как описано в данном контексте, размножение указанного рекомбинантного аденовируса в культуре клеток-хозяина, выделение и очистку рекомбинантного аденовируса и включение рекомбинантного аденовируса в фармацевтически приемлемую композицию. В некоторых вариантах изобретения предлагаются способы продуцирования аденовирусной частицы, включающей антиген SARS-COV-2. Способы включают а) контактирование клетки-хозяина по изобретению с вектором аденовируса по изобретению и б) рост клетки-хозяина в условиях, в которых продуцируется частица аденовируса, включающая антиген SARS-COV-2. Рекомбинантный аденовирус можно получать и размножать в клетках-хозяина с использованием хорошо известных методов, которые позволяют получать культуру клеток-хозяина, инфицированных аденовирусом. Клеточной культурой может являться любой тип клеточной культуры, включая культуру прикрепленных клеток, например клеток, прикрепленных к поверхности сосуда для культивирования или к микроносителям, а также суспензионную культуру.

Большинство суспензионных полупромышленных культур получают с использованием периодических процессов или процессов с подпиткой, так как они являются наиболее простыми в эксплуатации и при масштабировании. В настоящее время непрерывные процессы, основанные на принципах перфузии, становятся все более распространенными и также являются пригодными (см., например, заявки WO 2010/060719 и WO 2011/098592, обе включенные в настоящее описание в качестве ссылок, и в которых описаны пригодные способы получения и очистки больших количеств рекомбинантных аденовирусов).

В изобретении, кроме того, предлагается выделенная рекомбинантная нуклеиновая кислота, которая формирует геном рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV2 или его фрагмент.

Полипептиды коронавируса Юхань (2019-nCoV) можно использовать для индукции защитного и терапевтического ответа (например, гуморального ответа

или клеточного ответа) против инфекции коронавируса (например, 2019-nCoV) при введении субъекту (например, субъекту человеку), инфицированному или подвергавшихся воздействию коронавирусом (например, 2019-nCoV). Композиции, которые можно получить для введения субъекту, включают белок 2019-nCoV (например, шиповидный белок Spike (S) или его часть (например, полипептид с любой последовательностью SEQ ID NO: 1-84, например , SEQ ID NO: 51, или полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 90%, 95%, 99% или более) идентична полипептиду с любой последовательностью SEQ ID NO: 1- 84)), или вектор (например, вектор экспрессии, такой как плазмида, или вирусный вектор, такой как аденовирус (например, Ad26), поксвирус, адено-ассоциированный вирус, ретровирусный или другой вирусный вектор, или «голая» или инкапсулированная ДНК), содержащий нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок 2019-nCoV (например, молекула нуклеиновой кислоты с любой последовательностью из SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204; или молекула нуклеиновой кислоты, которая идентична по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 90%, 95%, 99% или более) последовательности молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью SEQ ID NOs: 93-181, 190-195 и 199-204).

Описано получение ДНК вакцин, экспрессирующих щиповидный S белок 2019-nCoV Spike. ДНК вакцины 2019-nCoV можно получить при включении полинуклеотида (например, SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204 или их варианта с идентичностью последовательности вплоть до 85% или более) кодирующего S белок или его часть (например, SEQ ID NO: 1-84, например, SEQ ID NO: 51, или их варианты с идентичностью последовательностей вплоть до 85% или более) в экспрессионный вектор млекопитающих (например, pcDNA3.1+; Invitrogen, CA, США).

Описано также получение рекомбинантных вирусных векторов (например, вирусные векторы Ad26), экспрессирующие щитовидный S белок 2019-nCoV. Вирусные векторы 2019-nCoV можно получить при включении полинуклеотида (например, SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204 или их вариантов с идентичностью последовательности с указанным белком вплоть до 85% или более), кодирующего S белок или его часть (например, SEQ ID NO: 1-84, или его часть с идентичностью последовательности с указанным белком вплоть до 85%

или более, например, SEQ ID NO: 51) в вирусный вектор (например, вирусный вектор Ad26).

Антитела против коронавируса (например, антитела против 2019-nCoV, например, антитела против шиповидного белка, например, нейтрализующие антитела против шиповидного белка), присутствующие в образце субъекта (например, субъекта-человека), можно использовать для обнаружения и/или контроля защитного ответа антител. Антитела к коронавирусу (например, антитела к шиповидному белку, например, нейтрализующие антитела к шиповидному белку) можно измерить в течение короткого промежутка времени (например, в период со дня 1 после введения до 8 недель после введения) или в течение более длительного периода времени (например, в период от 2 месяцев после введения до 15 дет после введения) после введения терапевтической композиции (например, любой из композиций или иммуногенных композиций, описанных в данном контексте).

В данном контексте описаны молекулы нуклеиновой кислоты, полипептиды, векторы, вакцины, композиции, антитела и способы лечения и предотвращения инфекции 2019-nCoV.

1. Композиции и способы

Молекулы нуклеиновой кислоты

Молекулы нуклеиновой кислоты (например, SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204 или ее вариант с идентичностью последовательности с указанной нуклеиновой кислотой вплоть до 85% или более) конструировали на основе юханьского коронавируса (2019-nCoV). Молекулы нуклеиновой кислоты кодируют области шиповидного S белка 2019-nCoV, например, полноразмерную последовательность (SEQ ID NO: 121), шиповидный белок с делецией цитоплазматического фрагмента (SEQ ID NO: 94), эктодомен (SEQ ID NO: 95), S1 (SEQ ID NO: 96), и рецептор-связывающий домен (SEQ ID NO: 97). В изобретении также предлагаются дополнительные модификации указанных выше фрагментов S, включая делецию или включение сигнальных последовательностей (например, SEQ ID NO: 189), стабилизирующие мутации (например, замены пролина в соответствующих положениях аминокислот K969 и V970 в составе последовательности SEQ ID NO: 1), мутации участка расщепления фурином (например, SEQ ID NO: 188), включение домена тримеризации (например, домен тримеризации фолдона, например, SEQ ID NO:

184), включение линкерной или спейсерной последовательностей (например, SEQ ID NO: 185 и 186), и их комбинаций. Молекулы нуклеиновой кислоты оптимизированы в отношении нуклеотидной последовательности шиповидного белка 2019-nCoV дикого типа для улучшенной экспрессии в клетках хозяина (например, клетках хозяина млекопитающих (например, человека)). Оптимизация может включать добавление лидерной последовательности, участка рестрикции и/или последовательности Козака.

Нуклеотидная последовательность молекул нуклеиновой кислоты характеризуется идентичностью последовательностей по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) со всей последовательностью или частью любой последовательности SEQ ID NOs: 93-181, 190-195 и 199-204, или их комплементарным последовательностям. Например, молекула нуклеиновой кислоты может включать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 195. В другом варианте изолированная молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид 2019-nCoV с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) в отношении аминокислотной последовательности любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84. Например, изолированная молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность полипептида, кодирующую полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56.

Молекулы нуклеиновой кислоты можно дополнительно оптимизировать, например, с использованием оптимизации кодонов, для экспрессии у субъекта-мишени млекопитающего (например, человек или не-человекообразное животное для продуцирования вакцины).

Молекулы нуклеиновой кислоты можно также включать в векторы экспрессии, такие как плазмида, или вирусный вектор, такой как аденовирус, поксвирус, адено-ассоциированный вирус, ретровирус или другой вирусный вектор, или получать их в виде «голой» или инкапсулированной ДНК и включать их в композиции.

Полипептиды

Полипептиды представляют собой полипептиды коронавируса (например, полипептиды 2019-nCoV), соответствующие, например, областям шиповидного S белка 2019-nCoV (SEQ ID NO: 1-84), например, полноразмерному белку (SEQ ID NO: 29), шиповидному белку с делецией цитоплазматического фрагмента (SEQ ID NO: 2), эктодомену (SEQ ID NO: 3), S1 (SEQ ID NO: 4), связывающему рецептор домену (SEQ ID NO: 5) и вариантам с идентичностью последовательности в отношении указанного белка по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), всей последовательности или ее части SEQ ID NO: 1-84. Полипептиды могут включать по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 или 1800 или более непрерывных или прерывистых любых из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-84. Полипептиды могут также включать делецию или включение сигнальной последовательности (например, SEQ ID NO: 92), стабилизирующие мутации (например, замещения пролина в соответствующих положениях аминокислот K969 и V970 в последовательности SEQ ID NO: 1), мутации участка расщепления фурином (например, SEQ ID NO: 91), включение домена тримеризации (например, домен тримеризации фолдона, например, SEQ ID NO: 87), включение линкерной или спейсерной последовательности (например, SEQ ID NO: 88 и 89), и их комбинации. Например, полипептид может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. Полипептиды можно также выделить из других компонентов (например, компоненты, с которыми в природных условиях ассоциированы полипептиды) или можно включить в состав композиций.

Векторы

В изобретении предлагаются также рекомбинантные векторы (например, вирусный вектор Ad26), включающий любой один или более полинуклеотидов, описанных выше. Векторы можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, экспрессирующей иммуноген (например, одну или более последовательностей SEQ ID NO: 1-84 или их вариантов, характеризующихся идентичностью последовательности с указанным иммуногеном по меньшей мере на 85-99%, например, с идентичностью последовательности по меньшей мере

более 90%), эти векторы включают векторы экспрессии млекопитающих, вирусов или бактерий. Например, вектор можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 104 или 204), экспрессирующую иммуноген с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51. Например, вектор можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 195), экспрессирующую иммуноген с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56. Векторы млекопитающих, вирусов и бактерий можно генетически модифицировать с целью включения в них одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, представленных в последовательностях SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204 или их вариантах, характеризующихся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере на 85-99%, например, по меньшей мере идентичностью последовательности на более 90%, и их комплементарных последовательностей.

Векторы могут представлять собой, например, плазмиды, искусственные хромосомы (например, BAG, PAC, YAC), и вирусные или фаговые векторы, и могут необязательно включать промотер, энхансер или регулятор экспрессии полинуклеотида. Векторы могут также содержать один или более селектируемых маркерных генов, например, ген устойчивости к ампициллину, неомицину и/или канамицину в случае бактериальной плазмиды или ген устойчивости к грибковому вектору. Векторы можно использовать *in vitro*, например, для получения ДНК или РНК или для трансфекции или трансформации клетки-хозяина, например, клетки-хозяина млекопитающего, например, для продуцирования белка, кодируемого вектором. Векторы также можно адаптировать для использования *in vivo*, например, в способе вакцинации ДНК, вакцинации РНК или генной терапии.

Промотеры и другие сигналы регуляции экспрессии можно выбрать таким образом, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяина, для которой сконструирована экспрессия. Например, промотеры млекопитающих включают промотер металлотионеина, который можно индуцировать в ответ на тяжелые металлы, такие как кадмий, и промотер β-актина. Можно также использовать вирусный промотер, который можно получить из генома вируса, такого как, например, вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (A), вирус папилломы

крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус (CMV), ретровирус, вирус гепатита B, обезьяний вирус 40 (SV40) и вирус папилломы человека (HPV). Эти промотеры хорошо известны и их можно найти в данной области техники.

Предпочтительный элемент промотера представляет собой промотер гена немедленного ответа CMV. В некоторых вариантах экспрессионная плазмида представляет собой pcDNA3.1+ (Invitrogen, CA, США). В некоторых вариантах экспрессионным вектором является вирусный вектор, такой как вектор, полученный из аденовируса или поксвируса.

Вирусные геномы обеспечивают богатый источник векторов, которые можно использовать для эффективной доставки экзогенных генов в геном клетки (например, эукариотической или прокариотической клетки). Вирусные геномы являются прежде всего пригодными векторами для доставки генов, поскольку полинуклеотиды, содержащиеся в таких геномах, обычно встраиваются в геном клетки-мишени посредством генерализованной или специализированной трансдукции. Эти процессы происходят как часть естественного цикла репликации вируса и не требуют добавления белков или реагентов для индукции интеграции генов. Типичные вирусные векторы можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, экспрессирующей иммуноген (например, одна из множества последовательностей SEQ ID NO: 1-84 или их вариантов, характеризующихся идентичностью последовательностей с указанными нуклеиновыми кислотами по меньшей мере на 85-99%, например, по меньшей мере с идентичностью последовательностей по меньшей мере на 90%), и они включают ретровирус, аденовирус (например, Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52 (напримеbр, RhAd52), Ad59 (например, RhAd59), и Pan9 (также известный под названием AdC68)), парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирус, вирусы, содержащие отрицательно-цепочечную РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и вирус везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и вирус Сендай), вирусы, содержащие положительно-цепочечную РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включающие аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типа 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вирус осповакцины,

модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), вирус оспы кур и оспы канареек). Другие вирусы, пригодные для доставки полинуклеотидов, кодирующих иммуногены (например, полипептиды), включают, например, норовирус, тогавирус, коронавирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Типичные ретровирусы включают: вирус лейкоза-саркомы птиц, вирусы млекопитающих C-типа, B-типа, вирусы D-типа, группу HTLV-BLV, лентивирус, спумавирус (см. Coffin J.M., Retroviridae: Theviruss and its replication, Fundamental Virology, 3-е издание, B. N. Fields, и др., ред., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996)). Например, вектор может представлять собой Ad26. Эти аденовирусные векторы можно получить, например, из аденовирусов человека, шимпанзе или макак резус. Другие примеры включают вирусы мышиного лейкоза, вирусы саркомы мышей, вирус опухоли молочной железы мыши, вирус лейкоза крупного рогатого скота, вирус лейкоза кошек, вирус саркомы кошек, вирус лейкемии птиц, вирус Т-клеточного лейкоза человека, эндогенный вирус бабуина, вирус лейкоза обезьяны Гиббона, вирус обезьяны Мэйсона-Пфайзера, вирус иммунодефицита обезьян, вирус саркомы обезьян, вирус саркомы Рауса и лентивирусы. Другие примеры векторов описаны, например, в патенте McVey и др. (патент США № 5801030), который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки. Материал нуклеиновой кислоты (например, включающий молекулу нуклеиновой кислоты) в составе вирусного вектора можно инкапсулировать, например, в липидную мембрану или в оболочку структурных белков (например, капсидные белки), которые могут включать один или более вирусных полипептидов (например, гликопротеин). Вирусный вектор можно использовать для инфицирования клеток субъекта, что, в свою очередь, способствует трансляции гетерологичного гена(ов) вирусного вектора в иммуногены. Например, вирусный вектор можно генетически модифицировать таким образом, чтобы он содержал одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, представленных в последовательностях SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204, или их вариантах, характеризующихся идентичностью последовательности по меньшей мере на 85-99%, например, по меньшей мере более чем на 90%, и комплементарные последовательности.

Аденовирусные векторы, описанные в международных заявках WO2006/040330 и WO2007/104792, каждая из которых включена в настоящее

описание в качестве ссылок, прежде всего можно использовать в какечестве векторов.

Эти аденовирусные векторы могут кодировать и/или доставлять один или более иммуногенов (например, полипептиды 2019-nCoV) для лечения субъекта, страдающего от патологического состояния, ассоциированного с вирусной инфекцией (например, инфекция 2019-nCoV). В некоторых вариантах один или более рекомбинантных векторов аденовируса можно вводить субъекту, чтобы экспрессировать один или более типов иммуногена (например, полипептид 2019-nCoV). В некоторых вариантах вектор рекомбинантного аденовируса можно модифицировать для изменения доменов гексона HVR (например, заменить один или более HVR доменами различного серотипа). Кроме аденовирусных векторов в данной области техники известны другие вирусные векторы и способы, которые можно использовать для ускорения доставки и/или экспрессии одного или более иммуногенов субъекту (например, человеку). Эти вирусы включают поксвирусы (например, вирус осповакцины и модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), см., например, патенты США №№ 4603112 и 5762938, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки), вирусы герпеса, тогавирусы (например, вирус венесуэльского лошадиного энцефалита; см., например, патент № 5643576, включенный в настоящее описание в качестве ссылки), пикорнавирусы (например, полиовирус; см., например, патент США № 5639649, включенный в настоящее описание в качестве ссылки), бакуловирусы и другие вирусы, описанные в статье Wattanapitayakul and Bauer (Biomed. Pharmacother. 54:487). (2000), включенной в настоящее описание в качестве ссылки).

Технологии переноса генов с использованием этих вирусов известны в данной области техники. Ретровирусные векторы, например, можно использовать для стабильной интеграции полинуклеотида в геном-хозяина, хотя такая рекомбинация не является предпочтительной. Дефектные по репликации аденовирусные векторы, напротив, остаются эписомальными и, следовательно, допускают временную экспрессию.

Векторы, способные вызывать экспрессию в клетках насекомых (например, бакуловирусные векторы), в клетках человека, дрожжах или бактериях, можно использовать для количественного получения белка 2019-nCoV, кодируемого

полинуклеотидами по настоящему изобретению, например, для использования в качестве субъединичных вакцин или в иммунологических анализах.

Антитела

Антитела anti-2019-nCoV способны специфически связываться с полипептидом 2019-nCoV и способны ингибировать 2019-nCoV-опосредованную активность (например, вирусное распределение, инфекция вируса и/или слияние клеток) у субъекта (например, человека). Результат такого связывания может, например, заключаться в снижении титра вируса (например, вирусной нагрузки) приблизительно на 1% (например, на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%) или более, после введения антитела субъекту, инфицированному вирусом 2019-nCoV. Антитела anti-2019-nCoV могут селективно связываться с эпитопом, включающим всю или часть области Env полипептида 2019-nCoV. Прежде всего антитела anti-2019-nCoV могут селективно связываться с эпитопом, включающим всю или часть любой последовательности SEQ ID NO: 1-84. Например, антитела могут связываться с эпитопом, включающим всю или часть последовательности SEQ ID NO: 28. Следовательно антитела можно использовать для предотвращения или лечения инфекции 2019-nCoV.

Специфическое связывание антитела или фрагмента антитела к полипептиду 2019-nCoV можно определять любым из ряда известных способов. Аффинность может количественно представлена различными параметрами, включающими концентрацию антител, необходимую для достижения полу-максимального ингибирования распространения вируса (например, титр вируса) *in vitro* (IC_{50}), и константу диссоциации (K_D) комплекса anti-2019-nCoV-полипептид. Константа K_D, которая описывает взаимодействие полипептида 2019-nCoV с антителом, представляет собой константу химического равновесия реакции диссоциации комплекса anti-2019-nCoV-полипептид с образованием разделенных в растворителе молекул полипептида 2019-nCoV и антитела, которые не взаимодействуют друг с другом.

Антитела являются антителами, которые специфично связываются с полипептидом 2019-nCoV (например, с областью Env вируса 2019-nCoV), при этом величина K_D составляет менее 1 мкМ (например, 900 нМ, 800 нМ, 700 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 95 нМ, 90 нМ, 85 нМ, 80 нМ, 75 нМ, 70 нМ, 65 нМ, 60 нМ, 55 нМ, 50 нМ, 45 нМ, 40 нМ, 35нМ, 30 нМ, 25 нМ,

20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ). В определенных случаях антитела являются антителами, которые специфично связываются с полипептидом 2019-nCoV, при этом величина K_D составляет менее 1 нМ (например., 990 пМ, 980 пМ, 970 пМ, 960 пМ, 950 пМ, 940 пМ, 930 пМ, 920 пМ, 910 пМ, 900 пМ, 890 пМ, 880 пМ, 870 пМ, 860 пМ, 850 пМ, 840 пМ, 830 пМ, 820 пМ, 810 пМ, 800 пМ, 790 пМ, 780 пМ, 770 пМ, 760 пМ, 750 пМ, 740 пМ, 730 пМ, 720 пМ, 710 пМ, 700 пМ, 690 пМ, 680 пМ, 670 пМ, 660 пМ, 650 пМ, 640 пМ, 630 пМ, 620 пМ, 610 пМ, 600 пМ, 590 пМ, 580 пМ, 570 пМ, 560 пМ, 550 пМ, 540 пМ, 530 пМ, 520 пМ, 510 пМ, 500 пМ, 490 пМ, 480 пМ, 470 пМ, 460 пМ, 450 пМ, 440 пМ, 430 пМ, 420 пМ, 410 пМ, 400 пМ, 390 пМ, 380 пМ, 370 пМ, 360 пМ, 350 пМ, 340 пМ, 330 пМ, 320 пМ, 310 пМ, 300 пМ, 290 пМ, 280 пМ, 270 пМ, 260 пМ, 250 пМ, 240 пМ, 230 пМ, 220 пМ, 210 пМ, 200 пМ, 190 пМ, 180 пМ, 170 пМ, 160 пМ, 150 пМ, 140 пМ, 130 пМ, 120 пМ, 110 пМ, 100 пМ, 90 пМ, 80 пМ, 70 пМ, 60 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 20 пМ, 10 пМ, 5 пМ или 1 пМ).

Антитела можно также характеризовать рядом методов анализа связывания *in vitro*. Примеры экспериментов, которые можно использовать для определения K_D или IC_{50} антител 2019-nCoV, включают, например, среди прочих, следующие методы анализа: поверхностный плазмонный резонанс, калориметрия изотермического титрования, анизотропия флуоресценции и анализы на основе ИФА. ИФА представляет собой особенно пригодный метод анализа активности антител, поскольку такие анализы обычно требуют минимальных концентраций антител. Обычным сигналом, который регистрируют в ходе типичного анализа ИФА, является люминесценция, которая обычно является результатом активности пероксидазы, конъюгированной со вторичным антителом, которое специфически связывается с первичным антителом (например, антитело 2019-nCoV). Антитела способны связываться с вирусом 2019-nCoV и/или его эпитопами, такими как эпитопы, содержащие один или несколько остатков любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84, а также изолированные пептиды, полученные из 2019-nCoV, в которых различные остатки в структурном отношении предварительно организованы таким образом, что они могут имитировать конформацию этих аминокислот в нативном белке. Например, антитела могут связываться с пептидами, содержащими любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1-84, или с пептидом, содержащим от приблизительно 10 до приблизительно 30 смежных или

прерывистых аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84. В ходе прямого эксперимента ИФА такое связывание можно количественно определять, например, при анализе люминесценции, которая наблюдается после инкубации субстрата HRP (например, сульфонат 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолина) с комплексом антиген-антитело, связанного с HRP-конъюгированным вторичным антителом.

Антитела включают антитела, которые образуются при иммунизации хозяина (например, млекопитающее-хозяин, такое как человек) полипептидами с последовательностью SEQ ID NO: 1-84. Антитела можно получить рекомбинантным методом и при необходимости гуманизировать их для последующего введения человеку-реципиенту, если хозяин, в котором образуются антитела anti-2019-nCoV, не относится к человеку.

Композиции

Композиции включают векторы ДНК или РНК, содержащие молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный или терапевтический генный продукт или его фрагменты. Полученные из вируса 2019-nCoV (например, всю молекулу нуклеиновой кислоты или ее часть с любой последовательностью SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204, или их варианты с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) в отношении любой из последовательностей SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204, и комплементарных последовательностей). Например, композиция может содержать вектор ДНК, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 143 или SEQ ID NO: 204. Например, композиция может содержать вектор ДНК, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 195. Дополнительные композиции включают иммуногенный полипептид или его фрагмент, полученный из полипептида 2019-nCoV (например, весь полипептид или часть полипептида SEQ ID NO: 1-84, или их вариант с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) в отношении последовательностей SEQ ID NOs: 1-84). Например, композиция может включать иммуногенный полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51. Например, композиция может включать иммуногенный полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28. Композиции могут также

включать антитело 2019-nCoV (например, антитело против шиповидного белка), способное связываться с вирусом 2019-nCoV или его белковыми эпитопами, такими как эпитопы, содержащие один или более остатков любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84. Например, композиция может включать антитело, способное связываться с эпитопами, содержащими один или более остатков SEQ ID NO: 28. Антитело можно генерировать при иммунизации хозяина полипептидом любой последовательности SEQ ID NO: 1-84. Например, антитело можно генерировать при иммунизации хозяина полипептидом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

Необязательно композиции можно включать в состав, например, для введения через вирусный вектор (например, аденовирусный вектор или поксвирусный вектор). Рекомбинантные аденовирусы обладают рядом значительных преимуществ для применения в качестве векторов для экспрессии, например, одного или более иммуногенов (например, полипептиды 2019-nCoV). Вирусы можно получать с высоким титром, инфицировать не-реплицирующиеся клетки, и они могут способствовать высокоэффективной трансдукции клеток-мишеней *ex vivo* после контактирования с популяцией клеток-мишеней. Более того, аденовирусы не могут интегрировать их ДНК в геном хозяина. Таким образом, их использование в качестве экспрессионных векторов снижает риск индукции спонтанных пролиферативных расстройств. В моделях на животных в основном было установлено, что аденовирусные векторы опосредуют высокий уровень экспрессии в течение примерно одной недели. Продолжительность трансгенной экспрессии (экспрессия молекулы нуклеиновой кислоты) можно увеличить за счет использования клеточных или тканеспецифических промотеров. Другие улучшения в ходе молекулярной инженерии аденовирусного вектора самого по себе привели к более устойчивой экспрессии трансгена и меньшему воспалению. Такие преимущества подтверждаются для так называемых векторов «второго поколения», несущих специфические мутации в дополнительных ранних аденовирусных генах, и «безкишечных» векторов, в которых практически все вирусные гены удалены с использованием стратегии Cre-Lox (см. статьи Engelhardt и др., Proc. Natl. Acad.Sci.USA 91:6196 (1994) и Kochanek и др., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:5731 (1996), каждая из которых включена сюда в качестве ссылки).

Терапевтические составы композиций получают для введения субъекту (например, человеку) с использованием стандартных методов, известных в данной области техники, при смешивании активного ингредиента требуемой степени чистоты с необязательными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (см. справочник (Remington's Pharmaceutical Sciences (20^e изд), ред. A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000)). Терапевтические составы композиций получают стандартными методами, известными в данной области техники, при смешивании активного ингредиента требуемой степени чистоты с необязательными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (см. справочник (Remington's Pharmaceutical Sciences (20^e изд), ред. A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000)). Приемлемые носители включают солевой раствор или буферные вещества, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты, антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту, низкомолекулярные полипептиды (приблизительно менее 10 остатков), белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глютамин, аспарагин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как ЭДТУ, сахароспирты, такие как маннит или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, и/или неионные ПАВ, такие как твин, плуроники или ПЭГ.

Необязательно, но предпочтительно, состав содержит фармацевтически приемлемую соль, предпочтительно хлорид натрия, и предпочтительно в приблизительно в физиологических концентрациях. Необязательно составы могут содержать фармацевтически приемлемый консерватор. Концентрация консерванта может находиться в интервале от приблизительно 0,1 до приблизительно 2,0%, обычно об.%. Пригодные консерванты включают известные в фармацевтике вещества, такие как бензиловый спирт, фенол, мета-крезол, метилпарабен и пропилпарабен. Необязательно составы могут включать фармацевтически приемлемое ПАВ в концентрации от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,02%.

Необязательно композиции можно включать в состав для совместного введения или последовательного введения в смеси с адъювантом и/или

иммуностимулирующим агентом (например, с белком), таким как рецепторные молекулы, нуклеиновые кислоты, иммуногенные белки, фармацевтические агенты, химиотерапевтические агенты и вспомогательные цитокины. Например, в состав композиций можно включать интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-5 (IL-5), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-11 (IL-11), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-13 (IL-13), липид A, фосфолипаза A2, эндотоксины, стафилококковый энтеротоксин B, интерферон I типа, интерферон II типа, трансформирующий фактор роста-β (TGF-β), фактор ингибирования миграции лимфотоксинов, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (CSF), моноцитарно-макрофагальный CSF, гранулоцитарный CSF, фактор роста сосудистого эпителия (VEGF), ангиогенин, трансформирующий фактор роста (TGF-α), белки теплового шока (HSP), углеводные фрагменты групп крови, резус-факторы Rh, факторы роста фибробластов, нуклеотиды, ДНК, РНК, иРНК, MART, MAGE, BAGE, мутантный p53, тирозиназа, AZT, ангиостатин, эндостатин или их комбинации.

Фармацевтические композиции можно вводить в терапевтически эффективном количестве, которое обеспечивает иммуногенный и/или защитный эффект против инфекционного агента (например, 2019-nCoV). В некоторых вариантах композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор и/или антитела, можно включать в состав для введения в дозе по меньшей мере 1-1000 мкг (например, по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 или 300 мкг или более). Доза может находиться в объеме от 0,2 мл до 1,0 мл или вплоть до 1 л (если приготовлена в виде состава для вливания). В некоторых вариантах композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, вектор и/или вакцину, вводят в дозе 50 мкг.

Композиции, используемые в описанных в данном контексте способах, можно включать в состав, например, для введения следующими методами: внутримышечным, внутривенным, внутрикожным, чрескожным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутриочаговым, внутричерепным, внутрисуставным, внутрипростатическим, внутриплевральным, внутритрахеальным, интраназальным, интравитреальным, интравагинальным, интраректальным, местным, внутриопухолевым, перитонеальным, подкожным,

субконъюнктивальным, внутривезикулярным, через слизистую, внутриперикардиальным, внутрипупочным, внутриглазным, пероральным, местным, локальным, с использованием ингаляции, инъекции, вливания, непрерывного вливания, локализованного вливания, промывки клетки-мишени напрямую, с помощью катетера, лаважа, желудочного зонда, в составе кремов или липидных композиций.

Фармацевтические композиции по изобретению, описанные в данном контексте, можно включать в состав для высвобождения композиции немедленно после введения (например, доставка в мишень) или в течение предварительно определенного периода после введения с использованием составов с контролируемым или пролонгированным высвобождением. Введение фармацевтической композиции с использованием составов с контролируемым или пролонгированным высвобождением является пригодным, если композиция в отдельности или в комбинации характеризуется (i) узким терапевтическим индексом (например, различие между концентрацией в плазме, приводящей к неблагоприятным побочным эффектам или токсичным реакциям, и концентрацией в плазме, приводящей к терапевтическому эффекту, слишком мало, и в основном терапевтический индекс, TI, определяют как соотношение средней летальной дозы (LD_{50}) и средней эффективной дозой (ED_{50})); (ii) узкой поверхностью всасывания в участке высвобождения (например, в желудочно-кишечном тракте), или (iii) коротким периодом биологического полувыведения, например, когда требуется частое введение дозы в течение дня, чтобы поддерживать терапевтический уровень.

Можно использовать множество стратегий для получения контролируемого или пролонгированного высвобождения, при которых скорость высвобождения превышает скорость процессов метаболизма фармацевтической композиции. Например, контролируемое высвобождение можно обеспечить за счет соответствующего выбора параметров состава и ингредиентов, включая, например, соответствующие композиции и покрытия с контролируемым высвобождением. Пригодные составы известны специалистам в данной области. Примеры включают композиции таблеток или капсул, состоящих из одного или более компонентов, масляные растворы, суспензии, эмульсии, микрокапсулы, микросферы, наночастицы, пластыри и липосомы.

Композиции можно стерилизовать обычными методами стерилизации или их можно подвергать стерилизующей фильтрации. Полученные водные растворы можно расфасовывать для применения напрямую или лиофилизировать, при этом лиофилизированный препарат можно вводить в виде порошка или смешивать его со стерильным водным носителем перед введением. Значение pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8 и наиболее предпочтительно от 7 до 8, например от 7 до 7,5. Полученные композиции в твердой форме можно расфасовывать во множество контейнеров с одноразовой дозой, каждый из которых содержит фиксированное количество иммуногенной композиции (например, вакцины или антитела против 2019-nCoV) и, при необходимости, один или более иммуномодулирующих агентов, например, в запечатанную упаковку таблеток или капсул, или в пригодный порошковый ингалятор (DPI), через который можно вводить одну или более доз.

Способы лечения с использованием композиций

Фармацевтические композиции (например, иммуногенные композиции и антитела anti-2019-nCoV) можно использовать для лечения субъекта (например, человека), который подвергается риску воздействия (например, из-за поездки в регион, где преобладает коронавирусная инфекция (например, 2019-nCoV), коронавируса (например, 2019-nCoV), для лечения субъекта, восприимчивого к коронавирусной (например, 2019-nCoV) инфекции, или для лечения субъекта, страдающего от коронавирусной (например, 2019-nCoV) инфекции. Прежде всего, композиции можно использовать для лечения (до или после воздействия) инфекции 2019-nCoV. В некоторых вариантах лечение может индуцировать защитный уровень антител против коронавируса (например, антител anti-2019-nCoV, например, антител против шиповидного белка, например, нейтрализующих антител против шиповидного белка). В некоторых вариантах защитным уровнем является титр, который составляет по меньшей мере приблизительно 70, и измеренный методом анализа нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте, титр, который составляет по меньшей мере приблизительно 25, и измеренный методом анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, описанного в данном контексте, или титр находится выше уровня по меньшей мере приблизительно на 80% от медианного или среднего уровня в когорте выздоравливающих людей по данным

анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте. В некоторых вариантах лечение композицией может снизить 2019-nCoV-опосредованную активность у субъекта, такую как титр вируса, распространение вируса, инфекция и/или слияние клеток. В некоторых вариантах 2019-nCoV-опосредованная активность представляет собой вирусную нагрузку в дыхательных путях (например, в верхних дыхательных путях и/или нижних дыхательных путях). В некоторых вариантах 2019-nCoV-опосредованная активность представляет собой вирусную нагрузку в легких, ноздрях и/или трахее. В некоторых вариантах вирусная нагрузка 2019-nCoV снижается приблизительно на 1% или более (например, на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9%, 99,99%, или более). В некоторых вариантах, титр 2019-nCoV у проходящего курс лечения субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, снижается приблизительно на 1% или более (например, на 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%, 95%, 99%, 99,9%, 99,99% или более) после введения субъекту композиции (например, вакцины).

Композиции (например, любую композицию, описанную в данном контексте) можно использовать для индукции иммунного ответа (например, гуморального и/или клеточного иммунного ответа) у субъекта (например, у субъекта-человека). Индуцированный иммунный ответ может быть различным (например, отличаться по специфичности, стабильности или продолжительности действия) в зависимости от вводимой композиции или комбинации композиций. Например, композиция может индуцировать ответ с различными типами антител (например, в различном соотношении IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 или FcgR2A.1) или с различными функциональными характеристиками (например, способностью индуцировать антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов). (ADNP), антителозависимое отложение комплемента (ADCD), антителозависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP) или антителозависимая активация NK-клеток (секреция IFN-γ, дегрануляция CD107a и экспрессия MIP-1β)). Композиции, описанные в данном контексте (например, SS-Spike и SS-SdCT), могут индуцировать ответ ADCD, который можно контролировать (например, для оценки терапевтической эффективности). Композиции могут также индуцировать клеточные ответы с различными

характеристиками (например, ответы Th1, Th2 или Th17). Композиции, описанные в данном контексте (например, SS-RBD-фолдон и SS-S.Ecto-dF-PP-фолдон) могут индуцировать антителозависимую активацию NK-клеток, которую можно контролировать (например, для оценки терапевтической эффективности). Композиции, описанные в данном контексте (например, SS-Spike, SS-SdCT и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon), могут индуцировать S-специфический ответ CD4+ или CD8+ Т клеток, который можно контролировать (например, для оценки терапевтической эффективности).

Векторы (например, экспрессионные векторы млекопитающих, бактерий или вирусов (например, Ad26)) можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, экспрессирующей иммуноген (например, одну или более SEQ ID NO: 1-84 или их вариантов, с идентичностью последовательности в отношении указанного иммуногена по меньшей мере на 85-99%, например, с идентичностью последовательности в отношении указанного иммуногена по меньшей мере более чем 90%) субъекту при использовании в способе профилактики и/или лечения инфекции 2019-nCoV. Например, вектор можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 104 или 204), экспрессирующей иммуноген с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51. Например, вектор можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 195), экспрессирующей иммуноген с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56. Векторы (например, экспрессионные векторы млекопитающих, бактерий или вирусов) можно генетически модифицировать с целью включения одной или более последовательностей нуклеиновой кислоты, представленных в последовательностях SEQ ID NO: 93-181, 190-195, and 199-204 или ее вариантах, с идентичностью последовательности в отношении указанного иммуногена по меньшей мере на 85-99%, например, по меньшей мере с идентичностью последовательности в отношении указанного иммуногена более чем на 90%, и в ее комплементарных последовательностях. Прежде всего аденовирусные векторы (например, векторы, полученные из Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52 (RhAd52), Ad59 (RhAd59) и Pan9 (известный также как AdC68)), описаны в заявках WO 2006/040330 и WO 2007/104792, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве

ссылок, являются прежде всего пригодными в качестве векторов в способах доставки иммуногена субъекту. Например, вектор представляет собой Ad26. Другие примеры векторов описаны, например, McVey и др., (см. патент U.S. No. 5801030), включенный в полном объеме в настоящее описание в качестве ссылки.

Пригодные способы генной терапии для доставки иммуногенов субъекту, нуждающемуся в таком лечении, включают способы, описанные в заявке PCT WO 2006/060641, патенте U.S. 7179903 и заявке PCT WO 2001/036620, в которых описано применение, например, аденовирусного вектора (например, векторов, полученных из Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50, Ad52 (RhAd52), Ad59 (RhAd59) и Pan9 (известный также как AdC68)), для терапевтической доставки белка.

Одну или более любых композиций (например, фармацевтических композиций (например, иммуногенных композиций и антител anti-2019-nCoV)), описанных в данном контексте, можно использовать при лечении.

Лечение может включать один или более дополнительных терапевтических средств (например, провоспалительных средств (например, интерферонов) или противовоспалительных средств (например, кортикостероидов, например, дексаметазона)), и/или одно или несколько терапевтических вмешательств (например, хирургическое вмешательство и в положении лежа на животе). Терапевтические средства и/или вмешательства можно использовать последовательно (например, введение одной или нескольких любых композиций, описанных в данном контексте, до заболевания или на ранней стадии заболевания (например, в течение недели после проявления симптомов), затем введение дополнительного терапевтического средства (например, противовоспалительное средство (например, кортикостероид, например, дексаметазон) на более поздней стадии заболевания (например, через неделю после проявления симптомов)) или одновременно (например, введение одной или более из любых из описанных в данном контексте композиций и/или одного или более дополнительных терапевтических средств). Дополнительные терапевтические средства могут включать кортикостероиды (например, глюкокортикоиды (например, дексаметазон, преднизолон и гидрокортизон)), интерфероны (например, интерферон бета), дезоксихолевую кислоту, колониестимулирующие факторы (например, G-CSF и GM-CSF) и не-стероидные

противовоспалительные препараты (например, аспирин, производные пропионовой кислоты, такие как ибупрофен, фенопрофен, кетопрофен, флурбипрофен, оксапрозин и напроксен, производные уксусной кислоты, такие как сулиндак, индометацин, этодолак, диклофенак, производные эноловой кислоты, такие как пироксикам, мелоксикам, теноксикам, дроксикам, лорноксикам и изоксикам, производные фенамовой кислоты, такие как мефенамовая кислота, меклофенамовая кислота, флуфенамовая кислота, толфенамовая кислота, и ингибиторы COX-2, такие как целекоксиб, эторикоксиб, лумиракоксиб, парекоксиб, рофекоксиб, рофекоксиб и вальдекоксиб). Другие агенты, которые можно вводить в комбинации с композициями, описанными в данном контексте, включают ремдесивир, хлорохин, гидроксихлорохин, барицитиниб, лопинавир/ритонавир, умифеновир, фавипиравир, тоцилизумаб и рибавирин.

Введение

Фармацевтические композиции можно вводить субъекту (например, человеку) до или после воздействия инфекционного агента (например, коронавируса, такого как 2019-nCoV) для лечения, предотвращения, облегчения, ингибирования прогрессирования или для снижения тяжести одного или более симптомов инфекции (например, коронавирусной инфекции, такой как инфекция 2019-nCoV). Например, композиции можно вводить субъекту, инфицированному вирусом 2019-nCoV. Примеры симптомов заболеваний, вызванных вирусной инфекцией, такой как 2019-nCoV, которые можно лечить с помощью композиций, включают, например, лихорадку, пневмонию, дыхательную недостаточность, потерю массы тела, боль в суставах, сыпь, конъюнктивит, мышечную боль, головную боль, ретроорбитальную боль, отек, лимфаденопатию, недомогание, астению, боль в горле, кашель, тошноту, рвоту, диарею и гематоспермию. Эти симптомы и их разрешение во время лечения могут быть оценены, например, врачом во время медицинского осмотра или с помощью других тестов и методов, известных в данной области техники. Фармацевтическую композицию, описанную в данном контексте, можно вводить субъекту (например, человеку) до или после воздействия инфекционного агента (например, коронавируса, такого как 2019-nCoV) для снижения или предотвращения риска смертности, вызванного агентом.

Предпочтительный способ введения можно изменять в зависимости от различных факторов (например, вводимых компонентов композиции и тяжести состояния, подлежащего лечению). Сосотавы, пригодные для перорального или назального введения, могут состоять из жидких растворов, таких как эффективное количество композиции, растворенной в разбавителе (например, воде, физиологическом растворе или ПЭГ-400), капсул, саше, таблеток или гелей, при этом каждая из этих форм содержит предварительно определенное количество композиции гибридного вектора Ad5. Фармацевтическая композиция может также представлять собой аэрозольный состав для ингаляции, например, в бронхиальные пути. Аэрозольные составы можно смешивать с фармацевтически приемлемым газом-вытеснителем под давлением (например, дихлордифторметаном, пропаном или азотом). Прежде всего, введение с использованием ингаляции можно осуществить, используя, например, аэрозоль, содержащий триолеат сорбита или олеиновую кислоту, например, в смеси с трихлорфторметаном, дихлорфторметаном, дихлортетрафторэтаном или с любым другим биологически совместимым газом-вытеснителем.

Иммуногенность композиции можно значительно улучшить, если ее вводят совместно с иммуностимулирующим средством и/или адъювантом. Пригодные адъюванты, хорошо известные специалистам в данной области, включают, например, фосфат алюминия, гидроксид алюминия, QS21, Quil A (и их производные и компоненты), фосфат кальция, гидроксид кальция, гидроксид цинка, аналоги гликолипидов, октодециловые эфиры аминокислот, мурамилдипептиды, полифосфазен, липопротеины, матрикс ISCOM, DC-Chol, DDA, цитокины и другие адъюванты и их производные.

Композиции можно вводить для обеспечения доконтактной профилактики или после того, как у субъекта была диагностирована вирусная инфекция (например, инфекция 2019-nCoV), или субъект подвергся воздействию инфекционного агента, такого как вирус (например, коронавирусная инфекция). например, 2019-nCoV). Композицию можно вводить, например, за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 мин, 2 , 4, 6, 10, 15 или 24 ч, 2, 3, 5 или 7 дней, 2, 4, 6 или 8 недель или даже 3, 4 или 6 месяцев до контактирования с вирусом 2019-nCoV, или можно вводить субъекту через 15-30 мин или через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 20, 24, 48 или 72 ч, 2, 3, 5, или 7 дней, 2, 4, 6 или 8

недель, 3, 4, 6 или 9 месяцев, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 лет или после воздействия коронавируса (например, 2019-nCoV).

При лечении вирусной инфекции (например, инфекции 2019-nCoV) композиции можно вводить субъекту либо до проявления симптомов или окончательного диагноза, либо после постановки диагноза или распознавания симптомов. Например, композицию можно вводить, например, сразу после постановки диагноза или клинического распознавания симптомов или через 2, 4, 6, 10, 15 или 24 ч, 2, 3, 5 или 7 дней после постановки диагноза или проявления симптомов.

Одну или более доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доз) иммуногенной композиции или композиции, содержащей антитело против 2019-nCoV, можно вводить субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах субъекту вводят по меньшей мере одну дозу. В некоторых вариантах субъекту вводят по меньшей мере две дозы. В некоторых вариантах дозы вводят в один и тот же день. В некоторых вариантах дозы вводят в разные дни. В некоторых вариантах иммуногенную композицию вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении, по схеме прайминг-вакцинации, повторного введения или по схеме прайминг-бустерного введения. В некоторых вариантах бустерную дозу вводят через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 месяца, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 лет после введения прайминг-дозы по схеме прайминг-бустерной вакцинации. В других вариантах вводят множество бустерных доз, когда каждую бустерную дозу вводят через период, который составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, или 28 дней, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 месяцев, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 лет.

Одну или более любой композиции, описанной в данном контексте, (например, иммуногенные композиции, описанные в данном контексте) можно вводить в сочетании с одним или более терапевтических средств последовательно или одновременно.

Дозировки

Дозу композиций или количество курсов лечения с использованием композиций можно повысить или снизить с учетом тяжести, развития или прогрессирования заболевания у субъекта (например, в зависимости от тяжести одного или нескольких симптомов, например, вирусной инфекции). Фармацевтические композиции можно вводить в терапевтически эффективном количестве, которое обеспечивает иммуногенный и/или защитный эффект против инфекционного агента (например, 2019-nCoV). В некоторых вариантах композицию, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор и/или антитела, можно вводить в дозе по меньшей мере от 1 мкг до 100 мг (например, по меньшей мере 10 мкг, 20 мкг, 30 мкг, 40 мкг, 50 мкг, 60 мкг, 70 мкг, 80 мкг, 90 мкг, 100 мкг, 125 мкг, 150 мкг, 175 мкг, 200 мкг, 225 мкг, 250 мкг, 275 мкг, 300 мкг, 325 мкг, 350 мкг, 375 мкг, 400 мкг, 425 мкг, 450 мкг, 475 мкг, 500 мкг, 525 мкг, 550 мкг, 575 мкг, 600 мкг, 625 мкг, 650 мкг, 675 мкг, 700 мкг, 725 мкг, 750 мкг, 775 мкг, 800 мкг, 825 мкг, 850 мкг, 875 мкг, 900 мкг, 925 мкг, 950 мкг, 975 мкг, 1 мг, 2 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг, 16 мг, 17 мг, 18 мг, 19 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг или более). В некоторых вариантах композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, вектор и/или антитело, вводят в дозе приблизительно 50 мкг (например, в дозе от приблизительно 25 мкг до приблизительно 75 мкг). В некоторых вариантах композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты, вектор и/или антитело, вводят в дозе приблизительно 5 мг (например, в дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг). В некоторых примерах введение эффективного количества композиции (например, иммуногена, такого как SEQ ID NO: 1-84) индуцирует защитный уровень (например, титр более по меньшей мере 70, измеренный с использованием анализа нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте, титр по меньшей мере 25, измеренный с использованием анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, описанного в данном контексте, или выше уровня по меньшей мере приблизительно на 80% медианного или среднего уровня когорты выздоравливающих людей, как определено с использованием анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте) анти-коронавирусных антител (например, анти-2019-nCoV, например, антител против

шиповидного белка, например, нейтрализующих антител против шиповидного белка). В некоторых случаях защитный уровень составляет титр по меньшей мере приблизительно 70 (например, по меньшей мере приблизительно 80, по меньшей мере приблизительно 100 или по меньшей мере приблизительно 120), измеренный с использованием анализа нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте. В некоторых примерах защитный уровень составляет титр по меньшей мере приблизительно 100, измеренный с использованием анализа нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте. В некоторых примерах введение эффективного количества композиции обеспечивает защитный уровень антител против коронавируса (например, антитела anti-2019-nCoV, например, антитела против шиповидного белка, например, нейтрализующие антитела против шиповидного белка), который поддерживается в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 лет или более.

В некоторых примерах введение эффективного количества композиции (например, иммуногена, такого как последовательности SEQ ID NO: 1-84) снижает вирусную нагрузку 2019-nCoV в сыворотке, определенную у субъекта с инфекцией вируса 2019-nCoV, по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с вирусными нагрузками, определенными у пациента до введения эффективного количества композиции. В некоторых примерах введение эффективного количества композиции снижает вирусную нагрузку в сыворотке до не-детектируемого уровня по сравнению с вирусной нагрузкой, определенной у пациента до введения эффективного количества композиции. В некоторых примерах введение эффективного количества композиции приводит к снижению и/или снижению до не-детектируемого уровня, который можно поддерживать в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней, 1, 2, 3, 4 недель; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или 1 года или более.

Вводимая дозировка зависит от субъекта, который нуждается в курсе лечения (например, возраст, масса тела, возможности иммунной системы и общее состояние здоровья субъекта), формы введения (например, в виде твердого вещества или жидкости), способа введения (например, с использованием инъекции, ингаляции или в виде сухого порошкообразного пропеллента) и клетки-мишени (например, эпителиальные клетки, такие как

эпителиальные клетки кровеносных сосудов, эпителиальные клетки носоглотки или эпителиальные клетки легких). Композицию предпочтительно вводят в количестве, которое обеспечивает достаточный уровень антигенного или терапевтического генного продукта или его фрагмента (например, уровень антигенного генного продукта, который вызывает иммунный ответ без нежелательных неблагоприятных физиологических эффектов у хозяина, вызванных продуктом антигенного гена).

Способ доставки, например ДНК- или РНК-вакцины, также может определять величину дозы. В некоторых случаях дозировка, вводимая с использованием инъекций внутривенным (в/в) или внутримышечным (в/м) способом, может потребовать различные количества ДНК- или РНК-вакцины, например, от 10 мкг до 1 мг. Однако для введения с помощью генной пушки может потребоваться доза ДНК- или РНК-вакцины от 0,2 мкг до 20 мкг (например, 0,2, 0,1, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мкг). В некоторых случаях при использовании генной пушки для доставки дозы ДНК- или РНК-вакцины может потребоваться количество ДНК или РНК только на уровне нг, например, от 10 нг до 200 нг (например, 10, 12, 13, 14, 15), 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175 или 200 нг).

В других вариантах, когда вектором доставки является вирус (например, вирус Ad26), субъекту можно вводить по меньшей мере $1x10^3$ вч /доза или от $1x10^1$ до $1x10^{20}$ вч (например, $1x10^1$, $1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$, $1x10^9$, $1x10^{10}$, $1x10^{11}$, $1x10^{12}$, $1x10^{13}$, $1x10^{14}$, $1x10^{15}$, $1x10^{16}$, $1x10^{17}$, $1x10^{18}$, $1x10^{19}$ или $1x10^{20}$ вч/доза). Например, субъекту можно вводить приблизительно от $1x10^6$ до приблизительно $1x10^{14}$ вч/доза (например, $1x10^7$, приблизительно $1x10^8$, приблизительно $1x10^9$, приблизительно $1x10^{10}$, приблизительно $1x10^{11}$, приблизительно $1x10^{12}$, приблизительно $1x10^{13}$, приблизительно $1x10^{14}$ или приблизительно $1x10^{15}$ вч/доза). Например, субъекту можно вводить приблизительно $1x10^{11}$, приблизительно $1x10^{12}$, приблизительно $1x10^{13}$, или приблизительно $1x10^{14}$ вч/доза.

Кроме того, субъекту можно проводить однократное или многократное введение композиций по настоящему изобретению (до или после воздействия и/или до или после постановки диагноза) (например, одно введение или введение два или более раз). Например, субъектам, с особенной

восприимчивостью, например, к вирусной инфекции (например, инфекции 2019-nCoV), может потребоваться несколько курсов лечения для создания и/или поддержания защиты от вируса. Уровни индуцированного иммунитета, обеспечиваемого описанными в данном контексте фармацевтическими композициями, можно контролировать, например, при измерении количества нейтрализующих секреторных и сывороточных антител. Затем дозы можно корректировать или повторять по мере необходимости, чтобы индуцировать требуемый уровень иммунного ответа. Например, иммунный ответ, вызванный однократным (прайминг-вакцинация) введением композиции, может оказаться недостаточно значительным и/или стабильным для обеспечения эффективной защиты. Соответственно, в некоторых вариантах повторное введение (бустерная иммунизация), такое как установленная прайминг-бустерная вакцинация, может значительно усилить гуморальный и клеточный ответы на антиген композиции.

В другом варианте, эффективность лечения можно определить в ходе мониторинга уровня антигенного или терапевтического генного продукта или его фрагмента, экспрессированного у субъекта (например, человека) после введения композиций. Например, кровь или лимфу субъекта можно исследовать на наличие антигенного или терапевтического генного продукта или его фрагмента с использованием, например, стандартных анализов, известных в данной области.

В некоторых случаях эффективность лечения можно определить в ходе мониторинга изменения вирусной нагрузки в сыворотке во взятых у субъекта образцах до и после введения эффективного количества композиции (например, иммуногена, такого как любая последовательность из SEQ ID NO: 1-84). Снижение вирусной нагрузки в сыворотке по меньшей мере приблизительно на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с вирусной нагрузкой, определенной у субъекта до введения эффективного количества композиции, может указывать на то, что у субъекта наблюдается благоприятный эффект от лечения. Если вирусная нагрузка не снижается по меньшей мере приблизительно на 10%, 20%, 30% или более после введения композиции, дозировку, предназначенную для введения композиции, можно повысить. Например, при повышении количества ДНК вакцины на уровне микрограмма или миллиграмма (например, при увеличении количества ДНК-вакцины (например, ДНК-вакцины, содержащей одну или более

последовательностей SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204), вводимой субъекту, или при увеличении количества вирусных частиц (вч) вакцины на основе аденовирусного вектора (например, вакцины на основе аденовирусного вектора, содержащей одну или более последовательностей SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204).

Однократная доза композиции может обеспечить защиту, доконтактную профилактику или предварительную диагностику. Кроме того, однократная доза, введенная после воздействия или после постановки диагноза, может оказывать лечебное действие согласно настоящему изобретению.

Однократную дозу композиции также можно использовать для обеспечения лечебного эффекта у субъектов, проходящих курс лечения от инфекции (например, коронавирусной инфекции, такой как инфекция 2019-nCoV). При необходимости этим субъектам также можно вводить многократные дозы (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более доз).

Способы постановки диагноза и предотвращения предрасположенности к инфекции коронавируса

Способы диагностики

В данном контексте предлагаются способы идентификации, диагностирования и/или предсказания предрасположенности у субъекта к инфекции коронавируса. Способ включает измерение уровня или количества антител против коронавируса (например, антител против шиповидного белка) в образце (например, в образце цельной крови, например, в образце сыворотки или плазмы) у субъекта. В некоторых вариантах коронавирусом является 2019-nCoV.

В некоторых вариантах антителом против коронавируса (например, антителом против шиповидного белка) является нейтрализующее антитело. В некоторых вариантах субъект определяется как предрасположенный к инфекции, если количетво или уровень антител против коронавируса (например, антител против шиповидного белка) составляет величину менее защитного уровня (например, ниже титра по меньшей мере приблизительно 70, измеренного с использованием анализа нейтрализации псевдовируса, как описано в данном контексте, ниже титра по меньшей мере приблизительно 25, измеренного с использованием анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте, или менее 80% от среднего уровня в когорте выздоравливающих людей (например, в группе людей, выздоровевших или

выздоравливающих от инфекции коронавируса (например, 2019-nCoV) по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса), и субъект определяется как не-предрасположенный к инфекции коронавируса, если уровень антител против коронавируса (например, антител против шиповидного белка) выше защитного уровня. В некоторых вариантах защитным уровнем является титр антител против коронавируса (например, титр нейтрализующих антител против шиповидного белка) составляет по меньшей мере приблизительно 70 (например, приблизительно 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350 или более) по данным анализа нейтрализации псевдовируса. В некоторых вариантах защитным уровнем является титр антител против коронавируса (например, титр нейтрализующих антител против шиповидного белка) составляет по меньшей мере приблизительно 83 по данным анализа нейтрализации псевдовируса. В некоторых вариантах защитным уровнем является титр антител против коронавируса (например, титр нейтрализующих антител против шиповидного белка) составляет по меньшей мере приблизительно 25 (например, приблизительно 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 175, 200 или более) по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса. В некоторых вариантах защитным уровнем является титр антител против коронавируса (например, титр нейтрализующих антител против шиповидного белка), составляющий по меньшей мере приблизительно 35 по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса. В некоторых вариантах защитным уровнем является титр антител против коронавируса (например, титр нейтрализующих антител против шиповидного белка), составляющий по меньшей мере приблизительно 60% (например, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, приблизительно 73%,

приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 100%, приблизительно 110%, приблизительно 120%) медианного или среднего уровня в когорте выздоравливающих людей по данным анализа нейтрализации псевдовируса или по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте. В некоторых вариантах защитным уровнем является титр антител против коронавируса (например, титр нейтрализующих антител против шиповидного белка), составляющий по меньшей мере приблизительно 80% медианного или среднего уровня в когорте выздоравливающих людей по данным анализа нейтрализации псевдовируса или по данным нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте. Субъекту можно назначать курс лечения, если у него установлена восприимчивость к коронавирусной инфекции (субъект с количеством или уровнем антитела против коронавируса (например, антитела против шиповидного белка) ниже защитного уровня (например, ниже титра по меньшей мере приблизительно 70 по данным анализа нейтрализации псевдовируса, как описано в данном контексте, ниже титра по меньшей мере приблизительно 25, по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, или менее 80% медианного уровня когорты выздоравливающих людей (например, группы людей, которые выздоровели или выздоравливают от коронавирусной инфекции (например, 2019-nCoV)) по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса)) (например, вводить любую из композиций, описанных в данном контексте), курс лечения, такой как введение эффективного количества одной или более фармацевтических композиции (например, иммуногенные композиции и антитела anti-2019-nCoV, как описано в данном контексте. Субъекту можно назначать повторный курс лечения, до тех пор, пока не будет определено, что субъект не восприимчив к коронавирусной инфекции

(например, пока у субъекта уровень антитела против коронавируса (например, антитела против шиповидного белка) не превысит защитный уровень (например, уровень выше титра по меньшей мере приблизительно 70, измеренный с использованием анализа нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте, выше титра по меньшей мере приблизительно 25, измеренный с помощью описанного по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, или находится на уровне, который составляет по меньшей мере 80% медианного уровня (и предпочтительно на уровне медианы или выше) антитела против коронавируса в когорте выздоравливающих людей (например, группы людей, которые выздоровели или выздоравливают от коронавирусной инфекции (например, 2019-nCoV)) по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса)). Способ может также включать определение RBD специфичности антител к против шиповидного белка. Способ может также включать определение S1-специфичности антител. Способ может также включать определение S2-специфичности антител против шиповидного белка. Способ также может включать идентификацию подкласса (например, IgM, IgA, IgG1, IgG2, IgG3 или FcgR2A.1) и/или эффекторной функции (например, антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антителозависимое отложение комплемента (ADCD), антителозависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP) или антителозависимая активация NK-клеток (секреция IFN-γ, дегрануляция CD107a и экспрессия MIP-1β). Способ может также дополнительно включать введение одной или более фармацевтических композиций (например, иммуногенных композиций и антител anti-2019-nCoV), как описано в данном контексте, субъекту, который определен как нуждающийся в дополнительном курсе лечения.

Способ может включать измерение вирусной нагрузки коронавируса (например, 2019-nCoV) в образце у субъекта. В некоторых вариантах образцом является бронхоальвеолярный лаваж (BAL) или мазок из носа (NS). В некоторых вариантах образец представляет собой жидкость из организма (например, кровь, например, цельная кровь или плазма) субъекта. В некоторых вариантах образцом является образец ткани (например, образец ткани дыхательных путей) субъекта. В некоторых вариантах вирусной нагрузкой является детектируемый уровень нуклеиновой кислоты (например субгеномная иРНК) или детектируемый уровень белка (например, уровень нуклеокапсидного белка (N)). В некоторых

вариантах детектируемый уровень нуклеиновой кислоты (например, субгеномной иРНК) определяют с использованием следующих методов анализа: РНК-секв., ОТ-кПЦР, кПЦР), мультиплексная кПЦР) или ОТ-кПЦР, LAMP, микроматричный анализ, или гибридизация (например, ISH (например, FISH)). В некоторых вариантах детектируемый белок (например, нуклеокапсидный белок (N)) определяют методом иммуногистохимического анализа (например, иммуногистохимический анализ (IHC) или иммунохроматографический анализ). В некоторых вариантах детектируемая вирусная нагрузка означает, что субъект является предрасположенным к заболеванию (например, 2019-nCoV-опосредованное заболевание, например, COVID-19, например, тяжелая форма заболевания COVID-19). В некоторых вариантах вирусная нагрузка выше по меньшей мере приблизительно 3,5 log_{10} sgmРНК копий/мл (например, приблизительно 3,75 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 3,8 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 3,9 log_{10} РНК копий/мл, приблизительно 4,0 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 4,25 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 4,5 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 4,75 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 5,0 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 5,5 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 6,0 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 6,5 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 7,0 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 7,5 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 8,0 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 8,5 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 9 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 10 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 11 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 12 log_{10} sgmРНК копий/мл, приблизительно 13 log_{10} sgmРНК копий/мл или более). В некоторых вариантах вирусная нагрузка выше 3,85 log_{10} sgmРНК копий/мл в образцах BAL или 3,78 log_{10} sgmРНК копий/мл в образцах NS, означает, что субъект является предрасположенным к заболеванию (например, 2019-nCoV-опосредованное заболевание, например, COVID-19, например тяжелая форма заболевания COVID-19). В некоторых вариантах, вирусная нагрузка более 3,85 log_{10} sgmРНК копий/мл в образцах BAL или 3,78 log_{10} sgmРНК копий/мл в образцах NS означает, что субъект является предрасположенным к тяжелой форме заболевания COVID-19. В некоторых вариантах вирусная нагрузка более 2,0 log_{10} sgmРНКкопий/г (например, приблизительно 2,0 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 2,5 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 3,0 log_{10} sgmРНК

копий/г, приблизительно 3,5 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 4,0 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 4,25 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 4,5 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 4,75 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 5,0 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 5,5 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 6,0 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 6,5 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 7,0 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 7,5 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 8,0 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 8,5 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 9 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 10 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 11 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 12 log_{10} sgmРНК копий/г, приблизительно 13 log_{10} sgmРНК копий/г или более) ткани означает, что субъект является предрасположенным к тяжелой форме заболевания COVID-19. В некоторых вариантах вирусная нагрузка более приблизительно 8,0 log_{10} sgmРНК копий/г в ткани легких, приблизительно 7,0 log_{10} sgmРНК копий/г в ткани носа, приблизительно 6,0 log_{10} sgmРНК копий/г в ткани трахеи, приблизительно 5,5 log_{10} sgmРНК копий/г в ткани сердца, или приблизительно 2,0 log_{10} sgmРНК копий/г в ткани ЖКТ, селезенки, печени, почек или мозга, означает, что субъект является предрасположенным к тяжелой форме заболевания COVID-19. В некоторых вариантах вирусная нагрузка более приблизительно 3% (например, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%) SARS-CoV-2 вРНК с проявлением методом ISH, означает, что субъект является предрасположенным к заболеванию (например, 2019-nCoV-опосредованное заболевание, например, COVID-19, например, тяжелая форма заболевания COVID-19). В некоторых вариантах вирусная нагрузка более приблизительно 5% (например, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%) SARS-CoV-2 вРНК с проявлением методом ISH означает, что субъект является предрасположенным к заболеванию тяжелой формой COVID-19. В некоторых вариантах вирусная нагрузка более приблизительно 5% (например, приблизительно 5%, приблизительно 6%, приблизительно 7%, приблизительно 8%, приблизительно 9%, приблизительно 10%) SARS-CoV-2 вРНК с проявлением методом ISH означает, что субъект является предрасположенным к заболеванию тяжелой формой COVID-19. В некоторых вариантах вирусную

нагрузку коронавируса (например, 2019-nCoV) измеряют один или несколько раз через приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 недель после инфицирования.

Мониторинг ответной реакции

В изобретении предлагаются также способы мониторинга иммунного ответа против коронавируса у субъекта в ответ на терапевтическую композицию (например, на любую из композиций или иммуногенных композиций, описанных в данном контексте или известных в данной области техники) для лечения или снижения риска инфицирования коронавирусом. Способ включает измерение уровня или количества антител против коронавируса (например, антитело против шиповидного белка) антител против шиповидного белка) у субъекта. В некоторых вариантах коронавирусом является 2019-nCoV. В некоторых вариантах антителом против коронавируса (например, антителом против шиповидного белка) является нейтрализующим антителом. Антитело против коронавируса (например, антитело против шиповидного белка, например, нейтрализующее антитело против шиповидного белка) можно измерить в течение короткого промежутка времени (например, для измерения устойчивости антительного ответа) или более длительного промежутка времени (например, чтобы измерить продолжительность антительного ответа) после введения терапевтической композиции (например, любой из композиций или иммуногенных композиций, описанных в данном контексте). В некоторых вариантах антитело против коронавируса (например, антитело против шиповидного белка) измеряют приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель, приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 месяца или приблизительно 2, 3, 4, 5 , 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 лет после введения субъекту терапевтической композиции (например, любой из композиций или иммуногенных композиций, описанных в данном контексте).

Считается, что у субъекта развивается ответная реакция на терапевтическую композицию, если антитело против коронавируса (например, антитело против шиповидного белка), обнаруженное у субъекта (например, в крови субъекта), превышает защитный уровень (например, выше титра по меньшей мере приблизительно 70 при измерении с использованием анализа

нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте, выше титра по меньшей мере приблизительно 25 при измерении с использованием описанного в данном контексте анализа нейтрализации жизнеспособного вируса или находится на уровне, который составляет по меньшей мере 80% медианного уровня (и предпочтительно на среднем уровне или выше) антикоронавирусного антитела в когорте выздоравливающих людей (например, группы людей, которые выздоровели или выздоравливают от коронавирусной инфекции (например, 2019-nCoV)) по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса). В другом варианте субъект считается не-восприимчивым к терапевтической композиции, если антитело против коронавируса (например, антитело против шиповидного белка), детектированное у субъекта, находится ниже защитного уровня (например, ниже титра по меньшей мере 70, измеренного методом анализа нейтрализации псевдовируса, описанного в данном контексте, ниже титра по меньшей мере 25, измеренного методом анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте, или на уровне менее 80% медианного уровня в когорте выздоравливающих людей, по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса). Защитный уровень антитела против коронавируса (например, нейтрализующее антитело против шиповидного белка) соответствует титру по меньшей мере приблизительно 70 (например, приблизительно 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350 или более) по данным анализа нейтрализации псевдовируса (например, анализ нейтрализации псевдовируса, описанный в данном контексте). В некоторых вариантах защитный уровень соответствует титру антитела против коронавируса (например, титр нейтрализующего антитела против шиповидного белка) по меньшей мере приблизительно 25 (например, приблизительно 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 175, 200 или более), по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса (например, анализа нейтрализации псевдовируса, как описано в данном контексте). В некоторых

вариантах защитным уровнем является титр антител против коронавируса (например, титр нейтрализующих антител против шиповидного белка), который составляет по меньшей мере приблизительно 60% (например, приблизительно 61%, приблизительно 62%, приблизительно 63%, приблизительно 64%, приблизительно 65%, приблизительно 66%, приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%, приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%, abo приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%, приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%, приблизительно 79%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, приблизительно 100%, приблизительно 110%, приблизительно 120%) медианного или среднего уровня в когорте выздоравливающих людей по данным нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте.

Если через некоторое время титр антител против коронавируса (например, антител против шиповидного белка) у субъекта (например, в крови субъекта) падает ниже защитного уровня или не достигает защитного уровня (например, ниже титра по меньшей мере приблизительно 70 по данным измерения с использованием анализа нейтрализации псевдовируса, как описано в данном контексте, падает ниже титра по меньшей мере 25 по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте, или ниже 80% медианного уровня в когорте выздоравливающих людей, определенного с использованием анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, как описано в данном контексте), то субъекту можно вводить или можно повторно вводить композицию вакцины против коронавируса (например, одну или более терапевтических или иммуногенных композиций, как описано в данном контексте) в отдельности или в комбинации с дополнительным тервапевтическим средством, таким как один или более терапевтических

средств, описанных в данном контексте. Введение композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в таком лечении, можно проводить один или более раз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более раз) через один или более дней (например, через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней), одну или более недель (например, через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель), месяцев (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев), или один год или более лет (например, через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более лет), или в течение жизни субъекта, как требуется для поддержания защитного уровня антител против коронавируса у субъекта, и тем самым защищая субъекта от инфицирования коронавирусом (например, инфекции вирусом 2019-nCoV).

Способ может включать измерение вирусной нагрузки (например, 2019-nCoV) в образце от субъекта. В некоторых вариантах коронавирусом является 2019-nCoV. В некоторых вариантах вирусную нагрузку измеряют приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 36, 42, или 48 ч или приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней после инфицирования. В некоторых вариантах образец представляет собой бронхоальвеолярный лаваж (BAL) или мазок из носа (NS). В некоторых вариантах образец представляет собой жидкость из организма (например, кровь, например, цельная кровь или плазма) субъекта. В некоторых вариантах образцом является образец ткани (например, образец ткани дыхательных путей), взятый у субъекта. В некоторых вариантах вирусной нагрузкой является детектируемый уровень нуклеиновой кислоты (например, субгеномной иРНК) или детектируемый уровень белка (например, уровень нуклеокапсидного белка (N)). В некоторых вариантах детектируемый уровень нуклеиновой кислоты (например, субгеномной иРНК) определяют с использованием РНК-секвенирования, количественной ОТ-кПЦР, кПЦР, мультиплексной кПЦР или ОТ-кПЦР, LAMP, микрочипового анализа или гибридизации (например, ISH (например, FISH)). В некоторых вариантах детектируемый уровень белка (например, нуклеокапсидного белка (N)) определяют методом иммуноанализа (например, иммуногистохимического (IHC) анализа или иммунохроматографического анализа). Считается, что у субъекта наблюдается ответная реакция на терапевтическую композицию, если вирусная нагрузка снижается ниже предварительно определенного уровня. В некоторых вариантах

предварительно определенный уровень составляет менее приблизительно 3,5 log_{10} копий sgmРНК/мл в образцах BAL или NS или менее приблизительно 5,0 log_{10} копий sgmРНК/г ткани (например, легких, ноздрей, трахеи, сердца, желудочно-кишечного тракта, селезенки, печени, почек или мозговой ткани). В некоторых вариантах у субъекта наблюдается ответная реакция на терапевтическую композицию, если у субъекта снижается вирусная нагрузка.

Если установлено, что у субъекта не развивается ответная реакция по данным определения вирусной нагрузки, то субъекту можно вводить или можно повторно вводить композицию вакцины против коронавируса (например, одна или более терапевтических или иммуногенных композиций, описанных в данном контексте) в отдельности или в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как один или более дополнительных терапевтических средств, описанных в данном контексте.

При необходимости снизить вирусную нагрузку введение композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в таком лечении, можно проводить один или более раз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более раз) через один или более дней (например, через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в него в качестве ссылок в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения в качестве ссылок.

Хотя изобретение описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что допускаются дополнительные модификации, и в объем этой заявки включены любые варианты, применения или оптимизации, в основном согласно принципам и включая такие отступления от изобретения, которые относятся к известной или общепринятой практике в области техники, к которой относится изобретение, и могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше и вытекающим из объема формулы изобретения.

В настоящем изобретении дополнительно предлагаются следующие варианты осуществления изобретения.

Вариант 1 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, кодирующую щитовидный S белок 2019-NCOV, включающую следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а. стабилизирующие мутации пролина в положениях аминокислот 986 и 987 и

б. мутации в участке расщепления фурином (SEQ ID NO: 90).

Вариант 2 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1, включающей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 211.

Вариант 3 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1 или 2, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует щитовидный S белок 2019-NCOV, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205.

Вариант 4 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

Вариант 5 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1 или 4, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 99% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

Вариант 6 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

Вариант 7 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

Вариант 8 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1, включающей нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении последовательности SEQ ID NO: 121 или комплементарной последовательности.

Вариант 9 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 4 или 5, включающей нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении последовательности SEQ ID NO: 143 или комплементарной последовательности.

Вариант 10 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 6 или 7, включающей нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении последовательности SEQ ID NO: 146 или комплементарной с ней последовательности.

Вариант 11 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 6 или 7, включающей нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении последовательности SEQ ID NO: 148 или комплементарной с ней последовательности.

Вариант 12 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 1, кодирующую щитовидный S белок 2019-NCOV, включающий следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в) делеция сигнальной последовательности.

Вариант 13 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по вариантам 1-12, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант 14 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по вариантам 1, 12 или 13, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 99% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант 15 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по вариантам 1 или 12, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

Вариант 16 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по вариантам 1, 12 или 13, включающей нуклеотидную последовательность, с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении

последовательности SEQ ID NO: 115 или комплементарной с ней последовательности.

Вариант 17 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 15, включающей нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении последовательности SEQ ID NO: 118 или комплементарной с ней последовательности.

Вариант 18 включает изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих вариантов, где нуклеиновая кислота, которая кодирует щитовидный S белок 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), предпочтительно немедленно раннему промотеру CMV.

Вариант 19 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих вариантов, где нуклеиновая кислота, которая кодирует щитовидный S белок 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), включающему по меньшей мере один мотив оператора тетрациклина (TetO).

Вариант 20 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 19, где CMV промотер, включающий по меньшей мере один мотив TetO, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 219.

Вариант 21 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 19 или п. 20, где CMV промотер состоит из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 219.

Вариант 22 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV, включающий следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а. стабилизирующие мутации пролина в положениях аминокислот 986 и 987 и

б. мутации в участке расщепления фурином (SEQ ID NO: 90).

Вариант 23 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205.

Вариант 24 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22, включающий аминокислотную последовательность с

идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

Вариант 25 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22 или варианту 23, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 99% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

Вариант 26 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

Вариант 27 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

Вариант 28 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22, включающий следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в. делеция сигнальной последовательности.

Вариант 29 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22 или варианту 28, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант 30 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22, 28 или 29, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 99% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

Вариант 31 представляет собой изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по варианту 22 или варианту 28, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

Вариант 32 представляет собой изолированный вектор, включающий одну или более молекул нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21.

Вариант 33 представляет собой вектор по варианту 32, где вектор является дефективным по репликации.

Вариант 34 представляет собой вектор по варианту 32, где вектор представляет собой вектор млекопитающих, бактерий или вирусов.

Вариант 35 представляет собой вектор по варианту 32, где вектор является экспрессионным вектором.

Вариант 36 представляет собой вектор по варианту 32, где вирусный вектор представляет собой вирус, выбранный из группы, состоящей из следующих вирусов: ретровирус, аденовирус, адено-ассоциированный вирус, парвовирус, коронавирус, отрицательно-цепочечные РНК вирусы, ортомиксовирус, рабдовирус, парамиксовирус, положительно-цепочечные РНК вирусы, пикорнавирус, альфавирус, двухцепочечные ДНК вирусы, вирусы герпеса, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус, вирус оспы кур и вирус оспы канареек.

Вариант 37 представляет собой вектор по варианту 36, где вектор представляет собой аденовирус.

Вариант 38 представляет собой вектор по варианту 37, где аденовирус выбирают из группы, включающей Ad26, Ad52, Ad59, Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad34, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50 и Pan9, прежде всего Ad26.

Вариант 39 представляет собой композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21, полипептид по любому варианту 22-31, или вектор по любому варианту 32-38.

Вариант 40 представляет собой композицию по варианту 39, дополнительно включающую фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант 41 представляет собой композицию по варианту 39 или 40, дополнительно включающую адъювант или иммуностимулирующий агент.

Вариант 42 представляет собой иммуногенную композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21, полипептид по любому варианту 22-31, или вектор по любому варианту 32-38.

Вариант 43 представляет собой иммуногенную композицию по варианту 42, где иммуногенной композицией является вакцина.

Вариант 44 представляет собой композицию для применения при лечении снижении риска инфицирования коронавирусом, таким как вирус 2019-nCoV, субъекта, нуждающегося в таком лечении, включающую терапевтически эффективное количество композиции по любому из вариантов 39-41 или иммуногенной композиции по варианту 42 или 43.

Вариант 45 представляет собой композицию для применения при снижении опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, включающую терапевтически эффективное количество композиции по любому из вариантов 39-41 или иммуногенной композиции по варианту 42 или 43.

Вариант 46 представляет собой композицию для применения для предотвращения молекулярно подтвержденной от умеренной до тяжелой/критической формы COVID-19 у субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом субъекту вводят композицию по любому из вариантов 39-41 или иммуногенную композицию по варианту 42 или 43, где композиция предназначена для введения в дозе $5x10^{10}$ вч в дозе согласно одной из схем дозировок.

Вариант 47 представляет собой способ получения иммуногенной композиции для лечения или снижения риска инфицирования коронавирусом (например, 2019-NCOV) субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(а) смешивание по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21, полипептида по любому из вариантов 22-31, вектора по любому из вариантов 32-38, композиции по любому из вариантов 39-41, с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем, при этом получают иммуногенную композицию, и

(б) размещение иммуногенной композиции в контейнер.

Вариант 48 представляет собой набор, включающий:

(а) первый контейнер, включающий по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21, полипептид по любому из вариантов 22-31, вектор по любому из вариантов 32-38, композицию по любому из вариантов 39-41, и иммуногенную композицию по варианту 42 или 43,

(б) инструкции по их применению и необязательно

в) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант 49 представляет собой набор по варианту 48, где первый контейнер дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант 50 представляет собой набор по варианту 48 или 49, где набор необязательно включает адъювант и/или иммуностимулирующий агент.

Вариант 51 представляет собой изолированную и/или рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок коронавируса, включающую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 211 или ее фрагменты.

Вариант 52 представляет собой изолированный и/или рекомбинантный S белок коронавируса, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 или ее фрагменты.

Вариант 53 представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок коронавируса по варианту 52.

Вариант 54 представляет собой нуклеиновую кислоту по варианту 51 или 53, которая представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетках человека.

Вариант 55 представляет собой вектор, включающий нуклеиновую кислоту по вариантам 51, 53 или 54.

Вариант 56 представляет собой вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок по варианту 52.

Вариант 57 представляет собой вектор по варианту 55 или 56, где вектором является рекомбинантный вектор аденовируса человека.

Вариант 58 представляет собой вектор по варианту 57, где нуклеиновая кислота, кодирующая S белок коронавируса, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), включающему по меньшей мере один мотив оператора тетрациклина (TetO).

Вариант 59 представляет собой вектор по варианту 58, где промотер CMV, включающий по меньшей мере один мотив TetO, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 219.

Вариант 60 представляет собой вектор по варианту 57, 58 или 59, где рекомбинантный аденовирус человека содержит делецию в области E1, делецию в области E3 или делецию в обеих областях E1 и E3 в геноме аденовируса.

Вариант 61 представляет собой вектор по любому из вариантов 58-60, где вектором является рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26.

Вариант 62 представляет собой композицию, включающую нуклеиновую кислоту по вариантам 51, 53 или 54, белок по варианту 52 и/или вектор по любому из вариантов 55-61.

Вариант 63 представляет собой вакцину против COVID-19, включающую нуклеиновую кислоту по любому из вариантов 51, 53 или 54, белок по варианту 52 и/или вектор по любому из вариантов 55-61.

Вариант 64 представляет собой вакцину по варианту 63, включающую рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2, который включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 или ее фрагменты.

Вариант 65 представляет собой способ вакцинации субъекта против COVID-19, при этом способ включает введение субъекту вакцины по варианту 63 или 64.

Вариант 66 представляет собой способ снижения инфицирования и/или репликации вируса SARS-CoV-2 у субъекта, включающий введение субъекту композиции по варианту 59 или вакцины по варианту 63 или 64.

Вариант 67 представляет собой способ предотвращения молекулярно подтвержденной от умеренной до тяжелой/критической формы COVID-19 у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту вакцины по варианту 60 или 61, которую вводят по схеме введения вакцины в одной дозе или двух дозах.

Вариант 68 представляет собой способ предотвращения молекулярно подтвержденной от умеренной до тяжелой/критической формы COVID-19 по сравнению с плацебо взрослому субъекту, серонегативному в отношении SARS-CoV-2, включающий введение субъекту вакцины по варианту 63 или 64, которую вводят по схеме введения вакцины в одной дозе или двух дозах.

Вариант 69 представляет собой способ снижения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 по данным анализа количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) у участников испытаний с молекулярно подтвержденной от умеренной до тяжелой/критической формой COVID-19 у субъекта, включающий введение субъекту вакцины по варианту 63 или 64, которую вводят по схеме введения вакцины в одной дозе или двух дозах.

Вариант 70 представляет собой способ по любому из вариантов 65-69, где предполагается, что субъект страдает от инфекции вируса SARS-CoV-2 и/или у субъекта установлен диагноз инфицирования вирусом SARS-CoV-2.

Вариант 71 представляет собой способ по любому из вариантов 65-70, где вакцину вводят внутримышечным способом.

Вариант 72 представляет собой способ по любому из вариантов 65-71, где вакцину вводят по двухдозовой схеме вакцинации, включающей 5 x 10^{10} вч или 1 x 10^{11} вч в дозе, вводимой с интервалом приблизительно 8 недель.

Вариант 73 представляет собой способ по любому из вариантов 65-72, состоящий из введения субъекту в дозе 5 x 10^{10} вч или 1 x 10^{11} вч. в ходе однодозовой схемы вакцинации.

Вариант 74 представляет собой изолированную клетку-хозяина, включающую рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагменты.

Вариант 75 представляет собой способ изготовления вакцины против COVID-19, включающий получение рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагмент, размножение указанного рекомбинантного аденовируса в культуре клеток-хозяина, выделение и очистку рекомбинантного аденовируса и включение рекомбинантного аденовируса в состав фармацевтически приемлемой композиции.

Вариант 76 представляет собой изолированную рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая формирует геном рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагмент.

Вариант 77 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84.

Вариант 78 представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 77, где

а) полипептид способен вызывать иммунный ответ у субъекта, или

б) полипептид характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% в отношении указанного полипептида или последовательности полипептида с любой последовательностью из SEQ ID NO: 1-84.

Вариант 79 представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 77 или 78, где полипептид характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56.

Вариант 80 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении ко всей или части любой из последовательностей SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204 или комплементарной им последовательности.

Вариант 81 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 80 с идентичностью последовательности по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% в отношении указанной нуклеиновой кислоты или нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204.

Вариант 82 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по варианту 80 или 81, где молекула нуклеиновой кислоты или ее часть способна вызывать иммунный ответ у субъекта.

Вариант 83 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 80-82, где молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 195.

Вариант 84 представляет собой изолированный полипептид, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении ко всей или части последовательности любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84.

Вариант 85 представляет собой изолированный полипептид по варианту 84, где указанный полипептид характеризуется идентичностью последовательности по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% в отношении к указанному полипептиду, или аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-84.

Вариант 86 представляет собой изолированный полипептид по варианту 84 или 85, где полипептид или его часть способны вызывать иммунный ответ у субъекта.

Вариант 87 представляет собой изолированный полипептид по любому из вариантов 84-86, где полипептид характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

Вариант 88 представляет собой изолированный вектор, включающий одну или более молекул нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83.

Вариант 89 представляет собой вектор по варианту 88, где вектор является дефективным по репликации.

Вариант 90 представляет собой вектор по варианту 88 или 89, где вектор является вектором млекопитающих, бактерий или вирусов.

Вариант 91 представляет собой вектор по варианту 90, где вектор является экспрессионным вектором.

Вариант 92 представляет собой вектор по варианту 90, где вирусный вектор выбирают из группы, состоящей из ретровируса, аденовируса, адено-ассоциированного вируса, парвовируса, коронавируас, отрицательно-цепочечных РНК вирусов, ортомиксовируса, рабдовируса, парамиксовируса, положительно-цепочечных РНК вирусов, пикорнавируса, альфавируса, двухцепочечных ДНК вирусов, вирусов герпеса, вируса Эпштейна-Барра, цитомегаловируса, вируса оспы кур и вируса оспы канареек.

Вариант 93 представляет собой вектор по варианту 92, где вектор представляет собой аденовирус.

Вариант 94 представляет собой вектор по варианту 93, где аденовирус выбирают из группы, состоящей из Ad26, Ad52, Ad59, Ad2, Ad5, Ad11, Ad12, Ad24, Ad34, Ad40, Ad48, Ad49, Ad50 и Pan9.

Вариант 95 представляет собой вектор по варианту 94, где Ad52 означает резус Ad52 или Ad26 означает резус Ad26.

Вариант 96 представляет собой изолированное антитело, которое специфически связывается с полипептидом по любому из вариантов 84-87.

Вариант 97 представляет собой антитело по варианту 96, где антитело продуцируется при иммунизации млекопитающего нуклеиновой кислотой по любому варианту 77-82, полипептидом по любому из вариантов 84-87 или вектором по любому из вариантов 88-95.

Вариант 98 представляет собой антитело по варианту 97, где млекопитающим является человек, КРС, коза, мышь или кролик.

Вариант 99 представляет собой антитело по варианту 96 или 97, где антитело является гуманизированным.

Вариант 100 представляет собой антитело по любому из вариантов 96-99, где антитело представляет собой IgG.

Вариант 101 представляет собой антитело по любому из вариантов 96-100, где антитело представляет собой бис-Fab, Fv, Fab, Fab'-SH, F(ab')2, диатело, линейное антитело или scFV.

Вариант 102 представляет собой способ продуцирования антитела против 2019-Юханьского коронавируса (2019-nCoV), включающего некоторое количество молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83, полипептида по любому из вариантов 84-87 и/или вектора по любому из вариантов 88-95, субъекту, достаточного для индукции продуцирования антисыворотки, нейтрализующей 2019-nCoV после введения указанному субъекту.

Вариант 103 представляет собой изолированное антитело анти-2019-nCoV, продуцируемое способом по варианту 102.

Вариант 104 представляет собой антитело по варианту 103, где антитело связывается с эпитопом в любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84.

Вариант 105 представляет собой композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83, полипептид по любому из вариантов 84-87, вектор по любому из вариантов 88-95 или антитело по любому из вариантов 96-101 или 103-104.

Вариант 106 представляет собой композицию по варианту 105, дополнительно включающую фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант 107 представляет собой композицию по варианту 105 или 106, дополнительно включающую адъювант или иммуностимулирующий агент.

Вариант 108 представляет собой иммуногенную композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83, полипептид по любому из вариантов 84-87, вектор по любому из вариантов 88-95 или антитело по любому из вариантов 96-101 или 103-104.

Вариант 109 представляет собой иммуногенную композицию по варианту 108, где иммуногенной композицией является вакцина.

Вариант 110 представляет собой иммуногенную композицию по варианту 108, где указанная иммуногенная композиция способна оказывать лечебный эффект или снижать риск инфицирования коронавирусом (например, инфицирование вирусом 2019-nCoV) у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Вариант 111 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов 108-110, где указанная ммуногенная композиция индуцирует продуцирование антисыворотки, нейтрализующей 2019-nCoV после введения указанному субъекту.

Вариант 112 представляет собой иммуногенную композицию по любому из вариантов 108-111, где субъектом является млекопитающее.

Вариант 113 представляет собой иммуногенную композицию по варианту 112, где млекопитающим является человек.

Вариант 114 представляет собой иммуногенную композицию по варианту 113, где человек страдает от сопутствующего заболевания.

Вариант 115 представляет собой иммуногенную композицию по варианту 114, где сопутствующим заболеванием является гипертензия, диабет или сердечно-сосудистое заболевание.

Вариант 116 представляет собой способ идентификации, диагностирования и/или предсказания предрасположенности у субъекта к инфекции коронавируса, включающий выявление у субъекта защитного уровня антител против коронавируса (таких как антитело против шиповидного белка) в образце, взятом у субъекта, где предпочтительно защитным уровнем является:

(i) уровень, который равен или выше титра по меньшей мере приблизительно 70, по данным измерения методом анализа нейтрализации псевдовируса, или

(ii) уровень, который равен или выше титра по меньшей мере 25, по данным измерения методом анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, или

(iii) уровень, который составляет по меньшей мере 80% медианного уровня антител против коронавируса в когорте выздоравливающих людей, по данным измерения методом анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса.

Вариант 117 представляет собой способ по варианту 116, где способ дополнительно включает введение эффективного количества композиции по любому из вариантов 105-107 или иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115 субъекту, который характеризуется уровнем ниже защитного уровня антител против коронавируса.

Вариант 118 представляет собой способ по варианту 116 или 117, где способ дополнительно включает идентификацию класса антитела против коронавируса (например, антитела против шиповидного белка).

Вариант 119 представляет собой способ по варианту 118, где классом является IgG.

Вариант 120 представляет собой способ по одному любому из вариантов 116-119, где образец представляет собой жидкость из организма субъекта, где предпочтительно жидкостью из организма является кровь.

Вариант 121 представляет собой способ по одному любому из вариантов 116-120, где коронавирусом является 2019-nCoV.

Вариант 122 представляет собой способ лечения или снижения риска коронавирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в таком лечении, причем способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из вариантов 105-107 или иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115.

Вариант 123 представляет собой способ по варианту 122, дополнительно включающий измерение у субъекта уровня антител против коронавируса (например, антител против шиповидного белка).

Вариант 124 представляет собой способ по варианту 123, где уровень антител против коронавируса измеряют у субъекта до и/или после введения.

Вариант 125 представляет собой способ по варианту 124, где уровень антител против коронавируса измеряют у субъекта один или более раз приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дней, через 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 недель, через 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев, через 1, 2, 3, 4 или 5 лет после введения.

Вариант 126 представляет собой способ по любому из вариантов 122-125, где уровень антител против коронавируса у субъекта находится ниже защитного уровня и где способ дополнительно включает повторное введение субъекту композиции по любому из вариантов 105-107, или введение иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115 указанному субъекту, или введение другой композиции против коронавируса.

Вариант 127 представляет собой способ по варианту 126, где защитный уровень антител является достаточным для снижения симптомов или продолжительности опосредованного коронавирусом заболевания.

Вариант 128 представляет собой способ по варианту 126 или 127, где защитный уровень представляет собой

i) уровень, при котором титр равен или выше титра по меньшей мере приблизительно 70 по данным анализа нейтрализации псевдовируса, или

ii) уровень, при котором титр равен или выше титра по меньшей мере приблизительно 25 по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, или

(iii) уровень, который составляет по меньшей мере 80% медианного уровня антикоронавирусного антитела в когорте выздоравливающих пациентов по данным анализа нейтрализации псевдовируса или анализа нейтрализации жизнеспособного вируса.

Вариант 129 представляет собой способ по любому из вариантов 122-128, где коронавирусом является 2019-nCoV.

Вариант 130 представляет собой способ снижения опосредованной коронавирусом активности (например 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по любому из вариантов 105-107 или иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115.

Вариант 131 представляет собой способ по варианту 130, где терапевтически эффективное количество является достаточным для продуцирования в сыворотке антител против щиповидного белка с титром log более 2 у субъекта по данным анализа ИФА.

Вариант 132 представляет собой способ по варианту 131, где терапевтически эффективное количество находится в интервале от 15 мкг до 300 мкг композиции по любому из вариантов 105-107 или иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115.

Вариант 133 представляет собой способ по любому из вариантов 130-132, где указанная активность представляет собой титр вируса, распределение вируса, инфекцию или слияние клеток.

Вариант 134 представляет собой способ по варианту 133, где указанный титр вируса снижается после введения композиции по любому из вариантов 105-107 или иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115.

Вариант 135 представляет собой способ по варианту 134, где титр вируса снижается на 25% или более.

Вариант 136 представляет собой способ по варианту 135, где титр вируса снижается на 50% или более.

Вариант 137 представляет собой способ по варианту 136, где титр вируса снижается на 75% или более.

Вариант 138 представляет собой способ по варианту 137, где коронавирус не детектируется после указанного введения.

Вариант 139 представляет собой способ по любому из вариантов 130-138, где указанное введение осуществляют до воздействия коронавируса.

Вариант 140 представляет собой способ по варианту 139, где указанное введение осуществляют по меньшей мере за 1 ч перед воздействием указанного коронавируса.

Вариант 141 представляет собой способ по варианту 140, где указанное введение осуществляют по меньшей мере за 1 неделю, 1 месяц или год перед воздействием указанного коронавируса.

Вариант 142 представляет собой способ по любому из вариантов 130-138, где указанное введение осуществляют после воздействия коронавируса.

Вариант 143 представляет собой способ по варианту 142, где указанное введение осуществляют по меньшей мере за 15 мин после воздействия указанного коронавируса.

Вариант 144 представляет собой способ по варианту 143, где указанное введение осуществляют по меньшей мере за 1 ч, 1 день, 1 неделю после воздействия коронавируса.

Вариант 145 представляет собой способ по любому из вариантов 130-144, где указанному субъекту вводят по меньшей мере одну дозу молекулы нуклеиновой кислоты, полипептида, вектора, композиции, иммуногенной композиции и антитела.

Вариант 146 представляет собой способ по варианту 145, где указанному субъекту вводят по меньшец мере две дозы.

Вариант 147 представляет собой способ по варианту 146, где указанные молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор, композицию, иммуногенную композицию вводят указанному субъекту виде прайминг-дозы, бустерной дозы или прайминг-бустерной дозы.

Вариант 148 представляет собой способ по любому из вариантов 130-147, где молекулу нуклеиновой кислоты, полипептид, вектор, композицию, иммуногенную композицию или антитело вводят внутримышечным, внутривенным, внутрикожным, чрескожным, внутриартериальным, внутрибрюшинным методом, внутрь очага поражения, внутричерепным, внутрисуставным, внутрь предстательной железы, внутриплевральным, внутритрахеальным, интраназальным, интравитреальным, интравагинальным, интраректальным, местным способами, внутрь опухоли, перитонеальным, подкожным, субконъюнктивальным, внутрипузырным, в слизистую оболочку, внутриперикардиальным, внутрипупочным, внутриглазным, пероральным, местным способами, с использованием ингаляции, инъекции, вливания, непрерывного вливания, местного вливания, омывания напрямую клетки-мишени, с использованием катетера, лаважа, через желудочный зонд, в виде кремов или липидных композиций.

Вариант 149 представляет собой способ по любому из вариантов 130-148, где субъектом является млекопитающее.

Вариант 150 представляет собой способ по варианту 149, где млекопитающим является человек.

Вариант 151 представляет собой способ по варианту 150, где человек страдает от сопутствующего хронического заболевания.

Вариант 152 представляет собой способ по варианту 151, где сопутствующим заболеванием является гипертензия, диабет или сердечно-сосудистое заболевание.

Вариант 153 представляет собой способ по любому из вариантов 130-152, где способ ускоряет иммунный ответ у указанного субъекта.

Вариант 154 представляет собой способ по варианту 153, где иммунный ответ представляет собой гуморальный иммунный ответ.

Вариант 155 представляет собой способ по варианту 154, где гуморальным иммунным ответом является ответ IgG.

Вариант 156 представляет собой композицию для применения при лечении или снижении риска инфицирования коронавирусом, таким как инфекция 2019-nCoV, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, которая включает терапевтически эффективное количество композиции по любому из вариантов 105-107 или иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115.

Вариант 157 представляет собой композицию для применения при снижении опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, которая включает терапевтически эффективное количество композиции по любому из вариантов 105-107 или иммуногенной композиции по любому из вариантов 108-115.

Вариант 158 представляет собой способ приготовления иммуногенной композиции для лечения или снижения риска инфицирования коронавирусом (например, 2019-nCoV) субъекта, нуждающегося в таком лечении, при этом указанный способ включает следующие стадии:

(а) смешивание по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83, полипептида по любому из вариантов 84-87, вектора по любому из вариантов 88-95, композиции по любому из вариантов 105-107 и антитела по любому из вариантов 96-101 или 102-104, с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем, при этом получают иммуногенную композицию, и

(б) размещение иммуногенной композиции в контейнер.

Вариант 159 представляет собой набор, включающий

(а) первый контейнер, включающий по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83, полипептид по любому из вариантов 84-87, вектор по любому из вариантов 88-95, композицию по любому из вариантов 105-107, иммуногенную композицию по любому из вариантов 108-115, и антитело по любому из вариантов 96-101 или 103-104,

(б) инструкции по их применению и необязательно

(в) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант 160 представляет собой набор по варианту 159, где первый контейнер дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Вариант 161 представляет собой набор по варианту 159 или 160, где набор необязательно включает адъювант и/или иммуностимулирующий агент.

Вариант 162 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 80-82, где молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 143.

Вариант 163 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 80-82, где молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 204.

Вариант 164 представляет собой изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 80-82, где молекула нуклеиновой кислоты характеризуется нуклеотидной последовательностью 19-3837 SEQ ID NO: 204.

Вариант 165 представляет собой изолированный полипептид по любому из вариантов 84-86, где полипептид характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51.

Вариант 166 представляет собой вектор по варианту 88, где вектором является Ad26.

Вариант 167 представляет собой антитело по варианту 93, где антитело генерируется при иммунизации млекопитающего нуклеиновой кислотой, включающей SEQ ID NO: 143, нуклеотидами 19-3837 SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 204, полипептидом, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, или вектором Ad26, включающим нуклеиновую кислоту, включающую SEQ ID NO: 143, нуклеотиды 19-3837 SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 204.

Вариант 168 представляет собой способ по варианту 102, включающий введение количества молекулы нуклеиновой кислоты, включающей SEQ ID NO: 143, нуклеотидов 19-3837 SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 204, полипептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, или вектора Ad26, включающего нуклеиновую кислоту, включающую SEQ ID NO: 143, нуклеотидов 19-3837 SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 204, субъекту, которое является достаточным для продуцирования нейтрализующей антисыворотки анти-2019-nCoV после введения указанному субъекту.

Вариант 169 представляет собой композицию, включающую изолированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 162-164, полипептид по варианту 165, вектор по варианту 166, или антитело по варианту 167 или 168.

Вариант 170 представляет собой иммуногенную композицию, включающую молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 162-164, полипептид по варианту 165, вектор по варианту 166, или антитело по варианту 167 или 168.

Вариант 171 представляет собой способ лечения или снижения риска коронавирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в таком лечении, причем способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по варианту 169 или иммуногенной композиции по варианту 170.

Вариант 172 представляет собой способ снижения опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, который включает введение терапевтически эффективного количества композиции по варианту 169 или иммуногенной композиции по варианту 170 указанному субъекту.

Вариант 173 представляет собой композицию для применения при лечении или снижении риска коронавирусной инфекции, например, инфекции 2019-nCoV, у субъекта, нуждающегося в таком лечении, которая включает терапевтически эффективное количество композиции по варианту 169 или иммуногенной композиции по варианту 170.

Вариант 174 представляет собой композицию для применения при снижении опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV, которая включает терапевтически эффективное количество композиции по варианту 169 или иммуногенной композиции по варианту 170.

Вариант 175 представляет собой применение по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21, полипептида по любому из вариантов 22-31, вектора по любому из вариантов 32-38, композиции по любому из вариантов 39-41 или иммуногенной композиции по варианту 42 или 43, для приготовления лекарственного препарата для лечения или снижения риска инфицирования вирусом, таким как 2019-nCoV, субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Вариант 176 представляет собой применение по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21, полипептида по любому из вариантов 22-31, вектора по любому из вариантов 32-38, композиции по любому из вариантов 39-41 и иммуногенной композиции по варианту 42 или 43, для приготовления лекарственного препарата для снижения опосредуемой коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованной активности) у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Вариант 177 представляет собой применение по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-21, полипептида по любому из вариантов 22-31, вектора по любому из вариантов 32-38, композиции по любому из вариантов 39-41 и иммуногенной композиции по варианту 42 или 43, для приготовления лекарственного препарата для предотвращения молекулярно подтвержденной от умеренной до тяжелой/критической формы COVID-19 у субъекта, нуждающегося в таком лечении, где композиция предназначена для введения $5x10^{10}$ вч в дозе согласно однодозовой схеме введения.

Вариант 178 представляет собой вакцину по варианту 63 или 64 для применения при вакцинации субъекта против COVID-19.

Вариант 179 представляет собой вакцину по варианту 63 или 64 или композицию по варианту 62, предназначенные для применения при снижении инфекции и/или репликации SARS-CoV-2 у субъекта.

Вариант 180 представляет собой вакцину по варианту 63 или 64 для применения при предотвращении молекулярно подтвержденной от умеренной до тяжелой/критической формы COVID-19 у субъекта согласно одно- или двухдозовой схеме введения.

Вариант 181 представляет собой вакцину по варианту 63 или 64 для применения при предотвращении молекулярно подтвержденной от умеренной до тяжелой/критической формы COVID-19 по сравнению с плацебо у SARS-CoV-2 серонегативных взрослых субъектов согласно одно- или двухдозовой схеме введения.

Вариант 182 представляет собой вакцину по варианту 63 или 64 для применения при снижении вирусной нагрузки SARS-CoV-2 по данным анализа с использованием количественной полимеразной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) у участников с молекулярно подтвержденной формой от умеренного до тяжелого/критического заболевания COVID-19 у субъекта согласно одно- или двухдозовой схеме введения.

Вариант 183 представляет собой вакцину для применения по любому из вариантов 178-182, где предполагается, что субъект страдает от инфекции вируса SARS-CoV-2 и/или у субъекта установлен диагноз инфицирования вирусом SARS-CoV-2.

Вариант 184 представляет собой вакцину для применения по любому из вариантов 178-183, где вакцину вводят в состав для внутримышечного введения.

Вариант 185 представляет собой вакцину для применения по любому из вариантов 181-184, где вакцина предназначена для введения по двухдозовой схеме вакцинации, включающей 5 x 10^{10} вч или 1 x 10^{11} вч в дозе, вводимой с интервалом приблизительно 8 недель.

Вариант 186 представляет собой вакцину для применения по любому из вариантов 178-185, состоящего из однократного введения субъекту дозы 5×10^{10} вч или 1 x 10^{11} вч в дозе вакцины

Вариант 187 представляет собой применение нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 51, 53 или 54, белка по варианту 52 и/или вектора по любому из вариантов 55-61, при приготовлении лекарственного препарата для вакцинации субъекта против COVID-19.

Вариант 188 представляет собой применение нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 51, 53 или 54, белка по варианту 52 и/или вектора по любому из вариантов 55-61, при приготовлении лекарственного препарата для снижения инфекции и/или репликации SARS-CoV-2 у субъекта.

Вариант 189 представляет собой применение нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 51, 53 или 54, белка по варианту 52 и/или вектора по любому из вариантов 55-61, при приготовлении лекарственного препарата для предотвращения молекулярно подтвержденной формы от умеренного до тяжелого/критического заболевания COVID-19 у субъекта согласно одно- или двухдозовой схеме вакцинации.

Вариант 190 представляет собой применение нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 51, 53 или 54, белка по варианту 52 и/или вектора по любому из вариантов 55-61, при приготовлении лекарственного препарата для предотвращения молекулярно подтвержденной формы от умеренного до тяжелого/критического заболевания COVID-19 по сравнению с плацебо у SARS-CoV-2серонегативных взрослых субъектов согласно одно- или двухдозовой схеме вакцинации.

Вариант 191 представляет собой применение нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 51, 53 или 54, белка по варианту 52 и/или вектора по любому из вариантов 55-61, при приготовлении лекарственного препарата для снижения вирусной нагрузки SARS-CoV-2 по данным анализа с использованием

количественной полимеразной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) у участников с молекулярно подтвержденной формой от умеренного до тяжелого/критического заболевания COVID-19 у субъекта согласно одно- или двухдозовой схеме введения.

Вариант 192 представляет собой применение по любому из вариантов 187-191, где предполагается, что субъект страдает от инфекции вируса SARS-CoV-2 или у субъекта установлен диагноз инфицирования вирусом SARS-CoV-2.

Вариант 193 представляет собой применение по любому из вариантов 187-192, где вакцину вводят в состав для внутримышечного введения.

Вариант 194 представляет собой применение по любому из вариантов 187-193, где вакцина предназначена для введения по двухдозовой схеме вакцинации, включающей 5 x 10^{10} вч или 1 x 10^{11} вч в дозе, вводимой с интервалом приблизительно 8 недель.

Вариант 195 представляет собой применение по любому из вариантов 187-194, для однократного введения субъекту вакцины в дозе 5×10^{10} вч или 1 x 10^{11} вч.

Вариант 196 представляет собой применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83, полипептида по любому из вариантов 84-87, вектора по любому из вариантов 88-95, или антитела по любому из вариантов 96-101 или 103-104, при приготовлении лекарственного препарата для лечения или снижения риска инфицирования коронавирусом, таким как инфекция 2019-nCoV, субъекта против COVID-19, нуждающегося в таком лечении.

Вариант 197 представляет собой применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 77-83, полипептида по любому из вариантов 84-87, вектора по любому из вариантов 88-95, или антитела по любому из вариантов 96-101 или 103-104, при приготовлении лекарственного препарата для снижения опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованная активность) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV.

Вариант 198 представляет собой применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 162-164, полипептида по варианту 165, вектора по варианту 166, или антитела по варианту 167 или 168, при приготовлении лекарственного препарата для лечения или снижения риска инфицирования коронавирусом, таким как 2019-nCoV, субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Вариант 199 представляет собой применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 162-164, полипептида по варианту 165, вектора по варианту 166, или антитела по варианту 167 или 168, при приготовлении лекарственного препарата для снижения опосредованной коронавирусом активности (например, 2019-nCoV-опосредованная активность) у субъекта, инфицированного вирусом 2019-nCoV.

Конкретные варианты осуществления описаны в вариантах осуществления.

Изобретение далее поясняется следующими примерами. Примеры никоим образом не ограничивают область изобретения, а служат только для пояснения изобретения.

Примеры

Следующие примеры представлены для иллюстрации изобретения и никоим образом не ограничивают его объем.

Пример 1

Разработка ДНК-вакцин против 2019-nCoV

Конструирование иммуногенов 2019-nCoV и ДНК-вакцин 2019-nCoV

Шиповидный белок уханьского коронавируса (2019-nCoV) (SEQ ID NO: 29) использовали для конструирования молекул нуклеиновых кислот (SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204) для получения методом синтеза. Для усиления экспрессии трансгена была использована некоторая оптимизация молекул нуклеиновых кислот. ДНК-вакцины можно получить при включении молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204 в вектор экспрессии млекопитающих (например, pcDNA3.1+; Invitrogen, Калифорния, США). Мутанты с делециями могут не содержать сигнальную последовательность, цитоплазматический фрагмент, трансмембранный фрагмент, S2 или их комбинации.

Пример 2

Введение вакцины на основе нуклеиновой кислоты субъекту-человеку

Композиции можно вводить субъекту до или после воздействия 2019-nCoV способами по изобретению. Субъект-человек может представлять собой субъекта с высоким риском инфицирования, например, человека, который посещал или будет путешествовать в регион, где распространена инфекция 2019-nCoV (например, провинция Хубэй), или у человека, идентифицированного как имеющего симптомы, соответствующие инфекции 2019-nCoV.

Например, человеку с сопутствующими заболеваниями (например, гипертонией, диабетом или сердечно-сосудистым заболеванием), у которого выявлен риск заражения 2019-nCoV, можно ввести вакцину на основе нуклеиновой кислоты (например, ДНК-вакцину или РНК-вакцину), содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеиновую кислоту 2019-nCoV (например, любую из последовательностью SEQ ID NO: 93-181, 190-195 и 199-204)), например, в аденовирусном векторе в дозе от 10 мкг до 10 мг. Предпочтительно вакцина на основе нуклеиновой кислоты (например, ДНК-вакцина или РНК-вакцина) может содержать SEQ ID NO: 136, 193, 142, 148, 195, 121, 122, 123, 129 и/или 130. Затем пациента можно обследовать на наличие симптомов инфекции 2019-nCoV, разрешение симптомов и/или продуцирование антител против 2019-nCoV. При необходимости можно вводить вторую дозу или дополнительные дозы вакцины на основе нуклеиновой кислоты.

Пример 3

Введение иммуногенного полипептида 2019-nCoV субъекту-человеку

Композиции можно вводить субъектам-людям до или после воздействия 2019-nCoV согласно способам. Субъектом-человеком может быть субъект, у которого выявлен высокий риск заражения, например, человек, который посещал или будет путешествовать в регион, где распространена инфекция 2019-nCoV (например, провинция Хубэй), или идентифицированный как человек, у которого наблюдаются симптомы, соответствующие инфекции 2019-nCoV.

Например, человеку с сопутствующими заболеваниями (например, гипертонией, диабетом или сердечно-сосудистым заболеванием), у которого выявлен риск заражения 2019-nCoV, можно ввести иммуноген 2019-nCoV (например, любую из последовательностей SEQ ID NO: 1- 84), например, в составе аденовирусного вектора в дозе от 10 мкг до 10 мг. Предпочтительно иммуноген представляет собой один или несколько полипептидов, кодируемых последовательностями SEQ ID NO: 44, 50, 56, 29, 30, 31, 37 или 38. Затем пациента можно обследовать на проявление симптомов инфекции 2019-nCoV, разрешение симптомов и/или выработку антител 2019-nCoV. При необходимости можно вводить вторую дозу или дополнительные дозы иммуногена.

Пример 4

Введение антител против 2019-nCoV субъекту-человеку с риском инфицирования 2019-nCoV

Субъекту-человеку, у которого выявлен риск заражения 2019-nCoV (например, из-за поездки в регион, где распространена инфекция 2019-nCoV (например, провинция Хубэй), или субъекту, страдающему от сопутствующих заболеваний (например, гипертония, диабет или сердечно-сосудистые заболевания)) можно вводить антитело против 2019-nCoV, которое связывается с эпитопом в структуре шиповидного полипептида (SEQ ID NO: 29) (например, антитело может вырабатываться против полипептидов с любой последовательностью из SEQ ID NO: 1-84) в дозе от 1 до 1000 мг в качестве профилактической терапии. Субъекту можно вводить антитело против 2019-nCoV в качестве профилактической терапии до или после контактирования с вирусом 2019-nCoV. Затем пациента можно обследовать на проявления симптомов инфекции 2019-nCoV или разрешения симптомов. При необходимости можно ввести вторую дозу или дополнительные дозы антитела против 2019-nCoV.

Пример 5

Введение антител против 2019-nCoV человеку-субъекту, у которого проявляются симптомы инфекции 2019-nCoV

Субъекту-человеку, у которого проявляются симптомы 2019-nCoV, можно ввести антитело против 2019-nCoV, которое связывается с эпитопом в последовательности шиповидного полипептида Spike (SEQ ID NO: 29) (например, антитело может быть получено против полипептидов с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-84) в дозе от 1 до 1000 мг. Субъект (например, человек, прежде всего человек с сопутствующими заболеваниями (например, гипертонией, диабетом или сердечно-сосудистым заболеванием)) мог недавно побывать в регионе, где распространена инфекция 2019-nCoV (например, провинция Хубэй). После постановки диагноза инфекции 2019-nCoV практикующим врачом субъекту можно вводить дозу антитела anti-2019-nCoV. Затем пациента можно обследовать для разрешения симптомов. При необходимости можно ввести вторую дозу или дополнительные дозы антитела anti-2019-nCoV.

Пример 6

Реактивность иммуногенов, кодируемых ДНК-вакцинами 2019-nCoV в отношении поликлональной антисыворотки против SARS

Для оценки реактивности иммуногенов, кодируемых ДНК-вакцинами 2019-nCoV в отношении антител против SARS, клетки трансфектировали плазмидами, содержащими шиповидный белок SS-Spike (SEQ ID NO: 121), SS-SdCT (SEQ ID NO: 122), SS-S.Ecto (SEQ ID NO: 123) и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (SEQ ID NO: 195), кодирующими иммуногены 2019-nCoV (SEQ ID NO: 29, 30, 31 и 56, соответственно). Клеточные лизаты и супернатанты отбирали из трансфектированных клеток и анализировали в восстанавливающих и денатурирующих условиях. Затем образцы анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием поликлональной антисыворотки anti-SARS (BEI Resources, NIAID, NIH, номер по каталогу: NR-10361), выделенной из морских свинок. Все исследованные ДНК-вакцины были способны продуцировать белки, которые обладали перекрёстной реактивностью с антителами anti-SARS, присутствующими в антисыворотке (фиг. 2). Шиповидный белок соответствует полосе с молекулярной массой приблизительно 200 кДа.

Пример 7

ДНК-вакцины 2019-nCoV способны продуцировать нейтрализующее антитело против шиповидного белка anti-Spike

ДНК-вакцины, содержащие SS-Spike (SEQ ID NO: 121), SS-SdCT (SEQ ID NO: 122), SS-S.Ecto (SEQ ID NO: 123), SS-S1-foldon (SEQ ID NO: 129), SS-RBD-foldon (SEQ ID NO: 130) и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (SEQ ID NO: 195), кодирующие иммуногены 2019-nCoV (SEQ ID NO: 29, 30, 31, 37, 38 и 56, соответственно), исследовали на их способность продуцировать ответ нейтрализующих антител. Самкам мышей Balb/c (возрастом 8-12 недель) вводили инъекцию 50 мкг внутримышечно (IM) одной из ДНК вакцин и вторую дозу вводили IM через 4 недели. Образцы сывороток вакцинированных мышей отбирали через 4 недели после вакцинации и анализировали методом ИФА на связывание с полноразмерным шиповидным белком (SEQ ID NO: 1) (фиг. 3) и S.Ecto-PP (SEQ ID NO: 19) (фиг. 4). Все исследованные ДНК-вакцины были способны индуцировать выработку антител, которые распознают полноразмерный шиповидный белок (SEQ ID NO: 1) и S.Ecto-PP (SEQ ID NO: 19) у вакцинированных мышей. ДНК-вакцина, кодирующая SS-S.Ecto-dF-PP-

foldon, вызывала исключительно высокий ответ антител по сравнению с другими исследованными ДНК-вакцинами.

Сыворотку мышей через 4 недели после вакцинации дополнительно анализировали на нейтрализующую активность. Нейтрализующую активность оценивали с использованием анализа нейтрализации псевдовирусов на основе люциферазы *in vitro*. В анализе нейтрализации использовали ядро ретровируса, псевдотипированное с помощью шиповидного белка 2019-nCoV (SEQ ID NO: 1). Инфекционность оценивали на клетках293, которые трансдуцировали ангиотензин конвертирующим ферментом 2 человека (ACE2), рецептором для 2019-nCoV, чтобы ускорить вход псевдовиркса. Значительную нейтрализующую способность наблюдали у мышей, вакцинированных ДНК вакцинами SS-S.Ecto, SS-RBD-foldon и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon. У мышей, вакцинированных ДНК-вакциной SS-S.Ecto-dF-PP-foldon, наблюдалась наиболее устойчмывя нейтрализующая способность (фиг. 5).

Пример 8

ДНК-вакцины 2019-nCoV способны вызывать защитный иммунный ответ против коронавирусной инфекции

Быстро распространяющаяся пандемия COVID-19 способствовала разработке безопасной, эффективной и пригодной к немедленному применению вакцины и сделало эту разработку важнейшим глобальным приоритетом (1-8). Однако понимание коррелятов иммунной защиты от 2019-nCoV в настоящее время очень ограничено. Такие знания необходимы для разработки вакцин против 2019-nCoV, а также других иммунотерапевтических вмешательств. В этом исследовании был сконструирован набор прототипов ДНК-вакцин, которые экспрессируют различные формы шиповидного S белка 2019-nCoV Spike, и была оценена их иммуногенность и защитная эффективность против заражения 2019-nCoV у макак-резус.

Способы

Животные и дизайн исследования

35 беспородных взрослых самцов и самок макак-резусов индийского происхождения (*Macaca mulatta*) в возрасте 6-12 лет рандомизировали в группы. Всех животных содержали в условиях Bioqual, Inc. (Роквилл, Мэриленд). Животным вводили ДНК-вакцины, экспрессирующие SS-Spike (N=4), SS-SdCT (N=4), SS-S.Ecto (N=4), S1 (N=4), SS-RBD-FOLDON (N=4), SS-S.Ecto-dF-PP-

foldon (N=5), и плацебо-контроли (N=10). Животным вводили 5 мг ДНК-вакцин в неделю 0 и в неделю 3. Через 6 недель животных заражали дозой $1,2x10^8$ вч ($1,1x10^4$) бляшкообразующих единиц (PFU) 2019-nCoV. Вирус вводили в дозе 1 мл интраназально (IN) (0,5 мл в каждую ноздрю) и 1 мл интратрахеально (IT). Все иммунологические и вирусологические анализы проводили слепым методом. Все исследования на животных проводили в соответствии со всеми соответствующими местными, государственными и федеральными нормами и были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных Bioqual (IACUC).

Образцы человека

27 де-идентифицированных образцов сыворотки крови людей, выздоравливающих от инфекции 2019-nCoV, из г. Бостон, Массачусетс, были получены от индивидуумов по крайней мере через 7 дней после задокументированного выздоровления с отрицательным мазком из носа. Все исследования на людях проводили в соответствии со всеми соответствующими местными, государственными и федеральными нормами и были одобрены Институциональным контрольным советом партнеров (IRB).

ДНК-вакцины

ДНК-вакцины конструировали на основе последовательности шиповидного S белка 2019-nCoV (Wuhan/WIV04/2019). Последовательности были оптимизированы по кодонам и синтезированы в коммерческом масштабе (Integrated DNA Technologies, NJ, США). Получали шесть версий шиповидного белка (полноразмерный SS-Spike; делеция цитоплазматического домена SS-SdCT; растворимый эктодомен SS-S.Ecto; S1 домен с меткой тримеризации SS-S1-фолдон; связывающийся с рецептором домен с меткой тримеризации SS-RBD-фолдон; растворимый эктодомен с делецией участка расщепления фурином, PP стабилизирующие мутации, метка тримеризации фолдона SS-S.Ecto-dF-PP-фолдон). Синтетические гены клонировали в экспрессионную плазмиду pcDNA3.1+ (Invitrogen, CA, США) и их включали в наборы гигапрепаратов, не содержащих эндотоксинов (Machery-Nagel, Дюрен, Германия). Все последовательности ДНК вакцины были подтверждены секвенированием ДНК по Сэнгеру.

Вестернблот

Флаконы T-25, засеянные клетками 293T при слиянии70-80%, временно трансфектировали экспрессионными плазмидами ДНК 2019-nCoV (10 мкг ДНК/конструкт) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen), и супернатанты и клеточные лизаты, собранные через 48 ч после трансфекции, отдельно смешивали с буферным раствором для образцов, предназначенных для ЭФ в восстанавливающих условиях (Pierce), нагревали в течение 5 мин при 95°C и анализировали методом ЭФ-ПААГ в ДСН на предварительно приготовленных 4-15% гелях (Bio-Rad). Белок переносили на поливинилидендифторидную мембрану (PVDF) с использованием системы для блоттинга iBlot dry blotting (Invitrogen), и блокирование мембраны проводили в течение ночи при 4°C в фосфатно-солевом буферном растворе Dulbecco T (D-PBST), содержащем 0,2% твин 20 (Sigma) (об./об.) и 5% (мас./об.) обезжиренного порошкообразного молока. После блокировки в течение ночи, PVDF мембрану инкубировали в течение 1 ч в растворе 3% молоко-DPBS-T, содержащем поликлональную (перекрестную) антисыворотку морских свинок anti-SARS коронавируса (BEI resources) в разбавлении 1:10000 в течение 1 ч. После указанной инкубации PVDF мембрану промывали 5 раз раствором DPBS-T, а затем инкубировали с вторичными антителами морских свинок, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) в разбавлении 1:30000 в растворе 3% молоко-DPBS-T (Jackson Immunoresearch). И наконец, PVDF мембрану снова промывали пять раз раствором 5% молоко-DPBS-T и анализировали в системе вестерблоттинга Amersham ECL Plus Western blotting (GE Healthcare).

Анализ вирусной РНК

Для мониторинга вирусной нагрузки использовали анализы ОТ-ПЦР, в основном как описано ранее (16). Краткое описание анализа: РНК экстрагировали с использованием реактивов QIAcube HT (Qiagen, Германия) и набора Cador pathogen HT из супернатанта бронхоальвеолярного лаважа (BAL) и мазков из носа. РНК подвергали обратной транскрипции с использованием суперскриптаVILO (Invitrogen) и анализировали в двух повторах в системах ПЦР в реальное время QuantStudio 6 и 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Вирусную нагрузку рассчитывали в виде копий вирусной РНК на мл или на мазок, при этом чувствительность анализа составляла 50 копий. Мишенью амплификации

являлся ген 2019-nCoV N (нуклеокапсид). Ниже перечислены праймеры и зонды для мишеней:

2019-nCoV_N1-F :5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3' (SEQ ID NO: 196)

2019-nCoV_N1-R: 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3' (SEQ ID NO: 197)

2019-nCoV_N1-P: 5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3' (SEQ ID NO: 198)

Анализ субгеномной иРНК

Ген 2019-nCoV E субгеномной иРНК (sgmPHK) анализировали методом ОТ-ПЦР с использованием аналогично ранее описанному подходу (*17*). Для построения стандартной кривой ген 2019-nCoV E sgmPHK клонировали в экспрессионную плазмиду pcDNA3.1; эту вставку подвергали транскрипции с использованием набора AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker (Cellscript) для получения РНК для стандартов. Перед анализом ОТ-ПЦР образцы, собранные от зараженных или стандартных животных, подвергали обратной транскрипции с использованием реактивов Superscript III VILO (Invitrogen) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Специализированная версия анализа экспрессии генов Taqman (ThermoFisher Scientific) была сконструирована с использованием последовательностей-мишеней гена E sgmPHK (*17*). Реакции проводили в системе QuantStudio 6 и 7 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems) согласно рекомендациям производителя. Стандартные кривые использовали для расчета содержания sgmPHK в копиях в мл или в мазке, чувствительность количественного анализа составляла 50 копий в мл или в мазке.

Анализ бляшкообразования (PFU)

Для анализа монослои слитых клеток Vero E6 готовили в 6-луночных планшетах. Для указанных образцов, собранных от зараженных животных, получали серийные разведения, переносили их в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 1,5 мл 0,5% среду yf основе метилцеллюлозы и планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение двух суток. Планшеты фиксировали при добавлении в каждую лунку 400 мкл охлажденного льдом метанола и инкубировали при -20°C в течение 30 мин. После фиксации метанол сливали и монослои клеток проявляли при добавлении в каждую лунку 600 мкл 0,23% кристаллического фиолетового в

течение 30 мин. После проявления кристаллический фиолетовый сливали и планшеты промывали один раз 600 мкл воды для визуализации и считывания планшетов.

ИФА

Краткое описание анализа

96-луночные планшеты покрывали при добавлении 1 мкг/мл раствора шиповидного S белка 2019-nCoV (Sino Biological) в буферном растворе 1X DPBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты промывали один раз буферным раствором для промывки (0,05% твин20 в 1 X DPBS) и блокировали при добавлении 350 мкл раствора казеина для блокирования в каждую лунку в течение 2-3 ч при комнатной температуре. После инкубации раствор для блокирования сливали и планшеты вытирали насухо. В лунки добавляли серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки, разбавленной в растворе казеина для блокирования, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед тремя дополнительными промывками и последующей инкубацией в течение 1 ч в разведении 1:1000 антител макак к IgG мыши HRP (программа Reagent NIH NHP) в темноте при комнатной температуре. Затем планшеты трижды промывали буферным раствором для промывки и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора для запуска реакции SERACARE® KPL TMB SureBlue Start, планшеты инкубировали при добавлении в каждую лунку 100 мкл раствора для остановки реакции SERACARE® KPL TMB Stop. Поглощение при 450 нм регистрировали с использованием ридера для микропланшет VERSAMAX™ или OMEGA®. Конечные титры ИФА определяли как самое высокое обратное разведение сыворотки, при котором поглощение составляет > 0,2. Представлены конечные титры log10.

Анализ нейтрализации псевдовируса

Псевдовирусы 2019-nCoV, экспрессирующие репортерный ген люциферазы, получали, как было описано ранее (*9*). Краткое описание анализа: пакующий конструкт psPAX2 (AIDS Resource and Reagent Program), плазмиду с репортерным геном люциферазы pLenti-CMV Puro-Luc (Addgene) и шиповидный белок, экспрессирующий pcDNA3.1-SARS CoV-2 SΔCT совместно трансфектировали в клетки HEK293T, содержащие фосфат кальция. Супернатанты, содержащие псевдовирус, собирали через 48 ч после

трансфекции, псевдотипированные вирусы очищали фильтрованием через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Для определения нейтрализующей активности антисывороток, взятых у вакцинированных животных, клетки HEK293T-hACE2 высеивали в 96-луночные планшеты для культивирования тканей с плотностью $1{,}75 \times 10^4$ клеток в лунке в течение ночи. Готовили двухкратные серийные разведения образцов инактивированной при нагревании сыворотки и смешивали их с 50 мкл псевдовируса. Перед добавлением в клетки HEK293T-hACE2 смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Через 48 ч после инфицирования клетки лизировали в условиях анализа люциферазы STEADY-GLO® Luciferase Assay (Promega) согласно рекомендациям производителя. Титры нейтрализации 2019-nCoV определяли как разведение образца, в котором наблюдается 50% снижение в относительных световых единицах RLU по сравнению со средним показанием в контрольных лунках с вирусом.

Анализ нейтрализации жизнеспособного вируса

Полноразмерный вирус 2019-nCoV на основе изолята Seattle Washington конструировали для экспрессии люциферазы и GFP и выделяли методом обратной генетики, как описано ранее (13, 14). Вирус титровали в клетках Vero E6 USAMRID для получения сигнала в единицах RLU, по меньшей мере, в 10 раз превышающего фон в контрольных лунках, содержащих только клетки. За день до анализа клетки Vero E6 USAMRID высевали по 20000 клеток в лунку в 96-луночные планшеты с прозрачным дном и черными стенками. Образцы сыворотки с нейтрализующими антителами анализировали при начальном разведении 1:40 и готовили 4-х кратные серийные разведения, получая 8 лунок с разведениями. Комплексы антитело-вирус инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 1 ч. После инкубации среду роста удаляли и разведения комплексов вирус-антитело добавляли к клеткам в двойных повторах. В каждый планшет для анализа нейтрализации вируса включали контрольные лунки «только-вирус» и лунки «только клетки». После инфицирования планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 48 ч. После инкубации в течение 48 ч клетки лизировали и определяли активность люциферазы в системе Nano-Glo Luciferase Assay (Promega) согласно рекомендациям производителя. Титры нейтрализации 2019-nCoV определяли как разведение образца, в котором

наблюдается 50% снижение в единицах RLU по сравнению со средним показанием в контрольных лунках.

Системная серология

Для функционального анализа образцов сыворотки использовали анализы на основе микросфер для количественной оценки антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), антителозависимого фагоцитоза нейтрофилов (ADNP) и антителозависимого отложения комплемента (ADCD), как описано ранее (15). Белковые антигены включали связывающийся с рецептором домен (RBD, любезно предоставлен Aaron Schmidt, Ragon Institute и MassCPR), стабилизированный до слияния эктодомен шиповидного белка (S, любезно предоставлен Bing Chen, Children's Hospital и MassCPR) и нуклеокапсид (N, Sino, Biological). Флуоресцентные микросферы на основе стрептавидина (Thermo Fisher) конденсировали с биотинилированными RBD, N и S и инкубировали с разбавленной сывороткой (ADCP и ADNP 1:100, ADCD 1:10). Для анализа ADCP к иммунным комплексам добавляли THP и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. Для анализа ADNP первичные нейтрофилы выделяли из цельной крови с использованием буферного раствора для лизиса, содержащего хлорид аммония и калия (ACK). После инкубации в течение 1 ч при 37°C нейтрофилы окрашивали детектирующим антителом анти-CD66b PacBlue (Biolegend). Для анализа ADCD лиофилизированный комплемент морской свинки (Cedarlane) ресуспендировали согласно инструкциям производителя и разводили в буферном растворе желатин-веронал, содержащем кальций и магний (Boston BioProducts). После инкубации, C3 детектировали с использованием конъюгированной с флуресцеином фракции козьих антител IgG к комплементу морских свинок C3 (Mpbio). Для детекции антителозависимой активности NK-клеток использовали подход на основе ИФА. Краткое описание метода: планшеты покрывали раствором антигена 3 мкг/мл (как описано ранее), образцы добавляли в разбавлении 1:50 и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. За день до анализа NK-клетки выделяли методом RosetteSep (Stem Cell Technologies) из здоровых лейкоцитарных пленок и выдерживали в течение ночи в растворе IL-15 1 нг/мл (Stemcell). NK-клетки инкубировали с иммунными комплексами в течение 5 ч при 37°C в окрашивающем коктейле, содержащем CD107a PE-Cy5 (BD), стоп-препарат Гольджи (BD) и брефельдин A (BFA, Sigma Aldrich). После инкубации

NK-клеток их фиксировали (Perm A, Life Tech) и окрашивали во время фиксации с использованием поверхностных маркеров анти-CD16 APC-Cy7 (BD), анти-CD56 PE-Cy7 (BD) и анти-CD3 PacBlue (BD). После пермеабилизации с использованием антител Perm B (Life Tech), антитела anti-IFN-gamma FITC (BD) и anti-MIP-1β PE (BD) использовали для внутриклеточного окрашивания. Все анализы были получены с помощью проточной цитометрии с использованием системы iQue (Intellicyt) и робота S-Lab (PAA). Для анализа ADCP события гейтировали по грануло-позитивным клеткам, тогда как нейтрофилы определяли как CD66b-позитивные последующим гейтированием по грануло-позитивным нейтрофилам. Показатель фагоцитоза рассчитывали для анализов ADCP и ADNP по формуле

(грануло-позитивные клетки в процентах)x(MFI грануло-позитивные клетки)/10000.

ADCD регистрировали в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI) отложения C3. NK-клетки определяли в виде CD3-, CD16+ и CD56+. Данные представлены как процентное содержание CD107a-, MIP-1-alpha- или IFN- γ-позитивных клеток. Корреляции Пирсона и Спирмена использовали для изучения линейных и нелинейных взаимосвязей между характеристиками антител и $\log_{10}$ пиковых копий sgmPHK/мл в образцах BAL, соответственно. Поправку Бенджамини-Хохберга использовали для коррекции множественных сравнений. Кроме того, корреляции Пирсона использовали для проверки всех парных корреляций характеристик антител. Для определения оптимальных характеристик, которые коррелируют с защитой, были использованы частичная регрессия дробных наименьших квадратов (PLSR) и регрессия «случайного леса» (RFR) с использованием рекурсивного исключения характеристик. Во-первых, все изотипы/подклассы и данные связывания с Fc-рецептором были преобразованы в формат $\log_{10}$. PCA (анализ основных компонентов) проводили с использованием пакета R «ropls» для сравнения многомерных профилей. Анализ PLSR проводили с использованием пакета R «ropls», а анализ «случайный лес» был выполнен с использованием пакета R «randomForest». Каждая модель (то есть каждый набор характеристик) соответствовала результатам 10 повторений 5-кратной перекрестной проверки. На каждом этапе исключения характеристик для PLSR удалялась характеристика, которая имела самую низкую среднюю (по кратности) важность независимой переменной в проекции (VIP), а для RFR

характеристика с наименьшей средней (по кратности) значимости, измеренной как узловая примесь. Были протестированы все возможные комбинации двух характеристик.

Анализ ELISPOT

Планшеты ELISPOT покрывали мышиными моноклональными антителами против человеческого IFN-γ фирмы BD Pharmingen в концентрации 5 мкг/лунка в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали буферным раствором DPBS, содержащим 0,25% твин20, и блокировали средой R10 (RPMI, содержащая 11% FBS (фетальная сыворотка быка) и 1,1% пенициллин-стрептомицин) в течение 1 ч при 37°C. Пептидные фракции Spike 1 и Spike 2 готовили в концентрации 2 мкг/лунка и в каждую лунку добавляли 200000 клеток/лунка. Пептиды и клетки инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C. Все этапы после этой инкубации выполняли при комнатной температуре. Планшеты промывали буферным раствором для анализатора-култера и инкубировали в течение 2 ч в присутствии биотинилированных кроличьих поликлональных антител против IFN-γ человека фирмы U-Cytech (1 мкг/мл). Планшеты промывали второй раз и инкубировали в течение 2 ч в присутствии антител стрептавидин-щелочная фосфатаза фирмы Southern Biotechnology (1 мкг/мл). После окончательной промывки добавляли раствор субстрата, соли нитор-синий тетразолий хлорид/5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат пара-толудина (хромаген NBT/BCIP) в течение 7 мин. Хромоген удаляли, планшеты промывали водой и сушили в темном месте в течение 24 ч. Планшеты сканировали и считывали на анализаторе Immunospot фирмы Cellular Technologies Limited.

Анализ окрашивания внутриклеточных цитокинов

10^6 клеток PBMC в лунке ресуспендировали в 100 мкл среды R10, дополненной моноклональным антителом CD49d (1 мкг/мл). Каждый образец оценивали по сравнению с контролем плацебо (100 мкл R10 плюс 0,5% ДМСО, фоновый контроль), фракциями пептидов Spike 1 и Spike 2 (2 мкг/мл) или 10 пг/мл ацетата форболмиристата (PMA) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich) (100 мкл, положительный контроль) и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 0,25 мкл реагента GolgiStop и 0,25 мкл реагента GolgiPlug в 50 мкл R10 и инкубировали при 37°C в течение 8 ч, а затем выдерживали при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки дважды промывали раствором DPBS, окрашивали красителем из набора Near IR live/dead

в течение 10 мин и затем проявляли антителами mAb с предварительно определенным титром против CD279 (клон EH12.1, BB700), CD38 (клон OKT10, PE), CD28 (клон 28.2, PE CY5), CD4 (клон L200, BV510), CD45 (клон D058-1283, BUV615), CD95 (клон DX2, BUV737), CD8 (клон SK1, BUV805), в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали буферным раствором 2% FBS/DPBS и инкубировали в течение 15 мин в присутствии 200 мкл раствора для фиксации/пермеабилизации BD CytoFix/CytoPerm. Клетки промывали дважды буферным раствором 1X Perm Wash (BD Perm/WashTM 10X из набора CytoFix/CytoPerm для фиксации/пермеабилизации, разбавленным водой MilliQ и стерилизованным при пропускании через фильтр с размером пор 0,22 мкм), и проявляли внутриклеточным методом с использованием антител mAb против Ki67 (клон B56, FITC), CD69 (клон TP1.55.3, ECD), IL10 (клон JES3-9D7, PE CY7), IL13 (клон JES10-5A2, BV421), TNF-α (клон Mab11, BV650), IL4 (клон MP4-25D2, BV711), IFN-γ (клон B27; BUV395), IL2 (клон MQ1-17H12, APC), CD3 (клон SP34.2, Alexa 700), в течение 30 мин. Клетки дважды промывали буферным раствором 1X Perm Wash и фиксировали 250 мкл свежеприготовленного 1,5% формальдегида. Фиксированные клетки переносили в 96-луночный планшет с круглым дном и анализировали в системе BD FACSymphonyTM.

Статистический анализ

Анализ вирусологических и иммунологических данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.4.2 (программное обеспечение GraphPad). Сравнение данных между группами проводили с помощью двусторонних критериев Манна-Уитни. Корреляции оценивали с помощью двусторонних тестов ранговой корреляции Спирмена. Значение P менее 0,05 считалось значимым.

Полученные результаты

Конструирование и иммуногенность ДНК-вакцин

Были получены ДНК-вакцины, экспрессирующие шесть вариантов белка S 2019-nCoV: полноразмерный шиповидный белок (SS-Spike), делеция цитоплазматического хвоста (SS-SdCT) (9), делеция трансмембранного домена и цитоплазматический хвост, отражающий растворимый эктодомен (SS-S.Ecto) (9), домен S1 с меткой тримеризации фолдона (SS-S1-foldon), связывающийся с рецептором домен с меткой тримеризации фолдона (SS-RBD-foldon) и

стабилизированный до слияния растворимый эктодомен с делецией сайта расщепления фурином, две мутации пролина и метка тримеризации фолдона (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) (10-12) (фиг. 1). Анализ вестерн-блоттингом подтвердил экспрессию в клеточных лизатах конструктов S, SS-SdCT, SS-S.Ecto и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon, а также в культуральных супернатантах для растворимого SS-S.Ecto и SS-конструктов S.Ecto-dF-PP-foldon (фиг. 6). Протеолитическое расщепление секретируемого белка наблюдалось для SS-S.Ecto, но не для SS-S.Ecto-dF-PP-foldon, предположительно из-за мутации сайта расщепления фурином в белке SS-S.Ecto-dF-PP-foldon.

35 взрослых макак-резус возрастом 6-12 лет иммунизировали ДНК-вакцинами в следующих группах: SS-Spike (N=4), SS-SdCT (N=4), SS-S.Ecto (N=4), S1 (N = 4), SS-RBD-FOLDON (N = 4), SS-S.Ecto-dF-PP-foldon (N = 5) и контроль плацебо (N = 10). Животным вводили 5 мг ДНК-вакцины на неделе 0 и неделе 3. После бустерной иммунизации через 5 недель S-специфические связывающие антитела выявляли методом ИФА (фиг. 6A) и нейтрализующие антитела (NAb) с использованием как анализа нейтрализации псевдовируса (9), так и нейтрализующих антител. (фиг. 6B) и методом нейтрализации жизнеспособного вируса (13, 14) (фиг. 6C). У двух животных на исходном уровне методом ИФА были выявлены связывающие антитела, что можно объяснить перекрестной реактивностью с другими нативными коронавирусами приматов. Титры NAb, измеренные с помощью анализа нейтрализации псевдовируса, коррелировали с титрами NAb, измеренными с помощью анализа нейтрализации жизнеспособного вируса ($P<0,0001$, $R=0,8052$, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена, фиг. 10). Более того титры Nab у вакцинированных макак (средний титр 74, средний титр в группах S и SS-SdCT 170) сопоставим по величине с титрами NAb в когорте 9 выздоравливающих макак (средний титр 106) и в когорте 27 выздоравливающих людей (средний титр 93), которые выздоровели от инфекции 2019-nCoV (фиг. 6D).

S-специфичные и RBD-специфичные антитела у вакцинированных макак включали различные подклассы и эффекторные функции, включая антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антителозависимое отложение комплемента (ADCD), антителозависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP) и антителозависимая активация NK-клеток (секреция IFN-γ, дегрануляция CD107a и экспрессия MIP-1β) (15) (фиг. 6E). Тенденция к более

высокому ответу ADCD наблюдалась в группах S и SS-SdCT, в то время как более высокая активация NK клеток наблюдалась в группах NK SS-RBD-FOLDON и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon. По данным анализа основных компонентов функциональных и биофизических харктеристик антител было выявлено перекрывание различных вакцинированных групп с более отчетливыми профилями в группах S и RBD (фиг. 6E).

Клеточные иммунные ответы на фракции S-пептидов также наблюдались у большинства вакцинированных животных с помощью анализов IFN-γ ELISPOT через 5 недель (фиг. 7A). Анализы внутриклеточного окрашивания цитокинов свидетельствовали об индукции S-специфических CD4+ и CD8+ T-клеточных ответов, при этом индукция более низких ответов наблюдалась в присутствии более коротких иммуногенов SS-S1-foldon и SS-RBD-Foldon (фиг. 7B).

Протективная эффективность от заражения вирусом 2019-nCoV

Через 6 недель, то есть через 3 недели после бустерной вакцинации всех животных заражали вирусом 2019-nCoV в дозе $1,2x10^8$ вч ($1,1x10^4$ PFU) 2019-nCoV, при введении 1 мл интраназальным способом (IN) и 1 мл интратрахеальным способом (IT). После заражения оценивали уровни вирусной РНК методом ОТ-ПЦР (*16*) в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) имазках из носа (NS). Вирусная РНК в плазме не детектировалась, и у животных проявлялись только легкие клинические симптомы. Высокие уровни вирусной РНК наблюдались в плацебо-контрольных образцах со средним пиком 6,46 (диапазон 4,81-7,99) log_{10} копий РНК/мл в образцах BAL и средним пиком 6,82 (диапазон 5,96-7,96) log_{10} копий РНК/мазок в образцах NS (фиг. 11). Более низкие уровни вирусной РНК наблюдались в вакцинированных группах (фиг. 12, фиг. 13), включая снижение 1,92 и 2,16 log_{10} среднего пика вирусной РНК в образцах BAL и NS, соответственно, у животных, вакцинированных SS-Spike, по сравнению с плацебо-контролем (P=0,02 и P=0,04, двусторонний критерий Манна-Уитни) (фиг. 14). Анализы вирусной РНК были подтверждены анализами PFU (бляшкообразования).

Предполагается, что значительная часть вирусной РНК в образцах BAL и NS после контрольного заражения представляет собой вводимый контрольный вирус, и таким образом также оценивали уровни субгеномной иРНК (sgmРНК), которые, как предполагается, отражают клеточные промежуточные компоненты вирусной репликации, которые не упакованы в вирионы и, таким образом,

предполагаемый реплицирующийся вирус в клетках (17). Высокие уровни sgmPHK наблюдались в образцах плацебо-контроль со средним пиком 5,35 (диапазон 3,97-6,95) log_{10} копий sgmPHK/мл в в образцах BAL и средним пиком 6,40 (диапазон 4,91-7,01) log10 копий sgmPHK/мазок в образцах NS (фиг. 8A). Значительно более низкие уровни sgmPHK наблюдались в вакцинированных группах (фиг. 8B, 8C), включая снижения >3,1 и >3,7 log_{10} среднего пика sgmRNA в BAL и NS, соответственно, у животных, вакцинированных SS-Spike, по сравнению с плацебо-контролем (P =0,03 и P=0,01, двусторонний критерий Манна-Уитни) (фиг. 8D). Сниженные уровни sgmRNA также наблюдались в других вакцинированных группах, включая SS-SdCT, SS-S1-foldon, SS-RBD-Foldon и SS-S.Ecto-dF-PP-foldon, хотя более низкая защита наблюдалась в группе SS-S.Ecto, подтверждающая важность стабилизации эктодомена перед слиянием, как сообщалось ранее (12). В общей сложности у 8 из 25 вакцинированных животных не обнаружен детектируемый уровень sgmPHK в образцах BAL и NS в любой момент времени после заражения.

Иммунный ответ коррелирует с защитой

Вариабельность защитной эффективности в этом исследовании способствовала анализу иммунных коррелятов защиты. Через 5 недель наблюдалась обратная корреляция титра log_{10} антител псевдовируса NAb с пиковыми уровнями log_{10} sgmPHK как в образцах BAL (P<0,0001, R=-0,6877, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена), так и в образцах NS (P=0,0199, R=-0,4162) (фиг. 9A). Через 5 недель точно также наблюдалась обратная корреляция log_{10} титра антител жизнеспособного вируса NAb с пиковыми уровнями log10 sgmPHK как в образцах BAL (P<0,0001, R=-0,7702), так и в образцах NS (P=0,1006, R=-0,3360) (фиг. 9B). Эти данные свидетельствуют о том, что титры NAb в сыворотке, вызванные вакциной, могут быть надежными иммунными коррелятами защиты от заражения 2019-nCoV. Было высказано предположение, что корреляции более устойчивы с вирусными нагрузками в BAL по сравнению с вирусными нагрузками в образцах NS из-за внутренней изменчивости сбора мазков. Через 5 недель также наблюдалась обратная корреляция титра log_{10} по данным ИФА с пиковыми уровнями log_{10} sgmPHK в образцах BAL (P=0,0041, R=-0,4733) (фиг. 15). Вызванные вакциной ответы при окрашивании ELISPOT (фиг. 16), ответы CD4+ ICS (фиг. 17) и ответы CD8+ ICS (фиг. 18) не коррелируют с защитой.

Затем исследовали потенциальный вклад других эффекторных функций антител в иммунные корреляты защиты. Наряду с титрами NAb, наблюдалась обратная корреляция S- и RBD-специфических ответов ADCD с пиковыми уровнями log_{10} sgmPHK в образцах BAL (фиг. 9C, верхняя панель). Затем были использованы два ортогональных несмещенных подхода машинного обучения для определения минимальных комбинированных коррелятов защиты. С использованием нелинейного анализа случайного леса и линейного частичного регрессионного анализа методом наименьших квадратов, было установлено, что использование двух характеристик улучшило корреляции с защитой, такие как RBD-специфическое связывание FcγR2a-1 с ответами ADCD или титры NAb с RBD-специфическими ответами IgG2 (фиг. 9C, нижняя левая панель). Кроме того, наблюдается корреляция титров NAb коррелировали с большинством эффекторных функций антител, за исключением опосредованной антителами активации NK-клеток (фиг. 9C, нижняя правая панель). В совокупности эти данные указывают на основную роль NAb в защите от 2019-nCoV, поддерживаемую эффекторными функциями врожденного иммунитета, такими как ADCD.

Анамнестические иммунные ответы после заражения

У всех животных были выявлены анамнестические гуморальные и клеточные иммунные ответы после заражения, включая повышенные титры по данным ИФА (фиг. 19), титры NAb псевдовируса (фиг. 20), титры NAb жизнеспособного вируса (фиг. 21) и ответы IFN-γ при окрашивании ELISPOT (фиг. 22) в день 14 после заражения. Эти данные свидетельствуют о том, что защита вакцины не обеспечивала полного подавления инфекции, в том числе у 8 из 25 животных, у которых не было детектируемой sgmPHK в образцах BAL и NS в любой момент времени после заражения, и скорее всего, была опосредована быстрым вирусологическим контролем после заражения.

Обсуждение результатов

Для прекращения глобальной пандемии COVID-19 может потребоваться безопасная и эффективная вакцина против 2019-nCoV. Несколько вакцин-кандидатов уже проходят клинические испытания, а многие другие находятся в доклинической разработке. Однако в настоящее время очень мало известно об иммунных коррелятах защиты и защитной эффективности вакцин-кандидатов 2019-nCoV на животных моделях. В этом исследовании была получена серия

прототипов ДНК-вакцин, экспрессирующих различные S-иммуногены, и была оценена защитная эффективность против интраназального и интратрахеального заражения 2019-nCoV у макак резус. Нами было установлено, что при вакцинировании животных, иммунизированных S белком, наблюдается устойчивая защита со значительным снижением средней вирусной нагрузки >3,1 и >3,7 $\log_{10}$ в образцах BAL и NS, соответственно, по сравнению с плацебо-контролем. Защита не обеспечивала полного подавления инфекции, а скорее опосредована быстрым иммунологическим контролем после заражения.

Наши данные дополняют предыдущие исследования защитного действия вакцин от SARS и MERS у мышей, хорьков и макак (9, 18-21). Также были проведены клинические исследования фазы 1 вакцин-кандидатов против SARS и MERS (22), но эффективность этих вакцин на людях не исследовали. Полученные авторами настоящей заявки данные свидетельствовали о возможности защиты 2019-nCoV у макак резус. Резкое снижение репликации вируса наблюдалось в верхних и нижних дыхательных путях. Оптимальная защита достигалась при использовании полноразмерного S-иммуногена, а сниженная защита наблюдалась при использовании растворимых конструктов и более коротких фрагментов. Однако в определенных условиях (например, для разных популяций пациентов) могут быть полезны более короткие иммуногены.

Для решения важных вопросов необходимы дальнейшие исследования устойчивости защитного иммунитета и оптимальных вакцинных платформ для вакцины против 2019-nCoV для людей. Хотя данные ограничены ДНК-вакцинами, результаты могут быть распространены и на другие генные вакцины, включая РНК-вакцины и вакцины на основе рекомбинантных векторов. Дальнейшие исследования также потребуют решения вопроса об усилении респираторного заболевания, которое может быть результатом антителозависимого усиления (23, 24). При использовании неоптимальных вакцинных конструктов, которые не защищали, усиленного клинического течения заболевания не наблюдалось.

Титры NAb в сыворотке, измеренные двумя независимыми методами анализами (нейтрализация псевдовируса и нейтрализация жизнеспособного вируса), были идентифицированы как надежный коррелят защиты в этом исследовании. Если такая корреляция окажется поддающейся обобщению в ходе многочисленных исследований вакцин как в условиях программы NHP, так и на

людях, то это станет пригодным ориентиром для клинической разработки вакцин против 2019-nCoV. Эффекторные функции врожденного иммунитета, такие как ADCD, также могут внести вклад в эффективность защиты.

Таким образом, была продемонстрирована вакцинная защита от заражения 2019-nCoV у макак-резус с использованием серии прототипов ДНК-вакцин, и титры NAb в сыворотке были идентифицированы как коррелят защиты в этой модели. Эту корреляцию следует дополнительно изучить в нескольких форматах, но в случае подтверждения она может оказаться полезной в качестве эталона для тестирования вакцин против 2019-nCoV на людях.

Список литературы

1. F. Wu *et al.*, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265-269 (2020).

2. P. Zhou *et al.*, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270-273 (2020).

3. M. L. Holshue *et al.*, First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med* 382, 929-936 (2020).

4. Q. Li *et al.*, Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*, (2020).

5. N. Zhu *et al.*, A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727-733 (2020).

6. N. Chen *et al.*, Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507-513 (2020).

7. C. Huang *et al.*, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395, 497-506 (2020).

8. J. F. Chan *et al.*, A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514-523 (2020).

9. Z. Y. Yang *et al.*, A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 428, 561-564 (2004).

10. R. N. Kirchdoerfer *et al.*, Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 531, 118-121 (2016).

11. J. Pallesen *et al.*, Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E7348-E7357 (2017).

12. D. Wrapp *et al.*, Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 367, 1260-1263 (2020).

13. T. Scobey *et al.*, Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16157-16162 (2013).

14. B. Yount *et al.*, Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12995-13000 (2003).

15. A. W. Chung *et al.*, Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. *Cell* 163, 988-998 (2015).

16. P. Abbink *et al.*, Lack of therapeutic efficacy of an antibody to alpha4beta7 in SIVmac251-infected rhesus macaques. *Science* 365, 1029-1033 (2019).

17. R. Wolfel *et al.*, Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, (2020).

18. R. Liu *et al.*, A recombinant VSV-vectored MERS-CoV vaccine induces neutralizing antibody and T cell responses in rhesus monkeys after single dose immunization. *Antiviral research* 150, 30-38 (2018).

19. K. Muthumani *et al.*, A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 7, 301ra132 (2015).

20. G. P. Kobinger *et al.*, Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine* 25, 5220-5231 (2007).

21. J. Zhou *et al.*, Immunogenicity, safety, and protective efficacy of an inactivated SARS-associated coronavirus vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine* 23, 3202-3209 (2005).

22. J. E. Martin *et al.*, A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine* 26, 6338-6343 (2008).

23. C. T. Tseng *et al.*, Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS ONE* 7, e35421 (2012).

24. L. Liu *et al.*, Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI insight* 4, (2019).

Пример 9

Естественный иммунный ответ на коронавирусную инфекцию

Взрывное распространение пандемии COVID-19 сделало разработку контрмер неотложным глобальным приоритетом (1-8). Однако понимание иммунопатогенеза 2019-nCoV в настоящее время очень ограничено. Прежде всего, в настоящее время неизвестно, вызывает ли инфекция 2019-nCoV естественный иммунитет, защищающий человека от повторного заражения. Такая информация имеет решающее значение для стратегий вакцинации, эпидемиологического моделирования и подходов общественного здравоохранения. Чтобы изучить этот вопрос, была разработана модель инфекции 2019-nCoV у макак резус, и были оценены вирусологические, иммунологические и патологические характеристика инфекции, а также защитный иммунитет от повторного заражения.

Методы

Животные и схема испытаний

13 беспородных взрослых самцов и самок макак резус индийского происхождения (*Macaca mulatta*) в возрасте 6-12 лет были рандомизированы по группам. Все животные содержались в условиях Bioqual, Inc. (Роквилл, Мэриленд). В первом исследовании 9 животных заражали 2019-nCoV в общей дозе: $1{,}1x10^6$ бляшкообразующих единиц (PFU) (группа 1, N=3), $1{,}1x10^5$ PFU (группа 2, N=3) или $1{,}1\ x10^4$ PFU (группа 3, N=3). Эти дозы вводили в объеме 1 мл интраназальным (IN) способом (по 0,5 мл в каждую ноздрю) и 1 мл интратрахеальным (IT) способом. Через 35 дней после заражения животных повторно заражали 2019-nCoV в дозах, соответствующих тем, которые использовали при первоначальном заражении. Полуколичественная клиническая оценка включала оценку слепым методом ветеринарным персоналом клинических проявлений, одышки, лежачего положения и ответной реакции (10 баллов на категорию в диапазоне от 0 до 40; легкая форма заболевания <12; умеренная форма заболевания 13-20; тяжелая форма заболевания> 20). Во

втором исследовании 4 макак резус заражали в общей дозе $1,1x10^5$ PFU 2019-nCoV, повторно введенная IN и IT способами. Макак подвергали вскрытию либо в день 2 (N=2), либо в день 4 день (N=2) после заражения. Все иммунологические и вирусологические анализы проводили слепым методом. Все исследования на животных проводили в соответствии со всеми соответствующими местными, государственными и федеральными нормами и были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных в условиях Bioqual (IACUC).

Вирусный посевной материал 2019-nCoV. Материал 2019-nCoV USA-WA1/2020 был дополнен из ресурса BEI (NR-52281, лот № 70033175, любезно предоставлен Natalie Thornburg, Centers for Disease Control and Prevention) в клетках Vero E6, и в день 5 собирали материал вирусного заражения после инфицировании при 90% цитопатическом эффекте (CPE). Секвенирование полного генома выявило 100% идентичность с последовательностью исходного вируса (GenBank MN985325.1, любезно предоставлен David O'Connor, Shelby O'Connor, University of Wisconsin).

Анализ вирусной РНК.

Вирусную РНК количественно определяли по данным анализа ОТ-ПЦР, направленного на нуклеокапсид 2019-nCoV. Краткое описание метода: РНК выделяли из образцов, собранных у макак (например, супернатант бронхоальвеолярного лаважа (BAL)) либо до заражения, либо в указанные моменты времени после заражения, используя спин-набор вируса Qiagen MinElute или по данным анализа RNA-STAT 60 (Tel-test B), и ресуспендировали в воде, не содержащей РНКазу. Выделенную РНК наносили в планшет в двух повторах и амплифицировали в детекторе секвенатора Applied Biosystems 7500 Sequence, используя следующую программу: i) 48°C в течение 30 мин, ii) 95°C в течение 10 мин и iii) 40 циклов 95°C в течение 15 с и 1 мин при 55°C. В результате анализа выявлен практический диапазон $5x10^1$ - $5x10^8$ копий РНК в мл для жидкостей или на грамм для тканей. Последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров и последовательность зонда (P) представлены ниже:
2019-nCoV_N1-F:5'-GACCCCAAAATCAGCGAAAT-3' (SEQ ID NO: 196)
2019-nCoV_N1-R: 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3' (SEQ ID NO: 197)
2019-nCoV_N1-P: 5'-FAM-ACCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3' (SEQ ID NO: 198)

Анализ субгеномной иРНК

Субгеномную мРНК гена E 2019-nCoV (sgmPHK) оценивали методом ОТ-ПЦР с использованием подхода, как описано ранее ранее (9). Для построения стандартной кривой sgmPHK гена E 2019-nCoV клонировали в экспрессионную плазмиду pcDNA3.1. Эту вставку транскрибировали с использованием набора для создания сообщений AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker (Cellscript) для получения РНК для стандартов. Перед проведением ОТ-ПЦР образцы, взятые у зараженных животных, или стандарты подвергали обратной транскрипции с использованием системы Superscript III VILO (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Был разработан специальный анализ экспрессии генов Taqman (ThermoFisher Scientific) с использованием последовательностей, направленных на sgmPHK гена E (9). Реакции проводили в системах ПЦР в реальное время QuantStudio 6 и 7 Flex (Applied Biosystems) в соответствии со спецификациями производителя. Стандартные кривые использовали для расчета sgmPHK в копиях на мл или на мазок; чувствительность количественного анализа составляла 50 копий на мл или на мазок.

Анализ бляшкообразования PFU

Для анализа бляшкообразования готовили конфлюэнтные монослои клеток Vero E6 в 6-луночных планшетах. Готовили серийные разбавления указанных образцов, взятых у зараженных животных, добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 1,5 мл 0,5% метилцеллюлозной среды и планшеты инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO_2 в течение 2 дней. Планшеты фиксировали, добавляя в лунку 400 мкл охлажденного на льду метанола, и инкубировали при -20°C в течение 30 мин. После фиксации метанол сливали и монослои клеток окрашивали при добавлении в лунку 600 мкл 0,23% кристаллического фиолетового в течение 30 мин. После окрашивания кристаллический фиолетовый удаляли, а планшеты один раз промывали 600 мкл воды для визуализации и подсчета бляшек.

ИФА

Краткое описание метода. 96-луночные планшеты покрывали раствором 1 мкг/мл шиповидного S белка 2019-nCoV Spike (Sino Biological) в буферном растворе 1X DPBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты один раз промывали буферным раствором для промывки (0,05%

твин20 в 1xDPBS) и блокировали, добавляя в лунку 350 мкл блокирующего казеинового раствора, и инкубировали в течение 2-3 ч при комнатной температуре. После инкубации блокирующий раствор удаляли, а планшеты вытирали насухо. В лунки добавляли серийные разведения инактивированной при нагревании сыворотки, разбавленной в казеиновом блокирующем растворе, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед тремя дополнительными промывками и последующей инкубацией в течение 1 ч в присутствии конъюгата антител против IgG макак HRP (NIH NHP) в разведении 1:1000 (программа NIH NHP Reagent Program) в темноте при комнатной температуре. Затем планшеты промывали три раза буферным раствором для промывки и в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора для запуска реакции SERACARE® KPL TMB SureBlue Start, затем планшет выдерживали при добавлении в каждую лунку 100 мкл раствора для остановки реакции SERACARE® KPL TMB Stop. Поглощение при 450 нм регистрировали с использованием ридера для микропланшет VERSAMAX™ или OMEGA®. Конечные титры ИФА определяли как самое высокое обратное разведение сыворотки, при котором поглощение составляет> 0,2. Представлены конечные титры log10.

Анализ нейтрализации псевдовируса

Псевдовирус 2019-nCoV, экспрессирующий репортерный ген люциферазы, были созданы с использованием подхода, аналогичного описанному ранее (10). Краткое описание метода. Пакующий конструкт psPAX2 (AIDS Resource и Reagent Program), репортерную плазмиду люциферазы pLenti-CMV Puro-Luc (Addgene) и pcDNA3.1-SARS CoV-2 SΔCT, экспрессирующий шиповидный белок, совместно трансфектировали в клетки HEK293T в присутствии фосфата кальция. Супернатанты, содержащие вирусы псевдотипа, собирали через 48 ч после трансфектирования. Вирусы псевдотипа очищали фильтрованием через фильтр 0,45 мкм. Для определения нейтрализующей активности антисывороток вакцинированных животных, клетки HEK293T-hACE2 высеивали в 96-луночные планшеты для культур тканей при плотности 1,75 x 10^4 клеток/лунка в течение ночи. Затем готовили двухкратные разведения образцов инактивированной при нагревании сыворотки и смешивали с 50 мкл псевдовируса. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч перед добавлением в клетки HEK293T-hACE2. Через 48 ч после заражения клетки лизировали в смеси для анализа люциферазы STEADY-

GLO® Luciferase Assay (Promega) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Титры нейтрализации 2019-nCoV определяли как разведение образца, при котором наблюдается снижение на 50% в единицах RLU по сравнению со средней величиной в лунках с контрольным вирусом.

Анализ нейтрализации жизнеспособного вируса

Полноразмерный вирус 2019-nCoV, основанный на изоляте из Сиэтла, штат Вашингтон, был сконструирован для экспрессии люциферазы и GFP и был выделен методом обратной генетики и описан ранее (11, 12). Вирус титровали в клетках Vero E6 USAMRID для получения сигнала относительных световых единиц (RLU), по меньшей мере, в 10 раз превышающего контрольный фон клеток. Клетки Vero E6 USAMRID высевали по 20000 клеток на лунку накануне в 96-луночные планшеты с прозрачным дном и черными стенками. Образцы сыворотки с нейтрализующими антителами тестировали в начальном разведении 1:40 и готовили 4-х кратные серийные разбавления, получая восемь точек разведения. Комплексы антитело-вирус инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 1 ч. После инкубации среду для роста удаляли и к клеткам добавляли разведения комплексов вирус-антитело в двух повторах. В каждый планшет для анализа нейтрализации включали контроли «только вирус» и контроли «только клетки». После заражения планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 48 ч. После инкубации в течение 48 ч клетки лизировали и активность люциферазы измеряли в системе анализа люциферазы Nano-Glo (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. Титры нейтрализации 2019-nCoV определяли как разведение образца, при котором наблюдалось 50% снижение RLU по сравнению со средним значением контрольных лунок с вирусом.

Системная серология

В ходе функционального анализа образцов плазмы были использованы анализы на основе микросфер для количественной оценки антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP), антителозависимого фагоцитоза нейтрофилов (ADNP) и антителозависимого отложения комплемента (ADCD), как описано ранее (*13*). Белковые антигены включали связывающийся с рецептором домен (RBD, любезно предоставленный Aaron Schmidt, Ragon Institute and MassCPR), стабилизированный перед слиянием эктодомен шиповидного белка (S белок, любезно предоставленный Bing Chen, Children's Hospital and MassCPR), и

нуклеокапсид (N, Sino Biological). Флуоресцентные стрептавидиновые микросферы (Thermo Fisher) конденсировали с биотинилированными RBD, N и S белком, и инкубировали в смеси с разбавленной плазмой (ADCP и ADNP 1:100, ADCD 1:10). В случае ADCP, к иммунным комплексам добавляли THP и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. В случае анализа ADNP, первичные нейтрофилы выделяли из цельной крови с использованием лизирующего буферного раствора, содержащего хлорид аммония-калия (ACK). После инкубации в течение 1 ч при 37°C, нейтрофилы окрашивали антителами для детектирования anti-CD66b PacBlue (Biolegend). В случае анализа ADCD, лиофилизированный комплемент морских свинок (Cedarlane) ресуспендировали согласно рекомендациям фирмы-производителя и разбавляли буферным раствором желатин-веронал, содержащим кальций и магний (Boston BioProducts). После инкубации, C3 детектировали конъюгатом флуоресцеина с фракцией IgG к комплементу морских свинок C3 (Mpbio). Для детектирования антителозависимой активности NK клеток использовали подход на основе ИФА. Краткое описание метода: планшеты покрывали раствором антигена 3 мкг/мл (как указано выше), и образцы добавляли в разбавлении 1:50, а затем инкубировали в течение 2 ч при 37°C. NK клетки выделяли методом RosetteSep (Stem Cell Technologies) из лимфоцитарных пленок от здоровых субъектов и инкубировали в растворе интерлейкина IL-15 1 нг/мл (Stemcell). NK клетки инкубировали в смеси с иммунными комплексами в течение 5 ч при 37 °C и окрашивали раствором-коктейлем, содержащим CD107a PE-Cy5 (BD), Golgi stop (BD) и Brefeldin A (BFA, Sigma Aldrich). После инкубации NK клеток их фиксировали (Perm A, Life Tech) и в ходе фиксации клетки окрашивали на присутствие поверхностных маркеров с использованием антител anti-CD16 APC-Cy7 (BD), anti-CD56 PE-Cy7 (BD) и anti-CD3 PacBlue (BD). После пермеабилизации реактивом Perm B (Life Tech), для внутриклеточного окрашивания использовали антитела anti-IFN-gamma FITC (BD) and anti-MIP-1β PE (BD). Все анализы проводили методом проточной цитометрии в системах iQue (Intellicyt) и an S-Lab robot (PAA). В случае анализа ADCP, события гейтировали на гранулопозитивных клетках, а нейтрофилы определяли как CD66b-позитивные после гейтирования на гранулопозитивных нейтрофилах. Показатель фагоцитоза рассчитывали для анализов ADCP и ADNP по формуле (гранулопозитивные клетки в процентах) x (MFI (средняя интенсивность

флуоресценции) гранулопозитивные клетки)/10000. Результаты ADCD представлены как MFI отложения C3. NK клетки определяли как CD3-, CD16+ и CD56+. Данные представлены как клетки, позитивные к CD107a, MIP-1-α или IFN-λ в процентах.

Анализ ELISPOT

Планшеты ELISPOT покрывали мышиными моноклональными антителами против человеческого IFN-γ фирмы BD Pharmingen в концентрации 5 мкг/лунка в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали буферным раствором DPBS, содержащим 0,25% твин20, и блокировали средой R10 (RPMI, содержащая 11% FBS (фетальная сыворотка быка) и 1,1% пенициллин-стрептомицин) в течение 1 ч при 37°C. Пептидные фракции Spike 1 и Spike 2 готовили в концентрации 2 мкг/лунка и в каждую лунку добавляли 200000 клеток/лунка. Пептиды и клетки инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C. Все этапы после этой инкубации выполняли при комнатной температуре. Планшеты промывали буферным раствором для анализатора-култера и инкубировали в течение 2 ч в присутствии биотинилированных кроличьих поликлональных антител против IFN-γ человека фирмы U-Cytech (1 мкг/мл). Планшеты промывали второй раз и инкубировали в течение 2 ч в присутствии антител стрептавидин-щелочная фосфатаза фирмы Southern Biotechnology (1 мкг/мл). После окончательной промывки добавляли раствор субстрата, соли нитор-синий тетразолий хлорида/5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфата пара-толудина (хромаген NBT/BCIP) в течение 7 мин. Хромоген удаляли, планшеты промывали водой и сушили в темном месте в течение 24 ч. Планшеты сканировали и считывали на анализаторе Immunospot фирмы Cellular Technologies Limited.

Анализ окрашивания внутриклеточных цитокинов

10^6 клеток PBMC в лунке ресуспендировали в 100 мкл среды R10, дополненной моноклональным антителом CD49d (1 мкг/мл). Каждый образец оценивали по сравнению с контролем (100 мкл R10 плюс 0,5% ДМСО, фоновый контроль), фракциями пептидов Spike 1 и Spike 2 (2 мкг/мл) или 10 мкг/мл ацетата форболмиристата (PMA) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich) (100 мкл, положительный контроль) и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 0,25 мкл реагента GolgiStop и 0,25 мкл реагента GolgiPlug в 50 мкл R10 и инкубировали при 37°C в течение 8 ч, а затем выдерживали при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки дважды

промывали раствором DPBS, окрашивали красителем из набора Near IR live/dead в течение 10 мин и затем проявляли антителами mAb с предварительно определенным титром против CD279 (клон EH12.1, BB700), CD38 (клон OKT10, PE), CD28 (клон 28.2, PE CY5), CD4 (клон L200, BV510), CD45 (клон D058-1283, BUV615), CD95 (клон DX2, BUV737), CD8 (клон SK1, BUV805), в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали буферным раствором 2% FBS/DPBS и инкубировали в течение 15 мин в присутствии 200 мкл раствора для фиксации/пермеабилизации BD CytoFix/CytoPerm. Клетки промывали дважды буферным раствором 1X Perm Wash (BD Perm/WashTM 10X из набора CytoFix/CytoPerm для фиксации/пермеабилизации, разбавленным водой MilliQ и стерилизованным при пропускании через фильтр с размером пор 0,22 мкм), и проявляли внутриклеточным методом с использованием антител mAbs против Ki67 (клон B56, FITC), CD69 (клон TP1.55.3, ECD), IL10 (клон JES3-9D7, PE CY7), IL13 (клон JES10-5A2, BV421), TNF-α (клон Mab11, BV650), IL4 (клон MP4-25D2, BV711), IFN-γ (клон B27; BUV395), IL2 (клон MQ1-17H12, APC), CD3 (клон SP34.2, Alexa 700), в течение 30 мин. Клетки дважды промывали буферным раствором 1X Perm Wash и фиксировали 250 мкл свежеприготовленного 1,5% формальдегида. Фиксированные клетки переносили в 96-луночный планшет с круглым дном и анализировали в системе BD FACSymphonyTM.

Гистопатология и иммуногистохимический анализ

Ткани фиксировали в свежеприготовленном 4% параформальдегиде в течение 24 ч, переносили в 70% этанол и заливали парафином в течение 7 дней, после чего из блоков получали срезы толщиной 5 мкм. Срезы нагревали в течение 30-60 мин при 65°, затем депарафинизировали в ксилоле и повторно гидратировали с использованием серии растворов этанола с постепенно понижающейся концентрацией до дистиллированной воды. Для иммуногистохимического анализа (IHC) SARS-N и Iba-1, высокотемпературную демаскировку антигена (эпитопов) (HIER), выполняли с использованием пароварки в течение 25 мин в цитратном буферном растворе (Thermo, AP-9003-500) с последующей обработкой 3% перекисью водорода. Затем срезы промывали в дистиллированной воде и блокировали белок (BioCare, BE965H) в течение 15 мин, а затем промывали в 1x фосфатно-солевом буферном растворе. Первичные кроличьи антитела против нуклеопротеина anti-SARS- (Novus,

NB100-56576) и кроличьи антитела anti-Iba-1 (Wako, 019-19741) наносили в соотношении 1:250, а затем наносили кроличий Mach-2 HRP-полимер (BioCare, RHRP520L) в течение 30 мин, затем контр-окрашивали гематоксилином с последующим подсиниванием 0,25% раствором аммиака. Маркировку для SARS-N и Iba-1 проводили на автостейнере Biogenex i6000 (v3.02). Ответ CD4+ Т-клеток, макрофагов (CD68/CD163), нейтрофилов (MPO) и ответ IFN 1 типа (Mx1) оценивали методом. ИГХ проводили, как описано ранее, с использованием прибора для окрашивания Biocare intelliPATH (14), при этом все антитела инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. CD4 (abcam, кат. № ab133616; клон EPR6855) использовали в разведении 1:200 для детекции с использованием кроличьих конъюгатов с пероксидазой хрена Polink-1 HRP (GBI Labs, кат. № D13-110), CD68 (Biocare, кат. № CM033C, клон KP1) в разведении 1:400 для детекции с использованием Mouse Polink-2 AP (GBI Labs Кат. № D69-110), CD163 (Thermo Кат. № MA5-11458; клон 10D6) использовали в разведении 1:400 для детекции с использованием Mouse Polink-2 AP (номер по каталогу GBI Labs D69-110), MPO (номер по каталогу Dako A0398; поликлональные) использовали в разбавлении 1:1000 для детекции с использованием HRP Rabbit Polink-1 (номер по каталогу GBI Labs D13-110), Mx1 (EMD Millipore, кат. № MABF938; клон M143/CL143) использовали в разведении 1:1000 для детекции с использованием Mouse Polink-2 HRP (GBI Labs, кат. № D37-110). Патологию тканей оценивали независимо друг от друга два сертифицированных ветеринарных патологоанатома (AJM и ADM). Количественный анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения HALO (v2.3.2089.27, Indica Labs). Анализировали четыре области левого и правого легкого инфицированных SARS CoV-2 животных (n = 4), а одну область анализировали для неинфицированных контрольных животных (n = 4). Для количественного определения Mx1 использовали модуль Area Quantification v2 для оценки содержания белка MX1 в процентах от общей площади ткани. Для количественного определения MPO (нейтрофилов) программное обеспечение HALO AI сначала обучали для обнаружения альвеолярной части легкого, исключая кровеносные сосуды (> 5 $мм^2$), бронхи, бронхиолы, хрящи и соединительную ткань; впоследствии модуль CytoNuclear v1.6 использовали для обнаружения клеток MPO+ и данные представлены в виде доли от общей альвеолярной ткани ($PMN/мм^2$). Во всех

случаях для каждого образца проводили ручную проверку, чтобы обеспечить точность аннотаций и скорректироать ложноположительные/ложноотрицательные результаты.

Гибридизация RNASCOPE® *in situ*

Гибридизацию RNASCOPE® *in situ* проводили, как описано ранее (15), с использованием антисмыслового 2019-nCoV специфического зонда v-nCoV2019-S (ACD № по кат. № 859151), направленного на положительно смысловую вирусную РНК 2019-nCoV смыслового специфического зонда v2019-nCoV-orf1ab-sense (ACD кат.№859151), например, на отрицательно смысловую геномную вирусную РНК, и зонда ZIKA V-ZIKVsph2015 (ACD, № по кат. № 467871) в качестве отрицательного контроля. Краткое описание метода: после депарафинизации chtpjd в ксилоле и повторной гидратации с использованием серии растворов этанола с постепенно понижающейся концентрацией до дистиллированной воды. извлечение проводили в течение 30 мин в буферном растворе для извлечения ACD P2 (ACD, кат. № 322000) при 95-98°C с последующей обработкой протеазой III (ACD № по каталогу 322337), разбавленной в PBS в соотношении 1:10 в течение 20 мин при 40°C. Затем срезы инкубировали в присутствии 3% H_2O_2 в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Перед гибридизацией исходные растворы зондов центрифугировали при 13000 об/мин с использованием микроцентрифуги в течение 10 мин, затем разбавляли в соотношении 1:2 в растворителе для зондов (ACD, кат. № 300041) для уменьшения тканевых артефактов агрегации зонда. Срезы обрабатывали с использованием реагентов RNASCOPE® 2.5 HD Detection-RED (ACD № по каталогу 322360).

Циклическая иммунофлуоресценция

Циклическую иммунофлуоресценцию (CyCIF) проводили, как описано ранее (16). Краткое описание метода: образцы, фиксированные параформальдегидом на предметных стеклах, депарафинизировали, и антиген извлекали в системе Leica Bond RX. Затем предметные стекла подвергали CyCIF с использованием следующих антител (таблица 1). Срезы сканировали с помощью сканера RARECYTE® CYTEFINDER®, оснащенного 20-кратным объективом с числовой апертурой 0,8, а затем изображения корректировали на неравномерное освещение с помощью устройства BaSiC. Изображения с коррекцией плоского поля обрабатывали с помощью программного обеспечения

ASHLAR для выравнивания изображений и каналов друг с другом во всех циклах.

Таблица 1

Антитела для циклической иммунофлуоресценции

Мишень	Флуорохроме	Виды	Клон	Фирмы-производители	No по каталогу	Разбав-ление	[Ab] (мкг/мл)
CD16	ALEXA FLUOR® 647	Мышь	DJ130c	Santa Cruz Biotechnologies	sc-20052 AF647	150	1,3
CD20	eFluor 660	Мышь	L26	Thermo Fisher	50-0202-80	1000	0,2
CD206	ALEXA FLUOR®488	Мышь	D-1	Santa Cruz Biotechnologies	sc-376108 AF488	150	1,3
CD31	ALEXA FLUOR®647	Кролик	EPR3094	Abcam	ab218582	300	н.о.
CD3E	n/a	Крыса	CD3-12	Abcam	ab11089	100	2
CD68	Phycoerythrin	Кролик	D4B9C	CST	79594S	200	н.о.
ECAD	ALEXA FLUOR®488	Кролик	клон 24E10	CST	3199S	300	н.о.
HLADR	ALEXA FLUOR®555	Кролик	EPR3692	Abcam	ab215312	500	н.о.
IBA1	ALEXA FLUOR®488	Кролик	EPR6136 (2)	Abcam	ab195031	200	н.о.
MPO	ALEXA FLUOR®488	Кролик	EPR20257	Abcam	ab225474	400	н.о.
pan-CK	eFluor 570	Мышь	AE1/AE3	Thermo Fisher	41-9003-82	1000	0,2
Кроличий IgG	ALEXA FLUOR®488	Коза	Поли-клональный	Thermo Fisher	A11070	2000	1
Крысиный IgG	ALEXA FLUOR®555	Коза	Поли-клональный	Thermo Fisher	A21245	2000	1
SARS-N	n/a	Кролик	Поли-клональный	Novus	NB100-56576	200	2,5

Статистический анализ

Анализ вирусологических и иммунологических данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.4.2 (программное обеспечение GraphPad). Сравнение данных между группами проводили с использованием 2-сторонних критериев Манна-Уитни. Значение P менее 0,05 считалось значимым.

Полученные результаты

Вирусология и иммунология инфекции 2019-nCoV у макак-резусов

9 взрослых макак-резус (возрастом 6-12 лет) заражали в общей сложности в дозе $1,1x10^6$ PFU (группа 1, N=3), $1,1x10^5$ PFU (группа 2, N=3) или $1,1x10^4$ PFU (группа 3, N=3) вируса 2019-nCoV, вводимого в объеме 1 мл интраназальным

(IN) меодом и 1 мл интратрахеальным (IT) методом. После заражения вирусом уровни вирусной РНК оценивали методом ОТ-ПЦР в нескольких анатомических компартментах. Высокие уровни вирусной РНК наблюдались в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) (фиг. 23A) и мазках из носа (NS) (фиг. 23B), со средним пиком 6,56 (диапазон 5,32-8,97) log_{10} копий РНК/мл в образцах BAL и средний пик 7,00 (диапазон 5,06–8,55) log10 копий РНК/мазок в образцах NS. Уровень вирусной РНК в лбразцах NS увеличивался у всех животных в период день 1–день 2, что свидетельствует о репликации вируса. Уровень вирусной РНК достигает пика в день 2 и обычно возвращается к норме в дни 10-14 в образцах BAL и в дни 21-28 в образцах NS. На день 2 вирусная нагрузка в образцах BAL и в образцах NS оказалась сопоставимой во всех группах, независимо от дозы. Вирусная РНК не обнаруживалась в плазме (фиг. 29). У животных наблюдалось умеренное снижение аппетита и ответной реакции, свидетельствующие о легкой форме клинического заболевания (фиг. 30), а также о легкой временной нейтропении и лимфопении в группе с высокой дозой (фиг. 31), но лихорадки, потери массы тела, респираторного дистресс-синдрома и смертности не наблюдалось.

Для усиления различия между вводимым контрольным вирусом и вновь реплицирующимся вирусом, был разработан анализ ОТ-ПЦР для оценки гена E субгеномной иРНК (sgmРНК). Ген E sgmРНК отражает клеточные промежуточные компоненты репликации вируса, которые не упакованы в вирионы и, таким образом, представляют собой предполагаемый реплицирующийся вирус в клетках (9). По сравнению с общей вирусной РНК (фиг. 23B), уровни sgmРНК снижались в образцах NS в день 1 со средним значением 5,11 (диапазон <1,70–5,94) log_{10} копий sgmРНК/мазок, но затем увеличились в день 2 до среднего значения 6,50 (диапазон 4,16-7,81) log_{10} копий sgmРНК/мазок (фиг. 23C).

Затем у этих животных оценивали гуморальный и клеточный иммунный ответ, специфичный для 2019-nCoV. У всех 9 макак развивались ответы связывания антител к шиповидному S белку 2019-nCoV по данным ИФА (фиг. 24A) и ответы нейтрализующих антител (NAb) с использованием как анализа нейтрализации псевдовируса (10) (фиг. 24B), так и анализа нейтрализации жизнеспособного вируса (11, 12) (фиг. 24C). Титры NAb, равные примерно 100, наблюдались у всех животных в день 35, независимо от дозовой группы

(диапазон 83-197 по данным анализа нейтрализации псевдовируса и 35-326 по данным анализа нейтрализации жизнеспособного вируса). Антительные ответы нескольких подклассов наблюдались против рецептор-связывающего домена (RBD), эктодомена S до слияния (S) и нуклеокапсида (N), и антитела проявляли различные эффекторные функции, антителозависимое отложение комплемента (ADCD), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP) и антителозависимая дегрануляция NK-клеток (NK CD107a) и секреция цитокинов (NK MIP1β, NK IFNγ) (13) (фиг. 24D). Клеточные иммунные ответы на фракции S-пептидов наблюдались у большинства животных по данным анализов IFN-γ ELISPOT в день 35 с тенденцией к более низким ответам в группах с более низкими дозами (фиг. 24E). Анализы окрашивания внутриклеточных цитокинов свидетельствовали об индукции как S-специфических CD8+, так и CD4+ Т-клеточных ответов (фиг. 24F).

Инфекция SARS CoV-2 вызывает острую вирусную интерстициальную пневмонию у макак резус

В настоящее время доступны лишь ограниченные данные о патологии людей, инфицированных 2019-nCoV. Для оценки патологических показателей инфекции 2019-nCoV у макак резус 4 животным вводили вирусв дозе $1{,}1\times10^5$ PFU интраназальным (IN) и интратрахеальным (IT) способами, как указано выше, и вскрывали их в день 2 (N = 2) и в день 4 (N = 2) после заражения. Несколько областей верхних дыхательных путей, нижних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, лимфатических узлов и других органов отбирали для вирусологических и патологических анализов. Высокие уровни вирусной РНК наблюдали во всех тканях слизистой оболочки носа, глотки, трахеи и легких, а более низкие уровни вируса были обнаружены в желудочно-кишечном тракте, печени и почках (фиг. 32). Вирусная РНК легко обнаруживалась в паратрахеальных лимфатических узлах, но лишь иногда в дистальных лимфатических узлах и селезенке (фиг. 32).

Слизистые оболочки верхних дыхательных путей, трахею и легкие фиксировали параформальдегидом, заливали парафином и оценивали гистопатологическим способом. В день 2 после заражения у обоих вскрытых животных были обнаружены многоочаговые области воспаления и признаки вирусной пневмонии, включая расширение альвеолярных перегородок с

мононуклеарными клеточными инфильтратами, консолидацию и отек (фиг. 25A, 25B). Участки с отеком также содержали многочисленные полиморфноядерные клетки, преимущественно нейтрофилы. Наблюдался некротизированный терминальный бронхиолярный эпителий и отшелушивание со скоплениями эпителиальных клеток, обнаруженными в дыхательных путях и дистально в альвеолярных пространствах (фиг. 25C, 25D) с образованием случайных бронхиолярных эпителиальных синцитиальных клеток (фиг. 25E). В альвеолярных перегородках иногда наблюдались гиалиновые мембраны, что согласуется с повреждением пневмоцитов типа I и типа II (фиг. 25F). Альвеолы были заполнены диффузно реактивными альвеолярными макрофагами, и некоторые из них оказались многоядерными и их отмечали как положительные в отношении нуклеокапсида иммуногистохимическим методом (фиг. 25G). Клетки альвеолярной выстилки (пневмоциты) также в значительной степени отмечали как положительные в отношении нуклеокапсида (фиг. 25H).

Многоочаговые скопления инфицированных вирусом клеток присутствовали по всей паренхиме легкого, что было обнаружено по данным иммуногистохимического анализа и гибридизации РНК in situ (RNASCOPE®) (14, 15) (фиг. 25I). С использованием метода RNASCOPE® наблюдали вирусную РНК как с положительной, так и с отрицательной цепью, что свидетельствует о репликации вируса в легочной ткани. Плотные воспалительные инфильтраты включали полиморфноядерные клетки, обнаруженные при окрашивании эндогенной миелопероксидазой (MPO), CD68 и CD163-положительные макрофаги, CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты и повышающую диффузную активацию гена интерферона 1 типа MX1 (фиг. 33). Инфекция 2019-nCoV привела к значительному увеличению полиморфноядерной клеточной альвеолярной инфильтрации легких по сравнению с неинфицированными животными (P = 0,0286), а также к обширному окрашиванию MX1 примерно в 30% всей легочной ткани (P = 0,0286) (фиг. 34). Воспалительные инфильтраты также были обнаружены в респираторном эпителиальном подслизистом слое крупных дыхательных путей с трансмиграцией воспалительных клеток в просвет бронхиол (фиг. 25J). Ресничные эпителиальные клетки также были окрашены положительно как для РНК SARS CoV-2 (фиг. 25K), так и для нуклеокапсида SARS (фиг. 25L). В день 4 после заражения степень воспаления и вирусной пневмонии уменьшились, но вирус все еще обнаруживался в паренхиме легких,

и сохранялась нейтрофильная инфильтрация и интерфероновый ответ 1 типа (фиг. 34).

Для дополнительной оценки инфицированных тканей проводили циклическую иммунофлуоресцентную визуализацию (CyCIF), которая представляет собой метод мультиплексного иммунофенотипирования фиксированных параформальдегидом образцов ткани (16). Ткани прокрашивали на присутствие нуклеокапсида (SARS-N), панцитокератина (для идентификации эпителиальных клеток), Iba-1 (адаптер, связывающий ионизированный кальций, в качестве панмакрофагального маркера), CD68 (маркер моноцитов/макрофагов) и CD206 (маркер макрофагов), в дополнение к панели маркеров для идентификации других иммунных клеток и анатомических структур и контрастного окрашивания ДНК для маркировки всех ядер. Очаги инфицированных вирусом клеток были беспорядочно распределены по всему легкому и в различной степени были связаны с воспалительными инфильтратами (фиг. 26A-D). Некоторые участки паренхиматозной консолидации и воспаления содержали небольшое количество вируса или не содержали его вообще (фиг. 26A, стрелки; фиг. 35). Инфицированные вирусом клетки часто окрашивались совместно с панцитокератином (фиг. 26E-H), что позволяет предположить о присутствии клеток альвеолярного эпителия (пневмоциты). Неинфицированные Iba-1+ CD68+ CD206+ активированные макрофаги также часто выявляли в соседних участках с инфицированными вирусом эпителиальными клетками (фиг. 26E, I-K). Эти данные свидетельствуют о том, что 2019-nCoV индуцирует многоочаговые области острого воспаления и вирусной пневмонии с участием инфицированных пневмоцитов, реснитчатых клеток бронхиального эпителия и, вероятно, других типов клеток.

Защитная эффективность против повторного заражения вирусом 2019-nCoV у макак резус

В день 35 после начальной вирусной инфекции (фиг. 23-24) всем 9 макакам резус повторно вводили те же дозы 2019-nCoV, которые использовали для первичной инфекции, а именно $1{,}1\times10^6$ PFU (группа 1, N=3). $1{,}1\times10^5$ PFU (группа 2, N=3) или $1{,}1\times10^4$ PFU (группа 3, N=3). 3 наивных животных были включены в качестве положительных контролей в эксперименте с повторным заражением. В день 1 после повторного заражения у двух животных группы 1 в образцах BAL и у одного животного группы 2 в образцах BAL наблюдали очень

ограниченное количество вирусной РНК, при этом вирусная РНК не обнаруживалась в последующие моменты времени (фиг. 27A). Напротив, как и ожидалось, у одновременно зараженных наивных животных наблюдали высокие уровни вирусной РНК (фиг. 27A). Средняя величина пиковых вирусных нагрузок в образцах BAL составила менее >5,1 log10 после повторного заражения по сравнению с первичным заражением (P<0,0001, двусторонний критерий Манна-Уитни, фиг. 27B). Вирусная РНК после повторного заражения оказалась выше в образцах NS по сравнению с образцами BAL, однако характеризовалась зависимостью от дозы и быстрым снижением (фиг. 27C), в то время как средняя величина пиковых вирусных нагрузок в образцах NS все еще составляла менее >1,7 log10 после повторного заражения по сравнению с первичным заражением (P=0,0011, двусторонний критерий Манна-Уитни, фиг. 27D).

Было высказано предположение, что большая часть вируса, обнаруженного в образцах NS после повторного заражения, является вирусом контрольного заражения, и поэтому уровни sgmРНК оценивали в образцах NS после повторного заражения. Низкие, но детектируемые уровни sgmРНК все еще наблюдали у 4 из 9 животных в образцах NS в день 1 после повторного заражения, но уровни sgmРНК быстро снижались (фиг. 27E), а средние пиковые уровни sgmРНК в образцах NS составили менее >4,8 $\log_{10}$ после повторного заражения по сравнению с первичным заражением (P=0,0003, двусторонний критерий Манна-Уитни, фиг. 27F). В соответствии с этими данными анализы бляшкообразования в образцах BAL и NS после повторного заражения свидетельствовали об отсутствие восстанавливаемого вируса и оказались ниже по сравнению с первичным инфицированием (P = 0,009 и 0,002, соответственно, двусторонний тест Манна-Уитни, фиг. 36). Более того, после повторного заражения у животных не наблюдали клинического заболевания или оно было незначительным (фиг. 37).

После повторного заражения 2019-nCoV у животных наблюдали быстрые анамнестические иммунные ответы, включая повышенные титры вирус-специфического ИФА (P = 0,0034, двусторонний тест Манна-Уитни), титры NAb псевдовируса (P = 0,0003) и титры NAb жизнеспособного вируса (P=0,0003), а также тенденцию к увеличению ответов ELISPOT IFN-γ (P=0,1837) в день 7 после повторного заражения (фиг. 28). У всех животных развивался анамнестический ответ антител после повторного заражения, независимо от

присутствия или отсутствия остаточной вирусной РНК или sgmРНК в образцах BAL или NS, и, таким образом, можно предположить, что защитная эффективность против повторного заражения опосредована быстрым иммунологическим контролем.

Обсуждение

У индивидуумов, выздоравливающих от определенных вирусных инфекций, обычно вырабатываются вирусспецифические ответы антител, которые активируют надежный защитный иммунитет от повторного заражения, но некоторые вирусы, такие как ВИЧ-1 (17), не активируют защитный естественный иммунитет. Исследования заражения опосредованной коронавирусом ОРВИ 229E на людях показали, что может существовать частичный естественный иммунитет (18). Однако в настоящее время данные о защите людей, выздоровевших от инфекции 2019-nCoV, от повторного заражения, отсутствуют (Всемирная организация здравоохранения, Scientific Brief, 24 апреля 2020 г.). Эта критическая проблема имеет серьезные последствия для разработки вакцин, стратегий общественного здравоохранения, терапии на основе антител и эпидемиологического моделирования коллективного иммунитета. В данном исследовании было установлено, что инфекция 2019-nCoV у макак резус обеспечивает существенную защитную эффективность против повторного заражения 2019-nCoV.

Была разработана модель инфекции 2019-nCoV макак резус, в которой были суммированы многие аспекты инфекции 2019-nCoV человека, включая высокие уровни репликации вируса в верхних и нижних дыхательных путях (фиг. 23) и явные патологические признаки вирусной пневмонии (фиг. 25, 26). С использованием гистопатологии, иммуногистохимии, анализа RNASCOPE® и визуализации CyCIF были выявлены мультифокальные скопления инфицированных вирусом клеток в областях острого воспаления с признаками вирусной инфекции альвеолярных пневмоцитов и реснитчатых бронхиальных эпителиальных клеток. Эти данные свидетельствуют о пригодности макак резус в качестве модели инфекции 2019-nCoV для тестирования вакцин и терапевтических средств, а также для изучения иммунопатогенеза, а полученные данные дополняют и расширяют недавно опубликованные данные о яванских макаках (19). Однако ни одна из моделей приматов, отличных от человека, не привела к дыхательной недостаточности или смертности, и поэтому

потребуются дальнейшие исследования для разработки модели тяжелой степени заболевания COVID-19 у приматов, отличных от человека.

Инфекция 2019-nCoV у макак резус привела к сильным гуморальным и клеточным иммунным ответам (фиг. 2) и обеспечила надежную защиту от повторного заражения (фиг. 27). Остаточные низкие уровни субгеномной иРНК в мазках из носа (NS) у подгруппы животных (фиг. 27) и анамнестические иммунные ответы у всех животных (фиг. 28) после повторного заражения 2019-nCoV позволяют предположить, что защита была опосредована быстрым иммунологическим контролем и, предположительно, не оказывала стерилизующего действия.

Инфекция 2019-nCoV у макак резус привела к индукции титров нейтрализующих антител приблизительно 100 как по данным анализа нейтрализации псевдовируса, так и анализа нейтрализации жизнеспособного вируса, но относительная важность нейтрализующих антител, других функциональных антител, клеточного иммунитета и врожденного иммунитета для эффективность защиты от 2019-nCoV еще предстоит определить. Кроме того, потребуются дополнительные исследования для определения стабильности естественного иммунитета.

Таким образом, инфекция 2019-nCoV у макак резус индуцировала гуморальный и клеточный иммунный ответ и обеспечила надежную защиту от повторного заражения 2019-nCoV. Эти данные повышают вероятность того, что иммунологические подходы к профилактике и лечению инфекции 2019-nCoV действительно возможны.

Список литературы

1. F. Wu и др., A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature 579, 265-269 (2020).

2. P. Zhou и др., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 579, 270-273 (2020).

3. M. L. Holshue и др., First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. N Engl J Med 382, 929-936 (2020).

4. Q. Li и др., Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. N Engl J Med, (2020).

5. N. Zhu и др., A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med 382, 727-733 (2020).

6. N. Chen и др., Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet 395, 507-513 (2020).

7. C. Huang и др., Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 395, 497-506 (2020).

8. J. F. Chan и др., A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. Lancet 395, 514-523 (2020).

9. R. Wolfel и др., Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature, (2020).

10. Z. Y. Yang и др., A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. Nature 428, 561-564 (2004).

11. T. Scobey и др., Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 16157-16162 (2013).

12. B. Yount и др., Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 12995-13000 (2003).

13. A. W. Chung и др., Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. Cell 163, 988-998 (2015).

14. C. Deleage и др., Impact of early cART in the gut during acute HIV infection. JCI insight 1, (2016).

15. C. Deleage и др., Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues. Pathog Immun 1, 68-106 (2016).

16. J. R. Lin и др., Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. eLife 7, (2018).

17. M. Altfeld и др., HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. Nature 420, 434-439 (2002).

18. K. A. Callow, H. F. Parry, M. Sergeant, D. A. Tyrrell, The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. Epidemiol Infect 105, 435-446 (1990).

19. B. Rockx и др., Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. Science, (2020).

Пример 10

Введение или повторное введение антикоронавирусной композиции человеку

Термин “человек-субъект”, использованный в данном контексте, означает субъект, восприимчивый к коронавирусной инфекции на основании отсутствия уровня антител против коронавируса (например, в крови субъекта) или уровня антител против коронавируса ниже защитного уровня, как определено в данном контексте. Субъекту можно вводить антикоронавирусную композицию (например, любую из композиций или иммуногенных композиций, описанных в данном контексте) либо в виде первого введения (прайминг-вакцина), либо в виде повторного введения (бустерное введение) в соответствии со способами, описанными в данном контексте. После лечения человека-субъекта можно оценить эффективность лечения при измерении уровня антител против коронавируса у человека-субъекта (например, в крови субъекта). Если уровень ниже защитного уровня, как описано в данном контексте, человеку-субъекту можно вводить бустерную дозу антикоронавирусной композиции или его можно лечить антикоронавирусной композицией, отличной от ранее введенной.

Уровень антикоронавирусных антител можно измерить вскоре после лечения (например, в период от дня 1 после введения и до 8 недель после введения), чтобы определить, нужны ли дополнительные дозы (например, бустерная доза) для достижения защитного уровня антитела против коронавируса. Уровень антикоронавирусных антител у субъекта также можно контролировать в течение более длительного периода времени (например, от 2 месяцев после введения и до 15 лет после введения), и можно повторно вводить антикоронавирусную композицию, если уровень антител против коронавируса становится ниже защитного уровня, как описано в данном контексте.

Пример 11

Однодозовая вакцина защищает от 2019-nCoV у макак резус

Для прекращения пандемии COVID-19 может потребоваться безопасная и эффективная вакцина против 2019-nCoV[1-8]. Для глобального развертывания борьбы с пандемией оптимальной является вакцина, требующая только однократной иммунизации. В настоящем документе описаны иммуногенность и защитная эффективность однократной дозы вакцин на основе вектора аденовируса серотипа 26 (Ad26), экспрессирующих шиповидный S белок 2019-

nCoV, у нечеловекообразных приматов. 52 макаки-резус были иммунизированы векторами Ad26, экспрессирующими один из вариантов S или контроль плацебо, и были заражены 2019-nCoV интраназальным и интратрахеальным способами[9,10]. Оптимальная вакцина Ad26 индуцировала сильные ответы нейтрализующих антител и обеспечивала полную или почти полную защиту в образцах бронхоальвеолярного лаважа и мазков из носа после заражения 2019-nCoV. Вызванные вакциной титры нейтрализующих антител коррелируют с защитной эффективностью, что свидетельствует об иммунном соответствии защиты. Эти данные демонстрируют надежную однократную вакцинную защиту от 2019-nCoV у нечеловекообразных приматов, которая является признанной в данной области техники животной моделью лечения заболеваний у людей. Оптимальная вакцина на основе вектора Ad26 для 2019-nCoV, получившая название Ad26.COV2.S, планируется для ближайших клинических испытаний.

Быстрое распространение пандемии COVID-19 сделало разработку вакцины против 2019-nCoV глобальным приоритетом здравоохранения. Было установлено, что векторы аденовируса серотипа 26 (Ad26)[11] вызывают устойчивые гуморальные и клеточные иммунные ответы на множество патогенов как у нечеловекообразных приматов, так и у людей. Была разработана серия векторов Ad26, экспрессирующих различные варианты шиповидного (S) белка 2019-nCoV, и была оценена их иммуногенность и защитная эффективность против заражения 2019-nCoV у макак резус.

Материалы и методы

Животные и дизайн исследования.

52 беспородных взрослых самца и самки макак резус индийского происхождения (Macaca mulatta) в возрасте 6-12 лет были случайным образом рандомизированы по группам. Все животные содержались в условиях Bioqual, Inc. (Роквилл, Мэриленд). Животным вводили векторы Ad26, экспрессирующие tPA.S (N=4), tPA.S.PP (N=4), S (N=4), S.dCT (SS-SdCT) (N=4), tPA.WT. S (N=4), S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) (N=6), S.PP (SS-Spike-dF-PP) (N=6) и контроли плацебо (N=20). Животных однократно иммунизировали в дозе 10^{11} вирусными частицами (вч) векторов Ad26 внутримышечно без адъюванта на неделе 0. Через 6 недель всех животных заражали в дозе $1,2\times10^{8}$ вч ($1,1\times10^{4}$ PFU) 2019-nCoV, полученных из США (WA1/2020, NR-52281, ресурсы BEI)[9]. Вирус вводили по 1 мл интраназально (IN) (по 0,5 мл в каждую ноздрю) и по 1

мл интратрахеально (IT). Все иммунологические и вирусологические анализы проводили слепым методом. Все исследования на животных проводили в соответствии со всеми соответствующими местными, государственными и федеральными законами и были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных в условиях Bioqual (IACUC).

Векторы Ad26

Векторы Ad26 были сконструированы с использованием семи вариантов последовательности шиповидного белка (S) 2019-nCoV (Wuhan/WIV04/2019, Genbank MN996528.1). Последовательности были оптимизированы по кодонам и синтезированы. Некомпетентные к репликации с делецией E1/E3 Ad26-векторы[11] были получены в клетках PER.C6.TetR с использованием плазмиды, содержащей полный геном вектора Ad26 и экспрессионную кассету трансгена. Векторы секвенировали и тестировали на экспрессию перед использованием.

Анализ вестерн-блоттингом

Флаконы T-25, засеянные клетками 293T при слиянии 70-80%, временно трансфектировали векторами 2019-nCoV Ad26, а клеточные лизаты собирали через 48 ч после трансфекции и отдельно смешивали с восстанавливающим буферным раствором для образцов (Pierce), нагревали в течение 5 мин при 95°C и анализировали на предварительно полученном 4-15% геле для ЭФ в SDS-PAGE (Bio-Rad). Белок переносили на мембрану из поливинилидендифторида (PVDF) с использованием системы для сухого блоттинга iBlot (Invitrogen) и блокирование мембраны проводили в течение ночи при 4°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко T (D-PBST), содержащем 0,2% Твин 20 (Sigma) (об./об.) и 5% (мас./об.) обезжиренного сухого молока. После блокирования в течение ночи мембрану PVDF инкубировали в течение 1 ч в 3% растворе молока DPBS-T, содержащем поликлональное антитело морских свинок против SARS в разведении 1:10000 (ресурсы BEI), в течение 1 ч. После такого инкубирования мембрану PVDF пять раз промывали 5% раствором молока DPBS-T, а затем инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) против морской свинки или кролика в соотношении 1:30 000 (Jackson Immunoresearch) в 3% растворе молока DPBS-T. В завершение мембрану PVDF снова пять раз промывали 5% раствором молока DPBS-T и проявляли в системе детекции Amersham ECL Plus Western blotting (GE Healthcare).

Анализ субгеномной иРНК

Субгеномную иРНК гена E 2019-nCoV (sgmRNA) оценивали с помощью ОТ-ПЦР с использованием подхода, аналогичного описанному ранее[9,10,20]. Краткое описание метода: для получения стандартной кривой sgmРНК гена E 2019-nCoV клонировали в экспрессионную плазмиду pcDNA3.1, эту вставку транскрибировали с использованием набора для создания сообщений AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker Kit (Cellscript) для получения РНК для стандартов. Перед проведением ОТ-ПЦР образцы, отобранные у зараженных животных, или стандарты подвергали обратной транскрипции с использованием системы Superscript III VILO (Invitrogen) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Был разработан специальный анализ экспрессии генов Taqman (ThermoFisher Scientific) с использованием последовательностей-мишеней sgmРНК[20] гена E. Реакции проводили в системах ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 и 7 Flex (Applied Biosystems) в соответствии с рекомендациями производителя. Стандартные кривые использовали для расчета содержания sgmРНК в копиях на мл или на мазок; чувствительность количественного анализа составляла 50 копий на мл или на мазок.

Анализ PFU

Для анализа бляшкообразования получали конфлюэнтные монослои клеток Vero E6 в 6-луночных планшетах. Готовили серийные разбавления указанных образцов, собранных у зараженных животных, добавляли их в лунки планшета и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 1,5 мл 0,5% метилцеллюлозной среды и планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 в течение 2 дней. Планшеты фиксировали, добавляя 400 мкл ледяного метанола на лунку и инкубируя при -20°C в течение 30 мин. После фиксации метанол сливали и монослои клеток окрашивали при добавлении 600 мкл на лунку 0,23% кристаллического фиолетового в течение 30 мин. После окрашивания кристаллический фиолетовый удаляли, а планшеты один раз промывали 600 мкл воды для визуализации и подсчета бляшек.

ИФА

RBD-специфические связывающие антитела оценивали с использованием ИФА в основном, как описано в работах[9,10]. Краткое описание метода: В лунки 96-луночных планшетов наносили 1 мкг/мл белка RBD 2019-nCoV (Aaron

Schmidt, MassCPR) в буферном растворе 1X DPBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты один раз промывали буферным раствором для промывки (0,05% Твин20 в 1 x DPBS) и блокировали при добавлении по 350 мкл казеинового блокирующего раствора на лунку в течение 2–3 ч при комнатной температуре. После инкубации блокирующий раствор удаляли, а планшеты вытирали насухо. Серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки, разведенной в казеиновом блокирующем растворе, добавляли в лунки и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед тремя дополнительными промывками и 1-часовой инкубацией в разведении 1:1000 с антителами макаки, конъюгированными с HRP (NIH, программа реагентов NHP) при комнатной температуре в темноте. Затем планшеты трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора SERACARE® KPL TMB SureBlue Start, реакцию останавливали добавлением 100 мкл раствора для остановки SERACARE® KPL TMB на лунку. Поглощение при 450 нм регистрировали с использованием ридера для микропланшетов VERSAMAXTM или OMEGA®. Конечные титры ИФА определяли как самое высокое обратное разведение сыворотки, при котором поглощение превышало 0,2. Результаты регистрировали в виде Log10 конечного титрования.

Анализ нейтрализации псевдовируса

Псевдовирусы 2019-nCoV, экспрессирующие репортерный ген люциферазы, конструировали с использованием подхода, аналогичного описанному ранее[9,10,16]. Краткое описание метода: пакующий конструкт psPAX2 (AIDS Resource and Reagent Program), люциферазную репортерную плазмиду pLenti-CMV Puro-Luc (Addgene) и шиповидный белок, экспрессирующий pcDNA3.1-SARS CoV-2 SΔCT, совместно трансфектировали в клетки HEK293T в присутствии фосфата кальция. Супернатанты, содержащие вирусы псевдотипа, собирали через 48 ч после трансфектирования, вирусы псевдотипа очищали фильтрованием через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Для определения нейтрализующей активности антисыворотки вакцинированных животных клетки HEK293T-hACE2 высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур при плотности $1{,}75\times10^4$ клеток/лунку в течение ночи. Готовили двукратные серийные разведения образцов сыворотки, инактивированной нагреванием, и смешивали с 50 мкл псевдовируса. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч

перед добавлением к клеткам HEK293T-hACE2. Через 48 ч клетки лизировали в растворе STEADY-GLO® Luciferase Assay (Promega) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Титры нейтрализации 2019-nCoV определяли как разведение образца, при котором наблюдалось 50% снижение в относительных световых единицах (RLU) по сравнению со средним значением контрольных лунок с вирусом.

Анализ нейтрализации жизнеспособного вируса

Полноразмерный вирус 2019-nCoV, основанный на изоляте Сиэтл-Вашингтон, был сконструирован для экспрессии люциферазы и GFP и его выделяли методом “обратной генетики”, как описано ранее[17,18]. Вирус титровали в клетках Vero E6 USAMRID для получения сигнала RLU, по меньшей мере в 10 раз превышающего контрольный фон клеток. Клетки Vero E6 USAMRIID высевали с плотностью 20000 клеток в лунке накануне в 96-луночные планшеты с прозрачным дном и черными стенками. Образцы сыворотки с нейтрализующими антителами тестировали в исходном разведении 1:4 и готовили 4-кратные серийные разведения (восемь лунок). Комплексы антитело-вирус инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 в течение 1 ч. После инкубации среду для роста удаляли и к клеткам добавляли разведения комплексов вирус-антитело в двух повторах. В каждый планшет для анализа нейтрализации включали контроли (только вирус) и контроли (только клетки). После заражения планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 в течение 48 ч. Затем клетки лизировали и измеряли активность люциферазы в системе анализа люциферазы Nano-Glo (Promega) в соответствии со спецификациями фирмы-производителя. Титры нейтрализации 2019-nCoV определяли как разведение образца, при котором наблюдалось 50% снижение в единицах RLU по сравнению со средним значением контрольных лунок с вирусом.

Системная серология

Люминекс

Был использован индивидуальный комплексный подход для количественного определения относительных титров антиген-специфических антител, как описано ранее[29]. Таким образом, микросферы (Luminex) с уникальной флуоресценцией конденсировали с антигенами 2019-nCoV, включая шиповидный белок (S) и домен связывания с рецептором (RBD) с образованием

ковалентных связей N-гидроксисукцинимид (NHS)-эфир в присутствии EDC (Thermo Scientific) и сульфо-NHS (Thermo Scientific). В лунку 384-луночного планшета (Greiner) добавляли $1,2\times10^3$ микросфер на область/антиген и инкубировали с разведенным образцом сыворотки (1:100 для всех изотипов/подклассов, за исключением IgG1, который разбавляли 1:250, как и для связывания Fc-рецептора) в течение 16 ч при встряхивании при 900 об/мин при 4°C. После образования иммунных комплексов микросферы трижды промывали 0,1% BSA и 0,05% Твин-20 (буферный раствор для анализа Luminex) с помощью автоматического устройства для промывки планшетов (Tecan). Детектирующие антитела анти-резус IgG1, IgG2, IgG3, IgA (NIH NHP Reagent Program) и IgM (Life Diagnostic) разводили в буферном растворе для анализа Luminex до 0,65 мкг/мл и инкубировали с микрофсерами в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании при 900 об/мин. После промывки окрашенных иммунных комплексов в каждую лунку добавляли третичное козье антимышиное IgG-PE антитело (Southern Biotech) при концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере. Аналогичным образом, для профилей связывания Fc-рецепторов рекомбинантные антитела резус FcγR2A-1, FcγR2A-2, FcγR2A-3, FcγR2A-4, FcγR3A и FcγR2B человека (Duke Protein Production) биотинилировали (Thermo Scientific) и конъюгировали со стрептавидином-PE в течение 10 мин (Southern Biotech). Микросферы с покрытием затем промывали и считывали на проточном цитометре iQue (Intellicyt) с прикрепленным роботизированным манипулятором (PAA). Для каждой области гранул гейтировали события и данные представляли в виде средней флуоресценции PE для положительных событий микросфер. Образцы анализировали в двух повторах для каждого вторичного детектирующего агента.

ADNP, ADCP, ADCD на основе микросфер

Антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и антителозависимое отложение комплемента (ADCD) проводили, как описано ранее[30-32]. Краткое описание метода: 2019-nCoV S и RBD биотинилировали (Thermo Fisher) и конденсировали с желтыми (ADCP, ADNP) и красными (ADCD) флуоресцентными микросферами диаметром 1 мкм в течение 2 ч при 37°C. Избыток антигена удаляли после двукратной промывки

0,1% BSA в PBS. Затем в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 1,82 $\times 10^8$ микросфер, покрытых антигеном, и инкубировали с разведенными образцами (ADCP и ADNP 1:100, ADCD 1:10) при 37°C в течение 2 ч для ускорения образования иммунных комплексов. После инкубации микросферы с комплексом промывали и в случае ADCP добавляли $2,5\times 10^4$ клеток THP-1 (Американская коллекция типовых культур) в лунку и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. В случае ADNP моноядерные клетки периферической крови (PBMC) отбирали у здоровых доноров крови с использованием лизиса эритроцитов при добавлении раствора для лизиса аммоний хлорид/калия (ACK) (Thermo fisher), добавляли 5×10^4 клеток в лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем первичные клетки крови окрашивали анти-Cd66b Pac blue детектирующим антителом (BioLegend). В случае ADCD лиофилизированный комплемент морской свинки разбавляли в соответствии с инструкциями фирмы производителя (Cedarlane) водой и добавляли по 4 мкл на лунку в желатин-верональном буферном растворе, содержащем Mg^{2+} и Ca^{2+} (GVB++, Boston BioProducts), к иммунным комплексам в течении 20 мин при 37°C. После двукратной промывки 15 мМ ЭДТА в PBS иммунные комплексы окрашивали конъюгированной с флуоресцеином фракцией козьего IgG против комплемента C3 морской свинки (MpBio). После инкубации с THP-s и окрашивания клеток для ADNP и ADCD образцы клеток фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) и собирали образцы методом проточной цитометрии (Intellicyt, iQue Screener plus) с использованием манипулятора робота (PAA). Все события гейтировали для отдельных клеток и событий, положительных для микросфер в случае ADCP и ADNP показатель фагоцитоза рассчитывали по формуле: доля положительных к микросферам клеток × GMFI/1000. В случае ADCD регистрировали медиану положительных событий C3. Все образцы анализировали в двух повторах в разные дни.

ADNKA

Для анализа ответов, связанных с NK клетками, использовали анализ на основе ИФА. Поэтому в 96-луночные планшеты для ИФА (Thermo Fisher) наносили S белок 2019-nCoV при 37°C в течение 2 ч. Затем планшеты промывали и блокировали 5% BSA в PBS в течение ночи при 4°C. NK клетки выделяли из лейкоцитарных пленок здоровых доноров (центр доноров крови MGH) с использованием набора для выделения RosetteSep (Stem Cell

Technologies) и NK клетки выдерживали в течении ночи при добавлении IL-15 (Stemcell). Образцы сыворотки разбавляли 1:50 и инкубировали при 37°C в течение 2 ч в планшетах для ИФА. Окрашивающую смесь, содержащую краситель анти-CD107a-PE-Cy5 (BD), брефельдин A (Sigma) и GolgiStop (BD), добавляли к NK клеткам, добавляли 5×10^4 NK клеток в лунку и инкубировали в течение 5 ч при 37°C. NK клетки фиксировали и подвергали пермеабилизации с использованием Perm A и B (Thermo Fisher), а поверхностные маркеры окрашивали на присутствие антител против CD16 APC-Cy7 (BD), против CD56 PE-Cy7 (BD) и против CD3 AlexaFluor 700 (BD). Внутриклеточное окрашивание включало анти-IFNγ APC (BD) и анти-MIP-1β PE (BD). Накопление данных осуществляли с использованием проточной цитометрии iQue (Intellicyt), оснащенной роботом-манипулятором (PAA). NK клетки определяли как CD3-, CD16+ и CD56+. Анализ ADNKA выполняли в двух повторах у двух доноров крови.

Анализ

Все изотипы/подклассы, данные связывания с Fc-рецептором и данные ADCD были преобразованы в $\log_{10}$. Для лепестковых графиков перед использованием среднего значения внутри группы каждое свойство антител нормализовали таким образом, чтобы его минимальное значение равнялось 0, а максимальное значение равнялось 1 в пределах группы. Анализ основных компонентов (PCA) был разработан с использованием пакета R «ropls» для сравнения многомерных профилей. Полностью защищенных животных определяли как не имеющих детектируемых копий sgmРНК/мл в образцах BAL и NS. Полностью защищенных по сравнению с частично защищенными и незащищенными животными анализировали с использованием двустороннего критерия Манна-Уитни. Для визуализации на тепловой карте указаны различия между значениями средних показателей z-оценки для полностью и частично защищенных групп. Для обозначения значимости на тепловой карте использовали поправку Бенджамини-Хохберга для корректировки множественных сравнений. Для оценки способности признаков и их комбинаций прогнозировать защиту, модели логистической регрессии обучали для 100 повторений в рамках 10-кратной перекрестной проверки, и рассчитывали площади под кривыми характеристик оператора приемника (AUROC). Были

проверены все возможные комбинации двух признаков. Для этого использовали R-пакеты «glm» и «pROC».

Анализ ELISPOT

На планшеты ELISPOT наносили мышиные моноклональные антитела против человеческого IFN-γ (BD Pharmingen) при концентрации 5 мкг/лунка в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали DPBS, содержащим 0,25% Твин20, и блокировали средой R10 (RPMI, содержащей 11% FBS и 1,1% пенициллин-стрептомицин) в течение 1 ч при 37°C. Собранные фракции пептидов Spike 1 и Spike 2 содержали пептиды из 15 аминокислот, перекрывающиеся с 11 аминокислотами, которые охватывают последовательность белка и отражают N- и C-концевые половины белка, соответственно. Пептидные фракции Spike 1 и Spike 2 получали при концентрации 2 мкг/лунка и добавляли 200000 клеток/лунка. Пептиды и клетки инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C. Все этапы, следующие за этой инкубацией, выполняли при комнатной температуре. Планшеты промывали буферным раствором для анализатора и инкубировали в течение 2 ч с кроличьим поликлональным антителом человека IFN-γ биотин (U-Cytech, 1 мкг/мл). Планшеты промывали второй раз и инкубировали в течение 2 ч с антителами к стрептавидин-щелочной фосфатазе (Southern Biotechnology, 1 мкг/мл). После окончательной промывки добавляли раствор субстрата Nitor-blue хлорида тетразолия/5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат-пара-толудиновой соли (хромаген NBT/BCIP) в течение 7 мин. Хромаген удаляли, планшеты промывали водой и сушили в темном месте в течение 24 ч. Планшеты сканировали и считывали на анализаторе Immunospot Analyzer фирмы Cellular Technologies Limited.

Анализ окрашивания внутриклеточных цитокинов

10^6 PBMC на лунку ресуспендировали в 100 мкл среды R10, содержащей моноклональное антитело CD49d (1 мкг/мл). Каждый образец оценивали с использованием контрольного образца (100 мкл R10 плюс 0,5% ДМСО, фоновый контроль), пептидных фракций (2 пкг/мл) или 10 мкг/мл ацетата-форболмиристата (ФМА) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich, 100 мкл, положительный контроль) и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 0,25 мкл GolgiStop и 0,25 мкл GolgiPlug в 50 мкл R10 и инкубировали при 37°C в течение 8 ч, а затем выдерживали при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки дважды промывали DPBS,

окрашивали красителем live/dead в ближней ИК области в течение 10 мин, а затем окрашивали предварительно установленными титрами mAb против CD279 (клон EH12.1, BB700), CD38 (клон OKT10, PE), CD28 (клон 28.2, PE CY5), CD4 (клон L200, BV510), CD45 (клон D058-1283, BUV615), CD95 (клон DX2, BUV737), CD8 (клон SK1, BUV805) в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали 2% буферным раствором FBS/DPBS и инкубировали в течение 15 мин в смеси с 200 мкл раствора BD CytoFix/CytoPerm Fixation/Permeabilization. Клетки дважды промывали 1X Perm Wash буферным раствором (BD Perm/WashTM 10X в наборе CytoFix/CytoPerm Fixation/Permeabilization, разбавленным водой MilliQ и пропущенным через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм) и окрашивали внутриклеточно моноклональными антителами против Ki67 (клон B56, FITC), CD69 (клон TP1.55.3, ECD), IL10 (клон JES3-9D7, PE CY7), IL13 (клон JES10-5A2, BV421), TNF-α (клон Mab11, BV650), IL4 (клон MP4-25D2, BV711), IFN-γ (клон B27; BUV395), IL2 (клон MQ1-17H12, APC), CD3 (клон SP34.2, Alexa 700) в течение 30 мин. Клетки дважды промывали буферным раствором 1X Perm Wash и фиксировали 250 мкл свежеприготовленного 1,5% формальдегида. Фиксированные клетки переносили в 96-луночный круглодонный планшет и анализировали в системе BD FACSymphonyTM.

Статистический анализ

Анализ вирусологических и иммунологических данных проводили с использованием GraphPad Prism 8.4.2 (программное обеспечение GraphPad). Сравнение данных между группами проводили с использованием двусторонних критериев Манна-Уитни. Корреляции оценивали с использованием двусторонних критериев ранговой корреляции Спирмена. Значение P менее 0,05 считалось значимым.

Результаты

Получение и иммуногенность вакцин-кандидатов Ad26

Было получено семь векторов Ad26, экспрессирующих варианты S белка 2019-nCoV, отражающие различные промотеры, формы антигена и стабилизирующие мутации: (i) лидерная последовательность тканевого активатора плазминогена (tPA) с полноразмерным S белком (tPA.S (SEQ ID NO: 1, с лидерной последовательностью tPA, соединенной с N-концом))[12], (ii) лидерная последовательность tPA с полноразмерным S белком с мутацией сайта расщепления фурином и двумя стабилизирующими пролин мутациями (tPA.S.PP

(SEQ ID NO: 23), с лидерной последовательностью tPA, соединенной с N-концом))[13-15], (iii) лидерная последовательность дикого типа с нативным полноразмерным S белком (S (SEQ ID NO: 29)), (iv) лидерная последовательность дикого типа с S белком с делецией цитоплазматического хвоста (S.dCT (SS-SdCT) (SEQ ID NO: 30))[16], (v) тандемные лидерные последовательности tPA и дикого типа с полноразмерным S белком (tPA.WT.S (SEQ ID NO: 29), с лидерной последовательностью tPA, соединенной с N-концом))[12], (vi) лидерная последовательность дикого типа с S белком с делецией трансмембранной области и цитоплазматического хвоста, отражающая растворимый эктодомен, с мутацией участка расщепления фурином, мутациями, стабилизирующими пролин, и домен тримеризации фолдона (S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) (SEQ ID NO: 56))[15], и (vii) лидерная последовательность дикого типа с полноразмерным S белком с мутацией участка расщепления фурином и мутациями, стабилизирующими пролин (S.PP (SS-Spike-dF-PP) (SEQ ID NO: 51)) (фиг. 38a). Анализ вестерн-блоттингом подтвердил экспрессию S в клеточных лизатах из всех векторов (фиг. 38b). 52 взрослых макак резус в возрасте 6-12 лет иммунизировали векторами Ad26, экспрессирующими tPA.S (N=4), tPA.S.PP (N=4), S (N=4), S.dCT (SS- SdCT) (N=4), tPA.WT.S (N=4), S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) (N=6), S.PP (SS-Spike-dF-PP) (N=6) и контрольные животные (N=20). Животных однократно иммунизировали 10^{11} вирусными частицами (в.ч.) векторов Ad26 внутримышечно без адъюванта на неделе 0. RBD-специфические связывающие антитела наблюдали методом ИФА у 31 из 32 вакцинированных животных на неделе 2 и у всех вакцинированных животных на неделе 4 (фиг. 39a). Ответы нейтрализующих антител (NAb) оценивали с использованием как анализа нейтрализации псевдовируса[9, 10, 16] (фиг. 39b), так и анализа нейтрализации жизнеспособного вируса[9, 10, 17, 18] (фиг. 39c). Титры NAb, измеренные с помощью обоих анализов, наблюдали у большинства вакцинированных животных на неделе 2 и в большинстве случаев они увеличивались на неделе 4. Вакцина Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP) вызывала самые высокие титры псевдовируса NAb (средняя величина 408, диапазон 208–643) и титры NAb жизнеспособных вирусов (средняя величина 113, диапазон 53–233) на неделе 4. Титры NAb псевдовирусов коррелировали как с титрами ИФА, так и с титрами NAb жизнеспособных вирусов ($P<0,0001$, $R=0,8314$ и $P<0,0001$, $R=0,8427$, соответственно, двусторонний критерий

ранговой корреляции Спирмена, фиг. 45). Средние титры NAb у макак, вакцинированных Ad26-S.PP, в 4 раза превышали средние титры NAb в ранее опубликованных когортах из 9 выздоравливающих макак[9] и 27 выздоравливающих людей после выздоровления от инфекции 2019-nCoV[10] (фиг. 46). Вакцина Ad26-S.PP также индуцировала низкие, но обнаруживаемые S-специфические ответы IgG и IgA в образцах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) (фиг. 47).

S-специфические и RBD-специфические ответы антител у вакцинированных животных были дополнительно охарактеризованы с помощью системной серологии[19]. Наблюдали различные эффекторные функции Fc, включая антителозависимый фагоцитоз нейтрофилов (ADNP), антителозависимый клеточный фагоцитоз моноцитов (ADCP), антителозависимое отложение комплемента (ADCD) и антителозависимую активацию NK клеток (ADNKA), а также множественные подклассы Ig и связывание FcR (фиг. 39d, фиг. 48). Самые высокие ответы связывающих антител наблюдали при анализе вакцин Ad26-tPA.S.PP и Ad26-S.PP, а самые высокие ответы эффекторной функции наблюдали при действии вакцины Ad26-S.PP. Анализ основных компонентов показал существенное перекрытие групп вакцин, хотя группа Ad26-S.PP оказалась наиболее отличающейся (фиг. 39d). Индукцию клеточных иммунных ответов наблюдали у 30 из 32 вакцинированных животных на неделе 4 по данным анализов IFN-γ ELISPOT и с использованием собранных S-пептидов (фиг. 40a). Многопараметрические анализы окрашивания внутриклеточных цитокинов использовали для оценки ответов Т клеток IFN-γ+ CD4+ и CD8+ (фиг. 40b). Ответы оказались сопоставимыми в большинстве вакцинных групп, хотя наблюдалась тенденция к более низким клеточным иммунным ответам при использовании вакцины Ad26-S.PP. Ответы IFN-γ+ и IL-2+ CD4+ Т клеток превышали ответы IL-4+ и IL-10+ CD4+ Т-клеток (фиг. 49) для вакцины Ad26-S.dTM.PP (Ad26 SS-S.Ecto -dF-PP-foldon) и вакцины Ad26-S.PP, что предполагает индукцию Th1-смещенных ответов.

Защитная эффективность вакцин-кандидатов Ad26

На неделе 6 всех животных заражали в дозе $1,2x10^8$ вч ($1,1x10^4$ PFU) вируса 2019-nCoV интраназальным (IN) и интратрахеальным (IT) методами[9,10]. Вирусную нагрузку в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) и мазках из носа (NS)

оценивали с использованием ОТ-ПЦР на субгеномную иРНК (sgmPHK), которая, как полагают, является мерой репликации вируса[9,20]. Все 20 плацебо-контрольных животных инфицировали и по данным анализа средний пик составлял $\log_{10}$ копий sgmPHK/мл 4,89 (диапазон 3,85-6,51) в BAL (фиг. 41a). Напротив, у животных, которым вводили Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP), вирус не обнаруживался в образцах BAL (предел количественного определения 1,69 $\log_{10}$ копий sgmRNA/мл). Существенную защиту также наблюдали с использованием других вакцин, хотя у отдельных животных обнаруживали низкие уровни sgmPHK в образцах BAL (фиг. 41b). Аналогичным образом у контрольных животных наблюдали средний пик 5,59 (диапазон 3,78-8,01) $\log_{10}$ sgmPHK в NS (фиг. 41c). Только у одного из животных, которым вводили вакцину Ad26-S.PP, было выявлено низкое количество вируса в образцах NS. У животных, которым вводили другие вакцины, обычно наблюдали сниженную вирусную нагрузку в образцах NS по сравнению с контролем, хотя защита была оптимальной при использовании Ad26-S.PP (фиг. 41d).

При сравнении пиковых вирусных нагрузок у вакцинированных животных было установлено, что защита в образцах BAL в целом является более надежной по сравнению с образцами NS (фиг. 42). Вакцина Ad26-S.PP обеспечивала полную защиту как в нижних, так и в верхних дыхательных путях, за исключением одного животного, у которого было обнаружено небольшое количество вируса в образцах NS, что привело к снижению среднего пика sgmPHK >3,2 и >3,9 $\log_{10}$ в образцах BAL и NS, соответственно, по сравнению с плацебо-контролем ($P<0,0001$ и $P<0,0001$, соответственно, двусторонний критерий Манна-Уитни) (фиг. 42). Из 32 вакцинированных макак 17 животных были полностью защищены и у них обнаруживаемая sgmPHK в образцах BAL или NS после заражения отсутствовала, еще у 5 животных sgmPHK в образцах BAL также отсутствовала, но в образцах NS присутствовало некоторое количество вируса.

Иммунные корреляты защиты

Объем этого исследования и вариабельность результатов с различными конструктами вакцин облегчили анализ иммунных коррелятов. Титр $\log_{10}$ ИФА, титр NAb псевдовируса и титр NAb жизнеспособного вируса на неделе 2 и неделе 4 обратно пропорционально коррелировали с пиком $\log_{10}$ sgmPHK как в образцах BAL (фиг. 43), так и в образцах NS (фиг. 50-52). В целом на неделе 4

наблюдалась более высокая корреляция титров по сравнению с титрами на 2-й неделе, а корреляция титров NAb более высокая по сравнению с титрами ИФА. Титр NAb псевдовируса $\log_{10}$ и титр NAb жизнеспособного вируса на неделе 4 обратно пропорционально коррелировали с пиком $\log_{10}$ sgmPHK в образцах BAL ($P<0,0001$, $R=-0,6880$ и $P<0,0001$, $R=-0,6562$, соответственно, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена, фиг. 43b-c) и в образцах NS ($P<0,0001$, $R=-0,5839$ и $P<0,0001$, $R=-0,5714$, соответственно, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена, фиг. 51 и 52). Вместе с ранее опубликованными данными[10] эти результаты свидетельствуют о том, что титры сывороточных антител могут оказаться пригодным иммунным коррелятом защиты с использованием вакцин против 2019-nCoV. Напротив, вызванные вакциной ответы ELISPOT, ответы CD4+ ICS и ответы CD8+ ICS не коррелировали с защитой.

Для получения более глубокого представления о корреляции антител с защитой определяли параметры антител, которые отличали полностью защищенных животных (определяемых как животные без детектируемой sgmPHK в образцах BAL или NS после заражения) и частично защищенных или незащищенных животных. Титр NAb представлял собой параметр, наиболее обогащенный у полностью защищенных животных по сравнению с частично защищенными или незащищенными животными ($P = 0,0009$, двусторонний критерий Манна-Уитни) с последующим анализом ADNKA ($P = 0,0044$) и ADCP ($P = 0,0092$) (фиг. 43d, фиг. 53). Кроме того, логистический регрессионный анализ свидетельствовал о том, что использование двух характеристик, таких как титры NAb и ответы FcγR2A-3, IgM или ADCD, повышало степень корреляции с защитой (фиг. 43d). Эти данные свидетельствуют также о том, что NAb в первую очередь отвечают за защиту от 2019-nCoV, но другие связывающие и функциональные антитела также могут принимать в ней участие.

Иммунный ответ у вакцинированных животных после заражения

У плацебо-контрольных животных и у большинства вакцинированных животных к дню 14 после заражения 2019-nCoV развились значительно более высокие ответы псевдовируса NAb (фиг. 44a, фиг. 54), а также ответы Т клеток CD8+ и CD4+ (фиг. 44b). Ответы CD8+ и CD4+ Т клеток были направлены против нескольких белков 2019-nCoV, включая шиповидные (S1, S2), нуклеокапсидные (NCAP) и неструктурные белки (NS6, NS7a, NS8) у этих

животных (фиг. 44b). Напротив, у животных, которым вводили вакцину Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP), не наблюдали анамнестические ответы NAb (фиг. 44a), а наблюдался только низкий Т клеточный ответ против шиповидного белка (S1, S2) (фиг.44b), который представлял собой вакцинный антиген после заражения. Эти результаты согласуются в значительной степени с недетектируемой вирусной нагрузкой у животных, вакцинированных Ad26-S.PP (фиг. 41 и 42), и позволяют предположить о чрезвычайно низких уровнях репликации вируса у этих животных, если таковые вообще имеются после заражения.

Обсуждение

Разработка безопасной и эффективной вакцины против 2019-nCoV представляет собой важнейший глобальный приоритет. Эти данные свидетельствуют о том, что однократная иммунизация вектором Ad26, экспрессирующим стабилизированный до слияния S-иммуноген, индуцировала устойчивые ответы NAb и обеспечивала полную или почти полную защиту от заражения 2019-nCoV у макак резус. Оптимальная вакцина, оцененная в данном исследовании, представляла собой вектор Ad26-S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP), содержащий лидерную последовательность дикого типа, полноразмерный мембраносвязанный S, мутацию сайта расщепления фурином и две стабилизирующие мутации пролина[15].

Эти данные дополняют недавние доклинические исследования инактивированных вирусных вакцин и ДНК-вакцин против 2019-нКоВ на приматах[10,21]. Для инактивированных вирусных вакцин, вакцин на основе нуклеиновых кислот и вакцин на основе белковых субъединиц обычно необходимы две или более иммунизаций, в то время как аденовирусные векторы могут индуцировать долговременные и стабильные ответы NAb после однократной иммунизации[22-24]. Однократная вакцина против 2019-nCoV характеризуется важными логистическими и практическими преимуществами по сравнению с двухдозовой вакциной для кампаний массовой вакцинации и борьбы с пандемией. Тем не менее, гомологичная бустерная иммунизация векторами Ad26-ВИЧ может увеличить титры антител более чем в 10 раз как у нечеловекообразных приматов, так и у людей[25-27,] что позволяет предположить, что как однодозовые, так и двухдозовые схемы вакцинации Ad26-S.PP представляют собой эффективные подходы.

Вектор Ad26-S.PP индуцировал стабильные ответы NAb после однократной иммунизации и обеспечивал полную защиту от заражения 2019-nCoV, за исключением одного животного с низким уровнем вируса в образцах NS. Более того, титры NAb и ответы Т клеток у животных, вакцинированных Ad26-S.PP, не увеличивались после заражения, и ответы Т клеток также не увеличивались на невакцинные антигены, такие как нуклеокапсидные и неструктурные белки. Напротив, контроли плацебо и другие вакцины вызывали более высокие титры NAb и Т клеточный ответ на множество белков 2019-nCoV после заражения, что согласуется с предыдущими наблюдениями при исследовании ДНК-вакцин[10]. Эти данные свидетельствуют о минимальной или нулевой репликации вируса у животных, вакцинированных Ad26-S.PP, после заражения 2019-nCoV, что, вероятно, связано с более высоким ответом NAb у этих животных.

Вызванные вакциной титры NAb до заражения коррелировали с защитой как в образцах BAL, так и в образцах NS после заражения, что согласуется с предыдущими исследованиями[10]. Эти данные свидетельствуют о том, что титры NAb в сыворотке можно использовать в качестве потенциального биомаркера защитного действия вакцины, хотя это необходимо подтвердить в дополнительных исследованиях эффективности вакцины против 2019-nCoV как на нечеловекообразных приматах, так и на людях. Кроме того, дополнительные функциональные ответы антител могут также способствовать защите, такие как ответы ADNKA, ADCP и ADCD. Роль Т клеточного ответа в защитном действии вакцины еще предстоит определить, и тенденция к более низким клеточным иммунным ответам на вектор Ad26-S.PP по сравнению с другими векторами требует дальнейшего изучения. Вакцины Ad26-S.dTM.PP (Ad26 SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) и Ad26-S.PP вызывали скорее Th1-смещенный, а не Th2-смещенный ответ CD4+ Т клеток, и у животных с субзащитными титрами NAb не наблюдалась усиленная вирусная репликация или клиническое заболевание. Эти данные свидетельствуют против возможности антителозависимого усиления инфекции[28].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что однократная иммунизация вакцинами на основе вектора Ad26 против 2019-nCoV вызывала стабильные титры NAb и обеспечивала полную или почти полную защиту от заражения 2019-nCoV у макак резус. Идентификация коррелята

защиты NAb подтверждает эффективность этих вакцин против 2019-nCoV для клинического применения. Можно предположить, что оптимальная вакцина Ad26-S.PP, описанная в данном исследовании, так называемая Ad26.COV2.S, будет эффективной для людей.

Список литературы

1. Wu F. и др. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature, т. 579, сс. 265-269, doi:10.1038/s41586-020-2008-3 (2020).

2. Zhou P. и др. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature, т. 579, сс. 270-273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7 (2020).

3. Holshue M. L. и др. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. N Engl J Med, т. 382, сс. 929-936, doi:10.1056/NEJMoa2001191 (2020).

4. Li Q. и др. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. N Engl J Med, doi:10.1056/NEJMoa2001316 (2020).

5. Zhu N. и др. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med, т. 382, сс. 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017 (2020).

6. Chen N. и др. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet, т. 395, сс. 507-513, doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7 (2020).

7. Huang C. и др. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet, т. 395, сс. 497-506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5 (2020).

8. Chan J. F. и др. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. Lancet, т. 395, сс. 514-523, doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9 (2020).

9. Chandrashekar A. и др. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020).

10. Yu J. и др. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020).

11. Abbink P. и др. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. J Virol. T. 81, сс. 4654-4663, doi:JVI.02696-06 [pii] 10.1128/JVI.02696-06 (2007).

12. Alharbi N. K. и др. ChAdOx1 and MVA based vaccine candidates against MERS-CoV elicit neutralising antibodies and cellular immune responses in mice. Vaccine, т. 35, сс. 3780-3788, doi:10.1016/j.vaccine.2017.05.032 (2017).

13. Kirchdoerfer R. N. и др. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. Nature, т. 531, сс. 118-121, doi:10.1038/nature17200 (2016).

14. Pallesen J. и др. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. Proc Natl Acad Sci USA, т. 114, сс. E7348-E7357, doi:10.1073/pnas.1707304114 (2017).

15. Wrapp D. и др. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science, т. 367, сс. 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).

16. Yang Z. Y. и др. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. Nature, т. 428, сс. 561-564, doi:10.1038/nature02463 (2004).

17. Scobey T. и др. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci USA, т. 110, сс. 16157-16162, doi:10.1073/pnas.1311542110 (2013).

18. Yount B. и др. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci USA, т. 100, сс. 12995-13000, doi:10.1073/pnas.1735582100 (2003).

19. Chung A. W. и др. Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. Cell, т. 163, сс. 988-998, doi:10.1016/j.cell.2015.10.027 (2015).

20. Wolfel R. и др. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2196-x (2020).

21. Gao Q. и др. Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. Science, doi:10.1126/science.abc1932 (2020).

22. Abbink P. и др. Durability and correlates of vaccine protection against Zika virus in rhesus monkeys. Sci Transl Med, т. 9, doi:10.1126/scitranslmed.aao4163 (2017).

23. Abbink P. и др. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. Science, т. 353, сс. 1129-1132, doi:10.1126/science.aah6157 (2016).

24. Cox F. и др. Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge. PLoS ONE, т. 13, с. e0202820, doi:10.1371/journal.pone.0202820 (2018).

25. Barouch D. H. и др. Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19). Lancet, т. 392, сс. 232-243, doi:10.1016/S0140-6736(18)31364-3 (2018).

26. Barouch D. H. и др. Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. Science, т. 349, сс. 320-324, doi:10.1126/science.aab3886 (2015).

27. Baden L. R. и др. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). J Infect Dis, т. 207, сс. 240-247, doi:10.1093/infdis/jis670 (2013).

28. Graham B. S. Rapid COVID-19 vaccine development. Science, doi:10.1126/science.abb8923 (2020).

29. Brown E. P. и др. Multiplexed Fc array for evaluation of antigen-specific antibody effector profiles. J Immunol Methods, т. 443, сс. 33-44, doi:10.1016/j.jim.2017.01.010 (2017).

30. Ackerman M. E. и др. A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. J Immunol Methods, т. 366, сс. 8-19, doi:10.1016/j.jim.2010.12.016 (2011).

31. Lu L. L. и др. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. Cell, т. 167, сс. 433-443 e414, doi:10.1016/j.cell.2016.08.072 (2016).

32. Fischinger S. и др. A high-throughput, bead-based, antigen-specific assay to assess the ability of antibodies to induce complement activation. J Immunol Methods, т. 473, с. 112630, doi:10.1016/j.jim.2019.07.002 (2019).

Пример 12.

Однодозовая вакцина защищает от тяжелой формы клинического заболевания 2019-nCoV у хомяков

Заболевание COVID-19 у людей часто является клинически легкой формой заболевания, но у некоторых людей развивается тяжелая форма пневмонии, дыхательной недостаточности и смертельный исход[1-4]. Исследования инфекции SARS-CoV-2 (2019-nCoV) у хомяков[5-7] и

нечеловекообразных приматов[8-10] обычно свидетельствуют о легкой форме заболевания, а в ходе доклинических исследований вакцины против SARS-CoV-2 было установлено снижение репликации вируса в верхних и нижних дыхательных путях у нечеловекообразных приматов[11-13].

Как обсуждается ниже, интраназальное инфицирование высокими дозами SARS-CoV-2 у хомяков приводит к тяжелой форме клинического заболевания, включая высокий уровень репликации вируса в тканях, обширную пневмонию, потерю веса и смертность у субпопуляции животных. Однократная иммунизация вакциной на основе вектора аденовируса серотипа 26 (Ad26), экспрессирующей нуклеотид (SS-Spike-dF-PP, SEQ ID NO: 204), кодирующий стабилизированный шиповидный (S) белок SARS-CoV-2 (SS-Spike-dF-PP, SEQ ID NO: 51), вызывала реакции связывающих и нейтрализующих антител и защищала от индуцированной SARS-CoV-2 потери веса, пневмонии и смертности. Полученные данные свидетельствуют о защитном действии вакцины от клинического заболевания SARS-CoV-2. Данная модель должна оказаться пригодной для доклинических исследований вакцин, терапевтических средств и патогенеза SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Животные и дизайн исследования

70 самцов и самок сирийских золотистых хомячков (Envigo) в возрасте 10-12 недель рандомизировали по группам. Все животные содержались в условиях Bioqual, Inc. (Роквилл, Мэриленд). Животным вводили векторы Ad26, экспрессирующие нуклеотид (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon, SEQ ID NO: 195), кодирующий S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon, SEQ ID NO: 56).) или нуклеотид (SS-Spike-dF-PP, SEQ ID NO: 204), кодирующий S.PP (SS-Spike-dF-PP, SEQ ID NO: 51), или контроли плацебо (N=10/группа). Животных однократно иммунизировали в дозе 10^{10} или 10^{9} вч векторов Ad26 внутримышечно без адъюванта на неделе 0. На неделе 4 всех животных заражали дозой вируса $5{,}0x10^{5}$ $TCID_{50}$ ($6x10^{8}$ вч, $5{,}5x10^{4}$ PFU) или $5{,}0x10^{4}$ $TCID_{50}$ ($6x10^{7}$ вч, $5{,}5x10^{3}$ PFU) SARS-CoV-2, полученного после пересеивания из культуры USA-WA1/2020 (NR-52281, ресурсы BEI)[10]. Вирус вводили интраназально (IN) в объеме 100 мкл (по 50 мкл в каждую ноздрю). Массу тела оценивали ежедневно. Все иммунологические и вирусологические анализы проводили слепым методом. В день 4 часть животных умервщляли для оценки

вирусной нагрузки и патологии в ткани. Все исследования на животных проводили в соответствии со всеми соответствующими местными, государственными и федеральными нормами и были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных в условиях Bioqual (IACUC).

Векторы Ad26

Векторы Ad26 конструировали с использованием двух вариантов последовательности шиповидного белка (S) SARS-CoV-2 (Wuhan/WIV04/2019; Genbank MN996528.1). Последовательности оптимизировали по кодонам и синтезировали. Некомпетентные к репликации Ad26-векторы[19] с делецией E1/E3- получали в клетках PER.C6.TetR с использованием плазмиды, содержащей полный геном вектора Ad26 и экспрессионную кассету трансгена. Контроли плацебо включали векторы Ad26-Empty. Векторы секвенировали и тестировали на экспрессию перед использованием.

Гистопатология и иммуногистохимия

Ткани фиксировали в свежеприготовленном 4% параформальдегиде в течение 24 ч, переносили в 70% этанол, заливали парафином в течение 7-10 дней и готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы нагревали в течение 30–60 мин при 65°C, затем депарафинизировали в ксилоле и регидратировали с использованием растворов с постепенно понижающейся концентрацией этанола до дистиллированной воды. В случае SARS-CoV-N, Iba-1 и CD3 IHC высокотемпературную демаскировку антигена (HIER), выполняли с использованием скороварки на пару в течение 25 мин в цитратном буферном растворе (Thermo, AP-9003-500) с последующей обработкой 3% перекисью водорода. Затем срезы промывали в дистиллированной воде и блокировали белком (BioCare, BE965H) в течение 15 мин, и промывали в 1x фосфатно-солевом буферном растворе. Первичное кроличье антитело против нуклеопротеина SARS-CoV (Novus, NB100-56576 в разведении 1:500 или 1:1000), кроличье антитело против Iba-1 (Wako, 019-19741 в разведении 1:500) или кроличье анти-CD3 (Dako, A0452 в разведении 1:300) наносили в течении 30 мин, затем наносили кроличий конъюгат Mach-2 HRP-Polymer (BioCare, RHRP520L) в течении 30 мин, и контрокрашивали гематоксилином с последующим нанесением подсиняющего 0,25% водного раствора аммиака. Маркировку для SARS-CoV-N, Iba-1 и CD3 проводили в системе автостейнера

Biogenex i6000 (v3.02). В некоторых случаях окрашивание CD3, Iba-1 и ACE-2 проводили при разведении CD3 в соотношении 1:400 (Thermo Cat. No. RM-9107-S, клон SP7), Iba-1 в соотношении 1:500 (BioCare Cat. № CP290A, поликлональные антитела) или ACE-2 (Abcam, ab108252), при этом все эти препараты детектировали с использованием кроличьего конъюгата Rabbit Polink-1 HRP (номер по каталогу GBI Labs D13-110). Ответ на нейтрофилы (MPO) и IFN 1 типа (Mx1) определяли с использованием MPO (Dako, кат. № A0398, поликлональные антитела) при детекции в разведении 1:1000 с использованием конъюгата Rabbit Polink-1 HRP и Mx1 (EMD Millipore, кат. № MABF938, клон M143/CL143) при детекции в разведении 1:1000 с использованием мышиного конъюгата Polink-2 HRP (номер по каталогу GBI Labs D37-110). Окрашивание CD3, Iba-1, MPO и Mx1 IHC проводили, как описано ранее, с использованием устройства для окрашивания Biocare intelliPATH, при этом все антитела инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Патологию тканей оценивали независимо друг от друга два ветеринарных патологоанатома.

Гибридизация RNASCOPE® *in situ*

Гибридизацию RNASCOPE® *in situ* проводили, как описано ранее[10], с использованием антисмыслового специфического зонда против SARS-CoV2 v-nCoV2019-S (ACD, кат. № 848561), направленного на положительно смысловую вирусную РНК, и смыслового специфического зонда против SARS-CoV2 v-nCoV2019- orf1ab-sense (ACD № по каталогу 859151), направленного на геномную антисмысловую вирусную РНК. Краткое описание метода: после депарафинизации срезов в ксилоле и повторной гидратации с использованием растворов с понижающейся концентрацией этанола до дистиллированной воды извлечение проводили в течение 30 мин в буферном растворе для извлечения ACD P2 (ACD, кат. № 322000) при 95–98 °C с последующей обработкой протеазой III (ACD № по каталогу 322337), разбавленной 1:10 в PBS в течение 20 мин при 40°C. Затем срезы инкубировали в присутствии 3% H_2O_2 в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Перед гибридизацией зонды центрифугировали при 13000 об/мин с использованием микроцентрифуги в течение 10 мин, затем разбавляли 1:2 в растворителе для зондов (ACD, кат. № 300041) для уменьшения тканевых артефактов агрегации зонда. Срезы обрабатывали с использованием реагентов RNASCOPE® 2.5 HD Detection-RED (ACD № по каталогу 322360).

Количественный анализ изображений

Количественный анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения HALO (v2.3.2089.27 или v3.0.311.405, Indica Labs) по крайней мере на одном поперечном срезе доли легкого от каждого животного. В тех случаях, когда было доступно более 1 поперечного сечения каждую долю легкого оценивали количественно как отдельную точку. В случае SARS-CoV-N использовали алгоритм Multiplex IHC v2.3.4 со скринингом исключения для кислого гематина для определения долиа клеток, положительных к белку SAR-N, в процентах в расчете на общее число клеток. В случае Iba-1 для количественного определения использовали алгоритм Multiplex IHC v2.3.4. Для количественной оценки SARS-CoV-2 RNASCOPE® ISH и Mx1 использовали модуль Area Quantification v2.1.3 для определения доли общего антисмыслового или смыслового зонда SARS-CoV-2 или белка Mx1 в процентах в расчете на общую площадь ткани. Для количественного определения MPO (нейтрофилов) и CD3+ клеток срезы подписывали таким образом, чтобы исключить кровеносные сосуды (> 5 $мм^2$), бронхи, бронхиолы, хрящи и соединительную ткань, затем модуль Cytonuclear v1.6 использовали для обнаружения клеток MPO+ или CD3+, количество которых рассчитывали как долю от общей альвеолярной ткани (PMN/$мм^2$), которую определяли с использованием модуля Area Quantification v2.1.3. Во всех случаях для каждого образца проводили проверку всех изображений вручную, чтобы убедиться в точности подписей.

Анализ субгеномной иРНК

Субгеномную иРНК гена E SARS-CoV-2 (sgmPHK) оценивали с использованием ОТ-ПЦР и праймеров и зондов, как описано ранее[10,11,23]. Краткое описание метода: общую РНК экстрагировали из гомогенатов тканей из нескольких анатомических участков с использованием набора QIAcube HT (Qiagen) и RNeasy 96 QIAcube HT (Qiagen). Стандартную кривую строили с использованием sgmPHK гена E SARS-CoV-2 при клонировании в экспрессионную плазмиду pcDNA3.1, эту вставку транскрибировали с использованием набора для создания сообщений AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker (Cellscript). Перед проведением ОТ-ПЦР образцы, полученные от зараженных животных, или стандарты подвергали обратной транскрипции с использованием Superscript III VILO (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Был разработан специальный анализ экспрессии генов Taqman

(ThermoFisher Scientific) с использованием последовательностей, направленных на sgmРНК гена E. Реакции проводили в системах ПЦР в реальное время QuantStudio 6 и 7 Flex (Applied Biosystems) в соответствии со спецификациями производителя. Для расчета копий sgmРНК на грамм ткани использовали стандартные кривые, чувствительность количественного анализа составляла 100 копий.

ИФА

RBD-специфические связывающие антитела оценивали с помощью ИФА в основном, как описано в работах[10,11]. Краткое описание метода: на 96-луночные планшеты наносили 1 мкг/мл белка RBD SARS-CoV-2 (Aaron Schmidt, MassCPR) или 1 мкг/мл шиповидного S белка SARS-CoV-2 (Sino Biological) в растворе 1X DPBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты однократно промывали буферным раствором для промывки (0,05% Твин20 в 1X DPBS) и блокировали 350 мкл раствора казеина для блокировки на лунку в течение 2–3 ч при комнатной температуре. После инкубации раствор для блокировки удаляли, а планшеты вытирали насухо. В лунки добавляли трехкратные серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки в растворе казеина для блокировки и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, планшеты трижды промывали, затем инкубировали в течение 1 ч в присутствии 0,1 мкг/мл анти-хомячкового конъюгата IgG HRP (Southern Biotech) в растворе казеина для блокировки при комнатной температуре в темноте. Планшеты трижды промывали, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл старт-раствора SERACARE® KPL TMB SUREBLUE®, реакцию в планшете останавливали добавлением 100 мкл стоп-раствора SERACARE® KPL TMB на лунку. Поглощение при 450 нм регистрировали с использованием ридера для микропланшетов VERSAMAXTM или OMEGA®. Конечные титры ИФА определяли как самое высокое обратное разведение сыворотки, при котором поглощение превышало фоновое в 2 раза.

Анализ нейтрализации псевдовирусов

Псевдовирусы SARS-CoV-2, экспрессирующие репортерный ген люциферазы, получали с использованием подхода, аналогичного описанному ранее[10,11,21]. Краткое описание метода: пакующий конструкт psPAX2 (AIDS Resource and Reagent Program), люциферазную репортерную плазмиду pLenti-CMV Puro-Luc (Addgene), экспрессирующую pcDNA3.1-SARS CoV-2 SΔCT

шиповидный белок, совместно трансфектировали в клетки HEK293T с помощью липофектамина 2000 (ThermoFisher). Супернатанты, содержащие вирусы псевдотипа, собирали через 48 ч после трансфекции, вирусы псевдотипа очищали фильтрованием через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Для определения нейтрализующей активности антисыворотки вакцинированных животных клетки HEK293T-hACE2 высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур при плотности $1,75\times10^4$ клеток/лунка в течение ночи. Готовили трехкратные серийные разведения образцов сыворотки, инактивированной нагреванием, и смешивали с 50 мкл псевдовируса. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч перед добавлением к клеткам HEK293T-hACE2. Через 48 ч после инфицирования клетки лизировали в условиях анализа люциферазы STEADY-GLO® Luciferase (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Титры нейтрализации SARS-CoV-2 определяли как разведение образца, при котором наблюдалось 50% снижение в единицах RLU по сравнению со средним значением для контрольных лунок с вирусом.

Анализ Luminex

Для определения относительного количества титров антиген-специфических антител проводили специфический анализ Luminex, как описано ранее[25]. Таким образом, флуоресцентно меченные микросферы (Luminex) конденсировали с антигенами SARS-CoV-2, включая шиповидный белок (S) (Eric Fischer, Институт рака Даны Фарбер), S1 и S2 (Sino Biological), а также связывающийся с рецептором домен (RBD) (Aaron Schmidt, Ragon Institute) через N-гидроксисукцинимидные связи (NHS)–в присутствии реагентов EDC (Thermo Scientific) и Sulfo-NHS (Thermo Scientific). $1,2\times10^3$ микросфер на область и антиген добавляли в 384-луночный планшет (Greiner) и инкубировали с разбавленной сывороткой (1:90 для IgG2a, IgG3, IgM, 1:500 для анализов связывания общего IgG и Fc-рецептора) в течение 16 ч при встряхивании при 900 об/мин при 4°C. После образования иммунных комплексов микросферы трижды промывали раствором 0,1% BSA и 0,05% Твин-20 (буферный раствор для анализа Luminex) с использованием автоматического устройства для промывки планшетов (Tecan). Меченые PE козьи антимышиные антитела IgG, IgG2a, IgG3 и IgM для детектирования (Southern Biotech) разводили в буферном растворе для анализа Luminex до 0,65 мкг/мл и инкубировали с микросферами в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании при 900 об/мин.

Аналогичным образом, для профилей связывания Fc-рецептора рекомбинантные мышиные FcγR2, FcγR3 и FcγR4 (Duke Protein Production) биотинилировали (Thermo Scientific) и конъюгировали со стрептавидином-PE в течение 10 мин перед добавлением в образцы (Southern Biotech). Эти мышиные антитела и белки проявляют перекрестную реактивность в отношении антител и белков хомяков. Микросферы с покрытием затем промывали и считывали на проточном цитометре iQue (Intellicyt), снабженным роботизированным манипулятором (PAA). События гейтировали для каждой области микросфер и данные представлены в виде средней флуоресценции PE для положительных событий микросфер. Образцы анализировали в двух повторах для каждого вторичного детектируемого агента.

Антителозависимое отложение комплемента (ADCD)

Анализ ADCD проводили, как описано ранее[26]. Краткое описание метода: SARS-CoV-2 S и RBD биотинилировали (Thermo Fisher) и конъюгировали с красными флуоресцентными микросферами нейтравидина размером 1 мкм (Thermo Fisher) в течение 2 ч при 37°C, затем избыток антигена отмывали. Для образования иммунных комплексов в каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета добавляли $1{,}82\times10^{8}$ гранул, покрытых антигеном, и инкубировали с образцами, разведенными 1:10, при 37°C в течение 2 ч. Лиофилизированный комплемент морской свинки растворяли в соответствии с инструкциями производителя (Cedarlane) в воде и добавляли по 4 мкл на лунку в буферном растворе желатин-веронал, содержащем Mg^{2+} и Ca^{2+} (GVB++, Boston BioProducts) к иммунным комплексам на 20 мин при 37°C. Иммунные комплексы промывали 15 мМ ЭДТА в PBS и добавляли фракцию козьего IgG, конъюгированного с флуоресцеином, к комплементу C3 морской свинки (MpBio). После окрашивания образцы фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) и собирали образцы с помощью проточной цитометрии (Intellicyt, iQue Screener plus) с использованием робота-манипулятора (PAA). Все события гейтировали по отдельным клеткам и положительным событиям в микросферах, данные представляли в виде средних положительных событий C3. Все образцы анализировали в двух повторах в разные дни.

Статистический анализ

Анализ иммунологических, вирусологических данных и данных о массе тела проводили с использованием GraphPad Prism 8.4.2 (программное

обеспечение GraphPad). Сравнение данных между группами проводили с использованием двусторонних критериев Манна-Уитни. Смертность оценивали с использованием двустороннего точного критерия Фишера. Корреляции оценивали с использованием двусторонних критериев ранговой корреляции Спирмена. Значение P менее 0,05 считали значимым. Все системные серологические данные преобразовывали в десятичные логарифмы $\log_{10}$. Для лепестковых графиков каждую характеристику антител нормализовали таким образом, чтобы ее минимальное значение равнялось 0, а максимальное значение равнялось 1 по группам, прежде чем использовать медиану внутри группы. Анализ основных компонентов (PCA) проводили с использованием пакета R «ropls» для сравнения многомерных профилей. Для визуализации на тепловой карте указаны различия между значениями средних показателей z-оценки для групп S.dTM.PP и S.PP. Для указания значимости на тепловых картах использовали поправку Бенджамини-Хохберга для коррекции множественных сравнений в строке.

Результаты и обсуждение

SARS-CoV-2 может инфицировать нечеловекообразных приматов[8-10], хомяков[5-7], хорьков[14-16], трансгенных мышей hACE2[17,18] и других видов[16], но клинические заболевания на этих моделях обычно проявились в легкой форме. Модель тяжелой формы пневмонии представляется пригодной для доклинической оценки вакцин против SARS-CoV-2 и других мер, поскольку инфекция SARS-CoV-2 у людей может привести к тяжелой форме клинического заболевания, дыхательной недостаточности и смертности[1-4]. В этой строгой модели оценивали клинические и вирусологические характеристики высокодозной инфекции SARS-CoV-2 у хомяков, а также оценивали защитную эффективность вакцины на основе вектора Ad26[19], кодирующего стабилизированный шиповидный белок (S) SARS-CoV-2.

20 сирийских золотистых хомяков (в возрасте 10-12 недель) заражали в дозе $5x10^4$ $TCID_{50}$ (N=4, низкая доза) или $5x10^5$ $TCID_{50}$ (N=16, высокая доза) SARS-CoV-2 интраназальным методом. В группе, которой вводили высокие дозы, 4 животных умерщвляли в день 2, а 4 животных умерщвляли в день 4 для выявления вирусной нагрузки в тканях и гистопатологии, а за оставшимися 8 животными наблюдали в течение длительного времени. Всех оставшихся животных умерщвляли в день 14. В группе с низкими дозами хомяки потеряли в

среднем 14,7% массы тела в день 6, но полностью выздоровели в день 14 (фиг. 55A-B), что согласуется с предыдущими исследованиями[5-7]. В группе с высокой дозой хомяки потеряли в среднем 19,9% массы тела в день 6. Из 8 животных в этой группе, за которыми наблюдали в течение длительного времени, 4 соответствовали критериям гуманной эвтаназии IACUC: потеря веса >20% и респираторный дистресс-синдром в день 6, и 2 дополнительных животных соответствовали этим критериям в день 7. 2 оставшихся животных выздоровели в день 14. Эти данные свидетельствуют о том, что заражение хомяков высокими дозами SARS-CoV-2 приводило к серьезной потере веса и частичной смертности.

Тканевые вирусные нагрузки оценивали у 4 животных, которым вводили высокие дозы SARS-CoV-2 и умерщвлённых в день 2, у 4 животных, умерщвлённых в день 4, и у 5 из 6 животных, которые соответствовали критериям гуманной эвтаназии в день 6-7 (фиг. 55C). В день 2 наблюдали высокие средние тканевые вирусные нагрузки: 10^{12} копий РНК/г в легочной ткани и 10^{8}-10^{9} копий РНК/г в ноздрях и трахее, при среднем значении 10^{5}-10^{8} копий РНК/г в сердце, желудочно-кишечном тракте, головном мозге, селезенке, печени и почках, что указывает на диссеминированную инфекцию. В день 6-7 вирусная нагрузка в тканях составляла примерно на 2 log ниже, несмотря на продолжающуюся потерю веса.

Хомяков, инфицированных высокими дозами SARS-CoV-2, оценивали с использованием гистопатологии в дни 2 (N=4), 4 (N=4), 6-7 (N=6) и 14 (N=2). Инфекция была связана с выраженными воспалительными инфильтратами и мультифокальным некрозом эпителия носовых раковин (фиг. 56A) и бронхиолярного эпителия, что приводило к дегенеративным нейтрофилам и клеточному дебрису в просвете (фиг. 56B). Наблюдалась реактивность эндотелия близлежащих сосудов с прилипанием мононуклеарных клеток к эндотелию и трансмиграцией в стенки сосудов, что свидетельствует об эндотелиите (фиг. 56B). Наблюдали многоочаговую интерстициальную пневмонию от умеренной до тяжелой формы, характеризующуюся легочной консолидацией, поражающей 30-60% легочной паренхимы уже в день 2 после заражения SARS-CoV-2 (фиг. 56C). Воспалительные инфильтраты состояли из большого количества макрофагов и нейтрофилов с меньшим количеством лимфоцитов. Эпителий носовых раковин (фиг. 56D) и бронхиолярные эпителиальные клетки (фиг. 56E) представляли собой в значительной степени положительные в отношении

нуклеокапсидного белка SARS (SARS-CoV-N) по данным иммуногистохимического анализа (IHC) в областях воспаления и некроза. Анализ IHC SARS-CoV-N также показал локальное интенсивное окрашивание альвеолярных перегородок и интерстициальных мононуклеарных клеток, морфологически соответствующих макрофагам (фиг. 56F). Аналогичным образом значительное количество вирусной РНК (вРНК) SARS-CoV-2 наблюдали в бронхиолярном эпителии и легочном интерстиции в областях воспаления (фиг. 56G-H).

Уровни экспрессии как вРНК SARS-CoV-2, так и белка SARS-CoV-N в легких оказались самыми высокими в день 2 и снижались в день 4, при этом минимальные уровни вРНК и белка SARS-CoV-N обнаруживались в день 7 (фиг. 57A-57B). Пневмония характеризовалась большими воспалительными инфильтратами макрофагов Iba-1+ в интерстиции легких, а также CD3+ Т лимфоцитов (фиг. 56I-56J). Многочисленные жизнеспособные и дегенеративные нейтрофилы были обнаружены по всему легкому, особенно в областях некроза, с высокой экспрессией миелопероксидазы нейтрофилов (MPO) по всему легкому (фиг. 56K). Диффузная экспрессия продукта индуцируемого интерфероном гена, MX1, также была обнаружена в легких (фиг. 56L). В отличие от кинетики детектирования вРНК SARS-CoV-2 и SARS-CoV-N, пик которых наблюдали в день 2, эти маркеры воспаления достигают пика в день 7 (фиг. 57C-57F), что совпадает с максимальной потерей веса и смертностью (фиг. 55A-55B). Детектирование вРНК в легких методом RNASCOPE® не просто отражало вирусный инокулят, поскольку была обнаружена не только отрицательная антисмысловая вРНК (фиг. 58A-58E), но также и положительная смысловая вРНК (фиг. 58F-58J), которые перекрывались по месту расположения и по структуре в дни 2-7 после заражения. Экспрессия вРНК SARS-CoV-2 (как антисмысловая, так и смысловая) присутствовала в легких со значительной экспрессией рецептора ACE2 (фиг. 58K-58O).

Системная вРНК была также обнаружена в дистальных тканях, включая ствол головного мозга, желудочно-кишечный тракт и миокард (фиг. 59A-59F). В этих тканях наблюдали выраженный эндотелиит и периваскулярное воспаление с участием макрофагов и лимфоцитов, несмотря на минимальное окрашивание SARS-CoV-N (фиг. 59G-59J). Очаговый лимфоцитарный миокардит был отмечен у одного животного и соответствовал присутствию вРНК (фиг. 59K-59L). Другие

очаги детектирования вируса включали мононуклеарные клетки периферической крови в тромбах легких (фиг. 60A-60C) и костном мозге носовых раковин (фиг. 60D-60F).

Были получены рекомбинантные, некомпетентные к репликации векторы Ad26, которые кодируют (i) шиповидный белок SARS-CoV-2 (S) с делецией трансмембранной области и цитоплазматического хвоста, отражающий растворимый эктодомен с доменом тримеризации фолдона (S.dTM.PP (SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) или (ii) полноразмерный S (S.PP (Ad26 SS-Spike-dF-PP)), оба с мутацией сайта расщепления фурином и двумя стабилизирующими мутациями пролина[20] (фиг. 61A). Недавно сообщалось об иммуногенности и защитной эффективности этих вакцин против заражения SARS-CoV-2 у макак-резус[13].

50 сирийских золотистых хомяков иммунизировали в дозе 10^{10} или 10^{9} вч векторов Ad26, кодирующих S.dTM.PP или S.PP (N=10/группа), или контролей плацебо (N=10). Животным вводили однократную внутримышечную дозу вакцины на неделе 0. Антитела, специфичные к рецептор-связывающему домену (RBD), наблюдали с использованием метода ИФА[10,11] (фиг. 61B), а нейтрализующие антитела (NAb) наблюдали с использованием анализа нейтрализации псевдовируса[10,11, 21] (фиг. 61C) у всех животных на неделе 2 и 4. На неделе 4 вектор Ad26-S.PP вызывал в 4,0-4,7 раза более высокие средние титры ИФА (4470, 4757) по сравнению с Ad26-S.dTM.PP (Ad26 SS-S.Ecto-dF-PP-foldon) (1014, 1185) (фиг. 61B, $P<0,0001$, двусторонний критерий Манна-Уитни). Аналогичным образом Ad26-S.PP вызывал в 1,8–2,6 раза более высокие средние титры NAb IC50 (359, 375) по сравнению с Ad26-S.dTM.PP (139, 211) ($P <0,05$, двусторонний критерий Манна-Уитни). Для каждого вектора две испытанные дозы оказались сопоставимыми. Данные ИФА и NAb коррелировали как на неделе 2, так и на неделе 4 ($R=0,7074$, $P<0,0001$ и $R=0,7849$, $P<0,0001$, соответственно, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена; фиг. 62A).

S-специфический и RBD-специфический ответы оценивали у вакцинированных животных на неделе 4 с использованием системной серологии[22]. Оценивали ответы IgG, IgG2a, IgG3, IgM, Fc-рецепторов FcRγ2, FcRγ3 и FcRγ4 и антителозависимое отложение комплемента (ADCD) (фиг. 61D-F). Более высокие и более устойчивые ответы наблюдали для Ad26-S.PP по

сравнению с Ad26.S.dTM.PP (фиг. 61D, 61F), и анализ основных компонентов этих характеристик антител подтвердил, что эти две вакцины харакетризуются явновыраженными профилями (фиг. 61E).

На неделе 4 всех животных заражали в дозе 5×10^5 TCID50 SARS-CoV-2 интраназальным методом. По три животных в каждой группе умерщвляли в день 4 для определения вирусной нагрузки в тканях и гистопатологических характеристик, а за оставшимися 7 животными в каждой группе наблюдали до дня 14. В контрольных группах плацебо хомяки в среднем теряли в массе тела 19,6% в день 7 и 43% (3 из 7) животных, за которыми наблюдали в продолжительный период времени, соответствовали критериям умерщвления в день 6-7 (фиг. 63A-63B). Вакцинированные вектором Ad26-S.dTM.PP животные потеряли в среднем 8,7% массы тела, а вакцинированные вектором Ad26-S.PP животные потеряли в среднем 4,0% массы тела (фиг. 63A-63B). Максимальный процент потери массы оказался значительно ниже в обеих вакцинированных группах по сравнению с плацебо-контролем ($P<0,0001$, двусторонний критерий Манна-Уитни, фиг. 63C), и у животных, которым вводили Ad26-S.PP, наблюдали меньшую потерю массы по сравнению с животными, которым вводили Ad26.S.dTM.PP ($P<0,0001$, двусторонний критерий Манна-Уитни, фиг. 63C). Обе вакцины защищали от смертности, соответствующей критериям гуманной эвтаназии, по сравнению с плацебо-контролем ($P = 0,02$, двусторонний точный критерий Фишера, фиг. 62B). Комбинированный анализ двух экспериментов на хомяках подтвердил, что обе вакцины эффективно защищали от смертности ($P=0,007$, двусторонний точный критерий Фишера, фиг. 62C). Ответы по данным ИФА на неделе 2 ($R=-0,8992$, $P<0,0001$) и неделе 4 ($R=-0,9344$, $P<0,0001$) обратно пропорционально коррелировали с максимальным процентом потери массы тела (фиг. 64A). Ответы NAb на неделе 2 ($R=-0,7380$, $P<0,0001$) и неделе 4 ($R=-0,8075$, $P<0,0001$) также обратно пропорционально коррелировали с максимальной процентной потерей массы (фиг. 64B).

Вирусную нагрузку в тканях оценивали в подгруппе животных, умервщленных в день 4, и у остальных выживших животных в день 14. В день 4 после заражения высокими дозами SARS-CoV-2 вирус был обнаружен в тканях всех животных с использованием субгеномной РНК методом ОТ-ПЦР, которая, как полагают, является мерой репликации вируса[10,23] (фиг. 65A). Средняя вирусная нагрузка в легочной ткани составила приблизительно 10^{12} копий РНК/г

у контрольных животных плацебо по сравнению с 10^8 копиями РНК/г у животных, вакцинированных Ad26-S.dTM.PP, и 10^6 копий РНК/г у животных, вакцинированных Ad26-S.PP. В день 14 вирус все еще обнаруживался в легких и ноздрях у выживших контрольных животных, но наблюдался только у меньшинства животных, вакцинированных Ad26-S.dTM.PP, и ни у одного из животных, вакцинированных Ad26-S.PP (фиг. 65B).

Ответы по данным ИФА на неделе 2 (R=-0,8133, P=0,0004) и неделе 4 (R=-0,9288, P<0,0001) обратно пропорционально коррелировали с вирусной нагрузкой в легких в день 4-й (фиг. 66A), и ответы NAb на неделе 2 (R=-0,7469, P=0,0020) и неделе 4 (R=-0,6004, P=0,0199) обратно пропорционально коррелировали с вирусной нагрузкой в легких в 4-й день (фиг. 66B). Ответы по данным ИФА и NAb также обратно коррелировали с вирусной нагрузкой в носовых раковинах (фиг. 66c, d). Более глубокий анализ иммунных коррелятов свидетельствовал о том, что множество характеристик антител обратно пропорционально коррелировали с потерей массы и вирусной нагрузкой в тканях (фиг. 67A).

У вакцинированных животных также наблюдали уменьшение патологии по сравнению с контрольными животными плацебо в день 4 после заражения (фиг. 68). У вакцинированных вектором Ad26-S.PP животных наблюдали минимальные признаки вирусной интерстициальной пневмонии, разрушения бронхиолярного эпителия или перибронхиолярных агрегатов CD3+ Т лимфоцитов и макрофагов или их отсутствие. Гистиоцитарные и нейтрофильные воспалительные инфильтраты заметно снижались во всех долях легких со значительно сниженным уровнем вРНК SARS-CoV-2 у хомяков, вакцинированных векторами Ad26-S.dTM.PP и Ad26-S.PP, по сравнению с контрольной группой плацебо (P = 0,004 и P = 0,004, соответственно, двусторонний критерий Манна-Уитни (фиг. 63D).

У выживших контрольных животных плацебо в день 14 после контрольного заражения развивался интенсивный ответ связывающих и нейтрализующих антител (фиг. 67B). У вакцинированных животных также наблюдали более высокие ответы по данным ИФА и NAb после заражения (фиг. 67B), что согласуется с тканевой вирусной нагрузкой и свидетельствует о низких и временных уровнях репликации вируса у этих животных после заражения высокими дозами SARS-CoV-2.

В этом исследовании было установлено, что однократная иммунизация вектором Ad26, кодирующим полноразмерный стабилизированный перед слиянием S иммуноген (S.PP), защищает от тяжелой формы клинического заболевания после заражения хомяков высокими дозами SARS-CoV-2. В контрольной группе плацебо наблюдали заметную потерю массы тела, тяжелую форму пневмонии и частичную смертность. Напротив, у вакцинированных животных наблюдали минимальную потерю массы тела, пневмонию и отсутствие смертности. Вызванные вакциной ответы связывания и нейтрализующих антител коррелируют с защитой от клинического заболевания, а также со снижением репликации вируса в верхних и нижних дыхательных путях.

Такая тяжелая форма клинического заболевания в этой модели противоречит предыдущим исследованиям, связанным с инфекцией SARS-CoV-2 у хомяков[5-7] и животных других видов[8-10,14-18]. Хомяки являются допустимой моделью для SARS-CoV-2 в результате их гомологии с рецептором ACE25 человека, и описана передача вируса среди хомяков[6]. Высокая доза заражения приводила к обширному клиническому заболеванию, как описано в настоящем исследовании, хотя биологические факторы, которые могут влиять на степень клинического заболевания, такие как возраст животного, происхождение животного и стимуляция антигеном, еще предстоит тщательно изучить.

В настоящее время исследования вакцины против SARS-CoV-2 на нечеловекообразных приматах свидетельствуют о защите от инфекции или снижении репликации вируса в верхних и нижних дыхательных путях[11,12]. Недавно сообщалось о том, что однократная иммунизация Ad26-S.PP обеспечивает полную или почти полную защиту от заражения SARS-CoV-2 у макак-резус[13]. Однако инфекция SARS-CoV-2 у нечеловекообразных приматов не приводит к тяжелой форме клинического заболевания или смертности[8-10]. Модель тяжелой формы заболевания представляется пригодной для дополнения существующих моделей заражения нечеловекообразных приматов, поскольку защита от репликации вируса не обязательно подразумевает защиту от тяжелой формы заболевания. Действительно, по данным гистопатологического анализа хомяков в настоящем исследовании вирусная нагрузка в легких снижалась в дни 2-7, тогда как маркеры воспаления продолжали расти в течение этого периода времени и коррелировали с продолжающейся потерей массы тела. Эти данные

свидетельствуют о том, что прогрессирующее клиническое заболевание у хомяков представляет собой в первую очередь воспалительный процесс, который вызывается инфекцией, но продолжает нарастать даже при снижении репликации вируса.

Поскольку COVID-19 у людей может прогрессировать до тяжелой формы клинического заболевания, важно исследовать кандидаты вакцин против SARS-CoV-2 на доклинических моделях, которые воспроизводят тяжелую форму клинического заболевания, включая молниеносную пневмонию и смертность. Описанная в данном контексте модель с высокими дозами у хомяков удовлетворяет многие из этих критериев и, следовательно, представляет собой пригодную модель для изучения заболеваний и лечения человека, прежде всего, в отношении патогенеза тяжелой формы заболевания. Первичным проявлением клинического заболевания в этой модели является тяжелая форма пневмонии, а не энцефалит, о котором сообщалось при исследовании некоторых моделей трансгенных мышей hACE2[24]. Более того, ответы связывающих и нейтрализующих антител коррелируют с защитой.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что однократная иммунизация вектором Ad26-S.PP обеспечивает надежную защиту от тяжелой формы клинического заболевания после инфицирования высокими дозами SARS-CoV-2 на модели животных, которая близко совпадает с развитием и прогрессированием заболевания у людей. О такой вакцинной защите от тяжелой формы пневмонии и смертности от SARS-CoV-2 ранее не сообщалось. Вектор Ad26-S.PP, также называемый Ad26.COV2.S, в настоящее время проходит клинические испытания. Эту модель тяжелой формы заболевания хомяка также можно использовать для тестирования вакцин против SARS-CoV-2, терапевтических средств и других контрмер.

Список литературы

1. Li Q. и др. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. N Engl J Med, doi:10.1056/NEJMoa2001316 (2020).

2. Zhu N. и др. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med, т. 382, сс. 727-733, doi:10.1056/NEJMoa2001017 (2020).

3. Chen N. и др. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet, т. 395, сс. 507-513, doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7 (2020).

4. Huang C. и др. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet, т. 395, сс. 497-506, doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5 (2020).

5. Chan J. F. и др. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. Clin Infect Dis, doi:10.1093/cid/ciaa325 (2020).

6. Sia S. F. и др. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2342-5 (2020).

7. Imai M. и др. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. Proc Natl Acad Sci USA, т. 117, сс. 16587-16595, doi:10.1073/pnas.2009799117 (2020).

8. Munster V. J. и др. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2324-7 (2020).

9. Rockx B. и др. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. Science, doi:10.1126/science.abb7314 (2020).

10. Chandrashekar A. и др. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020).

11. Yu J. и др. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020).

12. Gao Q. и др. Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. Science, doi:10.1126/science.abc1932 (2020).

13. Mercado N. B. и др. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2607-z (2020).

14. Blanco-Melo D. и др. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. Cell, т. 181, сс. 1036-1045 e1039, doi:10.1016/j.cell.2020.04.026 (2020).

15. Kim Y. I. и др. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. Cell Host Microbe, т. 27, сс. 704-709 e702, doi:10.1016/j.chom.2020.03.023 (2020).

16. Shi J. и др. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. Science, т. 368, сс. 1016-1020, doi:10.1126/science.abb7015 (2020).

17. Bao L. и др. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2312-y (2020).

18. Sun S. H. и др. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. Cell Host Microbe, т. 28, сс. 124-133 e124, doi:10.1016/j.chom.2020.05.020 (2020).

19. Abbink P. и др. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. J Virol, т. 81, сс. 4654-4663, doi:JVI.02696-06 [pii] 10.1128/JVI.02696-06 (2007).

20. Wrapp D. и др. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science, т. 367, сс. 1260-1263, doi:10.1126/science.abb2507 (2020).

21. Yang Z. Y. и др. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. Nature, т. 428, сс. 561-564, doi:10.1038/nature02463 (2004).

22. Chung A. W. и др. Dissecting Polyclonal Vaccine-Induced Humoral Immunity against HIV Using Systems Serology. Cell, т. 163, сс. 988-998, doi:10.1016/j.cell.2015.10.027 (2015).

23. Wolfel R. и др. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2196-x (2020).

24. Netland J., Meyerholz D. K., Moore S., Cassell M., Perlman S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. J Virol, т. 82, сс. 7264-7275, doi:10.1128/JVI.00737-08 (2008).

25. Brown E. P. и др. High-throughput, multiplexed IgG subclassing of antigen-specific antibodies from clinical samples. J Immunol Methods, т. 386, сс. 117-123, doi:10.1016/j.jim.2012.09.007 (2012).

26. Fischinger S. и др. A high-throughput, bead-based, antigen-specific assay to assess the ability of antibodies to induce complement activation. J Immunol Methods, т. 473, с. 112630, doi:10.1016/j.jim.2019.07.002 (2019).

Пример 13

Дизайн антигена

Было разработано несколько антигенов на основе последовательности полноразмерного S белка Wuhan-CoV, некоторые из которых схематически показаны на фиг. 69. Все последовательности основаны на полноразмерном шиповидном белке SARS-CoV-2 (YP_009724390.1 - SEQ ID NO: 29).

Для разных антигенов использовали разные сигнальные пептиды/лидерные последовательности, такие как природный сигнальный пептид дикого типа (в последовательностях COR200006, 200007 и 200008), сигнальный пептид tPA (COR200009, 200010 и 200011) или гибридную лидерную последовательность (COR200018). .

Кроме того, некоторые из конструктов содержали сайт расщепления фурином дикого типа (wt) (т.е. 200006, 200009 и 200018), а в некоторых конструктах (т.е. 200007, 200008, 200010 и 200011) сайт расщепления фурином был удален при замене аминокислотной последовательности сайта фурина RRAR (wt) (SEQ ID NO: 90 и 224) на последовательность SRAG (dFur) (SEQ ID NO: 225), т.е. при введении мутации R682S и R685G (где нумерация положений аминокислот соответствует нумерации в аминокислотной последовательности YP_009724390 - SEQ ID NO: 29) для оптимизации стабильности и экспрессии.

В некоторые конструкты для оптимизации стабильности и экспрессии вводили стабилизирующие (пролиновые) мутации в шарнирной петле в положениях 986 и 987, прежде всего, COR20007, 20008, 200010 и 200011 включают мутации K986P и V987P (где нумерация положений аминокислот соответствуют нумерации в аминокислотной последовательности YP_009724390 – SEQ ID NO: 29).

И наконец, в конструктах 200008 и 200011 сигнал удерживания ER удаляли для оптимизации направленной миграции и экспрессии, т.е. при удалении последних 5 аминокислот KLHYT (SEQ ID NO: 226).

Экспрессию и антигенность нескольких конструктов иммуногенов SARS-CoV-2, включая COR200010, 200011 и 200018, исследовали в экспериментах по клеточному ИФА (CBE) и сортировке клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Для анализа CBE клетки HEK293 высевали до 100% слияния на микропланшеты с черными стенками, содержащие поли-D-лизин, в день 1.

Клетки трансфектировали плазмидами с использованием липофектамина в день 2, а клеточный ИФА проводили в день 4 при 4°C. Стадию фиксации не использовали. Субстрат BM Chemiluminescence ELISA (Roche) использовали для обнаружения вторичного антитела. Прибор Ensight использовали для оценки слияния клеток и интенсивности люминесценции.

Использовали несколько антител к SARS-CoV, которые проявляли перекрестную реактивность с S-белком SARS-CoV-2. Известно, что антитело CR3022 (описанное в WO06/051091) нейтрализует SARS-CoV с низкой эффективностью (Ter Meulen и др. (2006), PLOS Medicine). Он не нейтрализует SARS-CoV-2. Он связывается только в том случае, если по крайней мере две области связывания с рецепторами (RBD) находятся в верхнем положении (Yuan и др., Science. 3 апреля 2020 г. pii: eabb7269. doi: 10.1126/science.abb7269. [до печати в формате Epub], Joyce и др. doi: https://doi.org/10.1101/2020.03.15.992883). Известно, что CR3015 (описанный в WO 2005/012360) не нейтрализует SARS-CoV. CR3023, CR3046, CR3050, CR3054 и CR3055 также считаются ненейтрализующими антителами. Результаты показаны на фиг. 70.

Как показано, COR200010 характеризуется самым высоким соотношением связывания нейтрализующих и ненейтрализующих антител, что отражает благоприятную антигенность и правильную нативную укладку S белка и, таким образом, может указывать на то, что белок находится преимущественно в состоянии, подобном предшествующему слиянию. На основании этих данных и данных FACS (см. фиг. 71) выбор COR200011 отменили, и его дальнейшее тестирование не проводили. Кроме того, выбор COR200008 был отменен (данные не показаны).

Кроме того, мышей Balb/C возрастом 6-8 недель внутримышечно иммунизировали в дозе 100 мкг соответствующего ДНК-конструкта или фосфатно-солевого буферного раствора в качестве контроля. Титры сывороточных антител, специфичных к шиповидному белку SARS-CoV-2, определяли в день 19 после иммунизации с использованием ИФА и рекомбинантного растворимого стабилизированного антигена-мишени шиповидного белка. Инактивация сайта фурина (KO) и мутации пролина (PP) повышали иммуногенность (ИФА на белке Furin KO+PP-S, см. фиг. 72).

Кроме того, удаление сигнала удержания ER (dERRS) уменьшало связывание CR3022 по данным анализа CBE и уменьшало иммуногенность.

На основании соотношений связывания CR3022:CR3015 по данным анализа CBE (вместе с данными COR200011 с использованием FACS), уровней экспрессии на WB (данные не показаны), титров ИФА (по сравнению с COR200009, COR200010 и COR200011) после иммунизации мышиной ДНК (данные не показаны), и нейтрализации, наблюдаемой для COR200010, COR2000010 эти последовательности оказались лучшим конструктом антигена и были выбраны в качестве антигена для конструкции аденовектора.

Поскольку для связанного с мембраной S белка сигнальный пептид tPA (ST), по-видимому, не оказывает благоприятного действия (на основе связывания CR3022) по сравнению с SP дикого типа в нестабилизированных версиях, COR200007 также был выбран для конструирования аденовектора.

На фиг. 73 показано, что COR200007 лучше связывается с ACE2 по сравнению с COR200010.

Пример 14

Клонирование векторов SARS-CoV-2 в Ad26

Несколько различных вставок, как описано в примере 13, были сконструированы для вектора Ad26 на основе последовательности S белка SARS-CoV-2 (полногеномная последовательность NC_045512). Вставки представляли собой закрепленные на мембране версии COR20007, COR20008, COR20009, COR200010, COR200011 и COR200018.

Клонирование шиповидного белка SARS-CoV2 состоит из двух отдельных стадий:

1: Дизайн и клонирование шиповидного белка SARS-CoV2 в челночный экспрессионный вектор.

Этот вектор содержит промотер цитомегаловируса человека (hCMV), который содержит две последовательности тетрациклинового оператора (tetO) внутри промотера hCMV и сигнал полиаденилирования SV40. Экспрессионный вектор используют для экспериментов *in vitro* и *in vivo*, а также для создания вируса Ad26, содержащего шиповидный белок SARS-CoV2.

2: Клонирование экспрессионного вектора в вирус Ad26.

Дизайн и клонирование шиповидного белка SARS-CoV2 в челночный экспрессионный вектор экспрессии

Как описано в примере 13, на основе шиповидного белка SARS-CoV2 дикого типа (ссылка, YP_009724390 - SEQ ID NO: 29) было создано несколько конструктов на основе полноразмерного шиповидного белка SARS-CoV (под названиями COR20007, COR20008, COR 20009, COR 200010, COR200011 и COR200018), в которые были вставлены различные сигнальные пептиды, удаление сайта расщепления фурином, стабилизирующие мутации и вариации в трансмембранной области (см. таблицу)

	Описание/модификация					SEQ_ID NO	
Название плазмиды	Название вставки	Сигнальный пептид	Расщепление фурином	Стабили-зация	Транс-мембрана	Белок	ДНК *
pUC_CMVdel134TO_COR20007	COR20007	wt	dFur	PP	Wt	205	211
pUC_CMVdel134TO_COR20008	COR20008	wt	dFur	PP	dERRS	206	212
pUC_CMVdel134TO_COR20009	COR20009	tPA	wt	wt	Wt	207	213
pUC_CMVdel134TO_COR200010	COR20010	tPA	dFur	PP	Wt	208	214
pUC_CMVdel134TO_COR200011	COR20011	tPA	dFur	PP	dERRS	209	215
pUC_CMVdel134TO_COR200018	COR20018	tPA+wt	wt	wt	Wt	210	216

*Примечание: последовательности nt кодируют только кодирующие последовательности; т.е. не включают дополнительно добавленные 5’- и 3’-последовательности, которые описаны ниже.

Эти белковые последовательности подвергали обратной трансляции с использованием наиболее часто используемых кодонов человека (CLC-main workbench, Qiagen) с поправкой на содержание GC, криптические сайты сплайсинга, SD-последовательности, TATA-блоки и сигналы терминации с использованием биоинформационных инструментов с открытым исходным кодом (GeneOptimizer, GeneArt, Splice прогноз сайта и промоутера, fruitfly.org). Затем использование кодонов согласовывали с различными конструктами, и к 5'-концу добавляли нуклеотиды, содержащие перекрытие с челночным вектором, сайт рестрикции HindIII и последовательность Козака (CGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGCCACC (SEQ ID NO: 220), а к 3'-концу - двойной стоп-кодон, сайт рестрикции XbaI и последовательность, перекрывающуюся с челночным экспрессионным вектором (TGATAATCTAGACGAGATCCGAACTTGTTTTATG (SEQ ID NO: 221)). Два фрагмента ДНК (gBlocks, фирмы Integrated DNA Technologies, IDT), кодирующие часть последовательностей шиповидного белка SARS-CoV2, затем

собирали в линеаризованный вектор-мишень HindIII + XbaI (ID 7346_pUC_E1-CMVdel134TO-stuffer, SEQ ID NO: 13) с использованием сборки Gibson (NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix, NEB, Cat E2621), как схематически изображено на фиг. 74. В результате получали экспрессионные векторы, кодирующие антигенные конструкты COR20009, COR200010, COR200011 и COR200018.

На фиг. 74 представлена схема клонирования функционального SARS-CoV-2, экспрессирующего шиповидный белок. Два фрагмента ДНК размером примерно 2 кб (gBlocks, IDT), кодирующие шиповидный белок SARS-CoV-2, перекрывают друг друга и перекрывают как 5'-, так и 3'-концы, что позволяет проводить сборку *in vitro* (IVA) обоих фрагментов ДНК в линеаризованный вектор (как описано в работе Gibson и др. Nat Methods, т. 6, № 5, сс. 345-345 (2009).

Для конструирования экспрессионных векторов COR20007 и COR20008, вектор pUC-CMVdel134TO_COR200010, соответственно CMVdel134_COR200011, использовали в качестве матриц для подхода сайт-направленного мутагенеза для замены лидерного пептида tPA на лидерный пептид шиповидного белка дикого типа. Для этого проводили сайт-направленную ПЦР с использованием набора для направленного мутагенеза Q5-ste (NEB, E0554S) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. С использованием праймеров 7_fw (gctccccctcgtctccagtCAATGCGTGAACCTGACC (SEQ ID NO: 222) и 8_Rv (agtaccagaaacacgaacatGGTGGCAAGCTTCCAATG (SEQ ID NO: 223) и программы ПЦР осуществляли денатурацию в течение 30 с при 98°C, затем 25 циклов при 98°C в течение 20 с, плавление при 64°C в течение 20 с и удлинение при 72°C в течение 2 мин. Полученные ампликоны выделяли из геля и обрабатывали смесью KLD в соответствии с протоколом фирмы-производителя, что приводило к получению экспрессионных векторов COR20007 и COR20008.

Челночные экспрессионные конструкты использовали для анализов *in vitro* и *in vivo* (например, как описано в примере 13) и для создания векторной геномной плазмиды Ad26, содержащей последовательности шиповидного белка SARS-CoV-2, как описано ниже.

Создание векторной геномной плазмиды Ad26 pAd26.dE1.dE3.5orf6

Конструкт pAd26.dE1.dE3.5orf6 представляет собой плазмиду, содержащую полноразмерный геном вектора Ad26, который содержит делецию E1, делецию E3 и замену Ad26 E4 orf6 на Ad5, как описано для ранее созданных векторов на основе Ad26 (Abbink и др., J Virol, т. 81, №9, сс. 4654-4663 (2007)). Плазмидная цепь pAd26.dE1.dE3.5orf6 содержит точку начала репликации pMB1 и ген устойчивости к ампициллину, она получена из pBR322 (GenBank, доступ J01749.1). Плазмида pAd26.dE1.dE3.5orf6 дополнительно содержит уникальный сайт рестрикции AsiSI вместо делеции E1 генома вектора. Эти сайты можно использовать для вставки трансгенных кассет из челночного вектора (pShuttle_E1.CMVdel134TO; SEQ ID NO: 217) в соответствующих участках. И наконец, геном аденовирусного вектора внутри pAd26.dE1.dE3.5orf6 фланкирован на каждом из своих концов сайтом рестрикции SwaI, что позволяет его высвобождать из цепи плазмиды при расщеплении сайта SwaI.

Генерация плазмид генома вектора Ad26, содержащего последовательности шиповидного белка SARS-CoV-2

Экспрессионный вектор плазмиды pShuttle_E1.CMVdel134TO содержит промотер цитомегаловируса человека (hCMV), который содержит две последовательности тетрациклинового оператора (tetO) в промотере hCMV и сигнал полиаденилирования SV40. Кроме того, этот вектор содержит как до, так и после сайта рестрикции SapI трансгенной кассеты, фланкированный 20 нуклеотидами, которые гомологичны принимающему вектору Ad26 (ID6598_pAd26.dE1.dE3.5orf6, SEQ ID NO: 218), что позволяет проводить сборку *in vitro* (Gibson ; 2009, выше) трансгенной кассеты в вектор Ad26.

На фиг. 75 представлена схема клонирования челночного вектора, экспрессирующего шиповидный белок SARS-CoV-2, в область E1 вектора Ad26. Вектор Ad26 линеаризуют рестрикционным ферментом AsiSI. Челночный вектор расщепляли с использованием SapI для отделения экспрессионной кассеты от ее основы. Экспрессионная кассета содержит последовательности, гомологичные последовательностям, фланкирующим сайт AsiSI в цепи Ad26, что позволяет проводить сборку in vitro (IVA) обоих фрагментов ДНК (как было описано Gibson и др., 2009).

Для этого экспрессионные векторы pShuttle_E1.CMVdel134TO, содержащие последовательности шиповидного белка SARS-CoV-2, расщепляли с

исползованием SapI, а экспрессионную кассету выделяли из геля в сборе *in vitro* (NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix, NEB, Cat E2621) в линеаризованный вектор AsiSI Ad26 (ID6598_pAd26.dE1.dE3.5orf6; SEQ ID NO: 218). При этом получали векторы Ad26, содержащие варианты шиповидного белка SARS-Cov-2; pAd26.E1.CMVdel134-TO.COR20007, pAd26.E1.CMVdel134-TO.COR20008, pAd26.E1.CMVdel134-TO.COR20009, pAd26.E1.CMVdel134-TO.COR200010, pAd26.E1.CMVdel134-TO.COR20009 и pAd26.E1.CMVdel134-TO.COR200018.

Получение рекомбинантного вектора Ad26

Векторы Ad26, содержащие вставку SARS-CoV2, создавали при трансфекции полногеномных плазмид в E1-комплементарные суспензионные клетки PER.C6 TetR (sPER.C6 TetR) с использованием стандартных процедур. Перед трансфекцией в sPER.C6 TetR, которые выращивали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) и 10 мМ $MgCl_2$ в планшетах с PLL, векторную плазмиду Ad расщепляли SwaI для высвобождения вектора аденовирусного генома из плазмиды. Трансфекцию выполняли в соответствии со стандартными процедурами с использованием реагента для трансфекции липофектамина (Invitrogen: Carlsbad, CA). После получения трансфекций “спасения вируса” вирусы дополнительно амплифицировали в ходе нескольких последовательных циклов заражения на клетках sPER.C6 TetR, культивируемых в среде Permexcis. Вирусы очищали от неочищенных вирусных образований с использованием двухэтапной процедуры ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl), как описано ранее (Havenga и др., «Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells», J.Gen.Virol., т. 87, № 8, сс. 2135-2143 (2006)). Титры вирусных частиц (вч) измеряли методом спектрофотометрии, описанным ранее (Maizel и др., «The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12,” Virology, т. 36, № 1, сс. 115-125 (1968)).

Пример 15

Гуморальная иммуногенность у мышей

Мышей BALB/c иммунизировали внутримышечно (IM) однократной дозой 10^8, 10^9 или 10^{10} вч Ad26COVS1 (N=10 на уровень дозы). Следует отметить, что обозначения Ad26NCOV030 и Ad26COVS1 использовали для одного и того же

конструкта и они взаимозаменяемы. В группе отрицательного контроля вводили 10^{10} вч вектора Ad26 без трансгена (Ad26.Empty, N=5). Вектор Ad26NCOV006, который кодирует нативный полноразмерный S белок без стабилизирующих мутаций, позволил провести сравнение с Ad26COVS1 для оценки преимуществ стабилизирующих мутаций. В одной группе (группа 1, N=5) вводили 10^{7} вч Ad26NCOV006 для получения сыворотки, и результаты для этой группы не показаны. Сыворотку получали на неделе 2 и 4 после иммунизации для измерения ответа антител, связывающих S белок, и ответа антител, нейтрализующих SARS-CoV-2. Титры антител, связывающих S белок, измеряли с помощью ИФА.

Ответ антител, связывающих S белок

Однократная иммунизация Ad26COVS1 приводила к зависимой от уровня дозы индукции антител, связывающих S белок, с высокими титрами антител уже через 2 недели после иммунизации (фиг. 76A). По сравнению с вектором Ad26NCOV006, кодирующим S белок без стабилизирующих мутаций, Ad26COVS1 индуцировал значительно более высокие титры связывающих антител на неделе 2 и 4. Средний ответ на группу показан горизонтальной линией. Пунктирная линия обозначает предел LLOD.

Ответ нейтрализующих антител

Образцы сыворотки мышей, которым вводили 10^{10} вч Ad26COVS1, использовали для определения наличия нейтрализующих антител. Титры нейтрализующих антител измеряли с использованием wtVNA, определяя цитопатический эффект (CPE) вирусного изолята Leiden1 (L-001) на клетках Vero E6. Средний ответ на группу показан горизонтальной линией. Пунктирная линия обозначает предел LLOD. Животные с ответом на уровне LLOD или ниже показаны незакрашенными символами. Однократная иммунизация вектором Ad26COVS1 приводила к индукции нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 уже через 2 недели после иммунизации (фиг. 77). Средние титры нейтрализующих антител wtVNA, индуцированные Ad26COVS1, увеличились в 4 раза до 64 (диапазон титров: 22,6–90,5) с недели 2 до недели 4. По сравнению с Ad26NCOV006, Ad26COVS1 индуцировал значительно более высокие титры нейтрализующих антител на неделе 4.

Пример 16

Поляризация иммунного ответа у мышей

Этот эксперимент проводили для определения баланса Th1/Th2, индуцированного двумя векторами SARS-CoV-2 на основе Ad26, включая Ad26COVS1. Такой баланс является косвенной мерой теоретического риска усиления вакциноассоциированного заболевания. Мышей BALB/c (склонных к генерации ответов Th2-типа) иммунизировали в/м однократной дозой 10^{10} вч Ad26COVS1 (N=6). Контрольной группе вводили 50 мкг рекомбинантного стабилизированного S белка с адъювантом - 100 мкг фосфата алюминия ($AlPO_4$, Adju-Phos®), который, как известно, вызывает иммунный ответ со смещением Th2 (N=6). Группе отрицательного контроля вводили только 100 мкг адъюванта $AlPO_4$ (N=3). Селезенки и сыворотки получали на неделе 2 после иммунизации для измерения клеточного и гуморального иммунного ответа.

Ответы специфических клеточных цитокинов на S белок

Для измерения продуцирования цитокинов спленоциты стимулировали *ex vivo* собранными пептидами S белка дикого типа. В день 13 после иммунизации мышей умерщвляли, селезенки обрабатывали и получали суспензии отдельных клеток, а спленоциты стимулировали *ex vivo* с помощью 2 пептидных фракций 15-членных пептидов, перекрывающихся с 11 аминокислотами, включающими полную последовательность S белка SARS-CoV-2 дикого типа. Представлено суммарное значение SFU от стимуляции собранными пептидами 1 и 2. Продуцирование IFN-γ спленоцитами измеряли методом ELISpot после пептидной стимуляции в течение 18 ч. Клеточные иммунные ответы оценивали с использованием IFN-γ ELISpot, ICS и Multiplex ИФА (с использованием набора противовоспалительной панели [мышь] для среднемасштабного обнаружения (среднеквадратичное отклонение) [MSD]) с 10 плексами.

Однократная доза Ad26COVS1 приводила к значительной секреции IFN-γ, измеренной методом ELISpot, в то время как рекомбинантный S белок с адъювантом $AlPO_4$ индуцировал недетектируемый или низкий клеточный иммунный ответ (фиг. 78). Эти результаты были подтверждены ICS с CD8+ Т-клетками (данные не показаны).

В день 13 после иммунизации мышей умерщвляли, селезенки обрабатывали и получали суспензию отдельных клеток. Спленоциты стимулировали *ex vivo* в течение 48 ч с использованием 2 пептидных фракций

15-членных пептидов, перекрывающихся 11 аминокислотами, включающих полную последовательность S белка SARS-CoV-2 дикого типа. Показанные результаты представляют собой отношения сумм стимуляций собранных пептидов 1 и стимуляций собранных пептидов 2. Концентрации цитокинов измеряли в супернатанте клеточной культуры методом ИФА Multiplex. В то время как после иммунизации вектором Ad26COVS1 наблюдали значительную секрецию IFN-γ, признака поляризации Th1, секреция типичных цитокинов, связанных с иммунным ответом Th2-типа, IL-4, IL-5 и IL-10, оказалась низкой (данные не показаны). Отношение концентраций цитокинов IFN-γ к IL-4, IL-5 или IL-10 считается показателем поляризации Th1 иммунного ответа и эти отношения показаны на фиг. 79. Иммунизация вектором Ad26COVS1 сдвигала ответ спленоцитов по направлению к секреции IFN-γ. Для сравнения, иммунизация S белком с адъювантом $AlPO_4$ не сдвигала ответ по направлению к секреции IFN-γ, и общая секреция цитокинов в этой группе оказалась низкой.

Ответы подтипа IgG, специфичные в отношении S белка

У мышей IgG1 продуцируется при любом типе иммунного ответа, в то время как IgG2a преимущественно продуцируется при Th1-поляризованном иммунном ответе, поэтому увеличение отношения IgG2a/IgG1 указывает на сдвиг иммунного ответа Th1. Титры IgG1 и IgG2a и соотношение IgG2a/IgG1 после иммунизации представлены на фиг. 80. Образцы сыворотки отбирали через 13 дней после иммунизации. Титры IgG1 и IgG2a, связывающие S белок, измеряли методом ИФА. Вектор Ad26COVS1 индуцировал связывающие S белок антитела IgG1 и IgG2a, у всех животных. Напротив, S белок в комбинации с адъювантом $AlPO_4$ индуцировал IgG1 у всех животных, но титры IgG2a были близки или находились на нижнем пределе обнаружения. Такая индукция приводила к соотношению IgG2a/IgG1 после иммунизации вектором Ad26COVS1, которое было преимущественно Th1-смещенным и статистически отличалось от отношения, наблюдаемого после иммунизации S белком в комбинации с адъювантом $AlPO_4$, которое связано с Th2-смещенным ответом.

Пример 17

Иммуногенность белых новозеландских кроликов

Новозеландских белых кроликов иммунизировали внутримышечно однократной дозой 5×10^9 вч или уровнем клинической дозы 5×10^{10} вч Ad26COVS1 (N=5/уровень дозы). В группе отрицательного контроля вводили

физиологический раствор (N=5). Вектор Ad26NCOV006, который кодирует нативный полноразмерный S белок без стабилизирующих мутаций, позволил провести сравнение с Ad26COVS1 для оценки положительного действия стабилизирующих мутаций. Ответ антител, связывающих S белок, и ответ антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, измеряли в сыворотке, взятой на неделе 2 после введения дозы 1. Специфический клеточный ответ на S белок измеряли в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), взятых на неделе 3 после введения дозы 1.

Ответ антител, связывающих S белок

Однократная иммунизация вектором Ad26COVS1 приводила к зависимой от уровня дозы индукции антител, связывающих S белок (фиг. 81A). По сравнению с вектором Ad26NCOV006, кодирующим S белок без стабилизирующих мутаций, Ad26COVS1 индуцировал значительно более высокие титры связывающих антител.

Ответ нейтрализующих антител

Однократная иммунизация вектором Ad26COVS1 приводила к зависимой от уровня дозы индукции нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 с ответом у всех животных, которым вводили более высокий уровень дозы 5×10^{10} вч (фиг. 81B). Титры нейтрализации оказались низкими и вариабельными, что, вероятно, связано с ранним периодом анализа (неделя 2). По сравнению с вектором Ad26NCOV006, кодирующим S белок без стабилизирующих мутаций, вектор Ad26COVS1 индуцировал значительно более высокие титры нейтрализующих антител.

Специфический клеточный цитокиновый ответ на S белок

Для измерения клеточной иммуногенности PBMC стимулировали *ex vivo* собранными пептидами S белка дикого типа, а клеточный иммунный ответ определяли методом IFN-γ ELISpot. В день 21 после иммунизации PBMC выделяли и стимулировали *ex vivo* с использованием 2 собранных 15-членных пептидов, перекрывающихся по 11 аминокислотам, включающим полную последовательность S белка SARS-CoV-2 дикого типа. Продукцирование IFN-γ клетками PBMC измеряли через 18 ч после пептидной стимуляции методом ELISpot. При измерении через 3 недели после введения дозы 1 вектор Ad26COVS1 индуцировал независимый от уровня дозы клеточный ответ у всех животных, хотя ответ оказался ниже по сравнению с ответом после

иммунизации вектором Ad26NCOV006, кодирующим нативный S белок, т.е. без стабилизирующих мутаций (фиг. 82). Эти результаты подтвердили индукцию ассоциированного с Th1 цитокина IFN-γ, которую уже наблюдали в исследовании векторов Ad26COVS1 на мышах.

Пример 18

Иммуногенность и эффективность на модели сирийских хомяков

Сирийских хомяков иммунизировали внутримышечно в дозе 10^9 или 10^{10} вч Ad26COVS1 (N=6/группе) по однодозовой схеме (группы 5 и 6) или по двухдозовой схеме с 4-недельным интервалом (группы 13 и 14). Вектор Ad26NCOV006, который кодирует нативный полноразмерный S белок без стабилизирующих мутаций, вводили в тех же дозах и согласно схемам, что и вектор Ad26COVS1 (N=6/группу, 1-дозовые группы 1 и 2, 2-дозовые группы 9 и 10), что позволило провести сравнение для оценки положительного действия стабилизирующих мутаций Ad26COVS1. Группам отрицательного контроля вводили Ad26.Empty (N=6/группу) по схеме 1 и 2 доз (группы 7 и 8 и группа 15, соответственно). Ответ антител, связывающих S белок, и ответ антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, измеряли в сыворотке, полученной на неделе 4 после введения дозы 1. Животных, которым вводили вакцину по однодозовой схеме, заражали SARS-CoV-2 на неделе 4 с последующим периодом до 4 дней.

Ответ антител, связывающих S белок, и ответ нейтрализующих антител

Образцы сыворотки отбирали через 28 дней после иммунизации. Титры антител, связывающих S белок, измеряли методом ИФА. Контрольный образец Ad26Empty. N=18 представлен на фиг. 83A. Титры нейтрализующих антител измеряли с помощью wtVNA, при этом определяли цитопатический эффект (CPE) вирусного изолята Leiden1 (L-001) на клетках Vero E6 (фиг. 83B). Однократная иммунизация вектором Ad26COVS1 приводила к индукции антител, связывающих S белок, и антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, которые измеряли на неделе 4 после введения дозы 1, т. е. во время заражения у животных, которым вводили дозу по однодозовой схеме (фиг. 83A и 83B).

Вирусная нагрузка

Сирийских хомяков внутримышечно иммунизировали в дозе 1×10^9 или 1×10^{10} вч Ad26COVS1 (Ad26NCOV030) или Ad26NCVO006 (вектор Ad26, кодирующий нативный S белок) (N=6/уровень дозы) или Ad26.Empty (вектор Ad26, не кодирующий никаких антигенов COVID-19), N=6). Хомякам

интраназально вводили 10^2 штамма TCID50 SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 через 4 недели (день 28) после иммунизации. Ткань легкого извлекали после завершения фазы заражения (день C4) для анализа вирусной нагрузки. Компетентный к репликации вирус (TCID50 на грамм легкого) измеряли методом бляшкообразования. Компетентный к репликации вирус в легочной ткани определяли через 4 дня после заражения методом бляшкообразования.

Контрольная группа с имитацией иммунизации плацебо, в которой вводили Ad26.Empty, характеризовалась высокой вирусной нагрузкой в легких через 4 дня после заражения. Однократная доза Ad26COVS1 приводила к значительному снижению вирусной нагрузки по сравнению с животными в группе плацебо Ad26.Empty. Иммунизация вектором Ad26COVS1 приводила к значительно более низкой вирусной нагрузке по сравнению с вектором Ad26NCOV006, кодирующим S белок без стабилизирующих мутаций (фиг. 84). Вирусная нагрузка оказалась ниже предела обнаружения у большинства животных, иммунизированных вектором Ad26COVS1.

Потеря массы тела после нагрузки

Потерю массы тела определяли как меру тяжести заболевания после заражения SARS-CoV-2. Однократная доза Ad26COVS1 приводила к значительному снижению потери массы тела по сравнению с контрольными животными, иммунизированными плацебо Ad26.Empty, измеренному через 4 дня после заражения (фиг. 85). Значимое различие в потере массы тела в зависимости от уровня дозы между группами, иммунизированными Ad26COVS1 и Ad26NCOV006 ($p = 0,091$ t-критерий из дисперсионного анализа [ANOVA] с 3-кратной коррекцией Бонферрони) отсутствовало.

Пример 19

Иммуногенность у нечеловекообразных приматов (NHP)

Приматов NHP иммунизировали IM однократной дозой 10^{11} вч Ad26COVS1 (N=6), что соответствует высокой дозе вакцины, предназначенной для клинического применения. В группе отрицательного контроля вводили только физиологический раствор (N=4). Сыворотку для оценки гуморальной иммуногенности отбирали до иммунизации (неделя 0, базовая линия) и на неделе 2 и 4 после иммунизации. PBMC для клеточных анализов выделяли на неделе 0 и неделе 4.

Ответ антител, связывающих S белок, и ответ нейтрализующих антител

У приматов NHP однократная иммунизация Ad26COVS1 индуцировала антитела, связывающие S белок (фиг. 86A), и нейтрализующие антитела, измеряемые с помощью ppVNA (фиг. 86B) и wtVNA (фиг. 86C) уже на неделе 2 после иммунизации. Все анализы описаны в статье Chandrashekar и др. Наука. 2020, eabc4776. doi: 10.1126/science.abc4776.

По сравнению с неделей 2 средние титры связывающих антител на неделе 4 увеличились в 3,3 раза до 16 497 (диапазон титров: 4 450–57 790). Средние титры нейтрализующих антител к ppVNA увеличились в 5,8 раза до 408 (диапазон титров: 208-643) со 2-й по 4-ю неделю. Титры нейтрализующих антител к VNA дикого типа в целом составляли меньшие значения, но с течением времени в значительной степени увеличивались, средние титры нейтрализующих антител на 4-й неделе увеличивались в 6,2 раза до 113 (диапазон титров 53-234).

Специфический клеточный цитокиновый ответ на S белок

Для измерения клеточной иммуногенности PBMC стимулировали *ex vivo* собранными пептидами S белка дикого типа, а клеточный иммунный ответ определяли методом IFN-γ ELISpot. При измерении через 4 недели после иммунизации Ad26COVS1 индуцировал клеточный ответ у 5 из 6 животных (фиг. 86D). Это подтвердило индукцию связанного с Th1 цитокина IFN-γ, как уже наблюдалось у мышей и кроликов с Ad26COVS1.

Пример 20

Однократная вакцина Ad26 защищает от заражения SARS-CoV-2 макак-резус

Генерирование и иммуногенность вакцин-кандидатов Ad26

Как описано выше, было получено несколько векторов Ad26, экспрессирующих варианты S белка SARS-CoV-2: (i) с лидерной последовательностью (LS) активатора тканевого плазминогена (tPA) вместо LS дикого типа (wt) (tPA.S, COR200009: SEQ ID NO: 207), (ii) с лидерной LS tPA вместо LS дикого типа с полноразмерным S белком с мутацией сайта расщепления фурином и двумя мутациями, стабилизирующими пролин (tPA.S.PP, COR200010: SEQ ID NO: 208) , (iii) с нативным полноразмерным S белком (S; Wuhan/WIV04/2019), (iv) с лидерными последовательностями tPA и дикого типа с полноразмерным S белком (tPA.WT.S, COR200018: SEQ ID NO:

210)), и (v) с полноразмерным S белком с мутацией сайта расщепления фурином и мутациями, стабилизирующими пролин (S.PP; COR200007: SEQ ID NO: 205). Анализ вестерн-блоттингом подтвердил экспрессию шиповидного белка в клеточных лизатах, которые были заражены всеми векторами, и отсутствие продуктов расщепления фурина в клеточных лизатах с шиповидными вариантами с мутированными сайтами расщепления фурином (фиг. 87).

52 взрослых макаки резус разного пола в возрасте 6-12 лет иммунизировали векторами Ad26, экспрессирующими tPA.S (N=4), tPA.S.PP (N=4), S (N=4), tPA.WT. .S (N=4), S.PP (N=6) и плацебо контроль (N=20). Животных однократно иммунизировали внутримышечно 10^{11} вч векторов Ad26 без адъюванта на неделе 0. RBD-специфические связывающие антитела наблюдали с использованием ИФА почти у всех вакцинированных животных на неделе 2 и у всех вакцинированных животных на неделе 4 (фиг. 88A). Ответы нейтрализующих антител (NAb) оценивали с использованием как анализа нейтрализации псевдовируса (Chandrashekar A. и др. Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020), Yu J. И др. Science, doi:10.1126/science. abc6284 (2020), Yang, Z.Y. и др. Nature 428, 561-564, doi:10.1038/nature02463 (2004)) (фиг. 88B), так и анализа нейтрализации жизнеспособного вируса (данные не показаны). Титры NAb, измеренные с помощью обоих анализов нейтрализации, наблюдали у большинства вакцинированных животных на неделе 2 и на неделе 4 они увеличивались. Вакцина Ad26-S.PP (Ad26COVS1) вызывала самые высокие титры NAb псевдовируса (среднее значение 408, диапазон 208-643) и титры NAb жизнеспособного вируса (среднее значение 113, диапазон 53-233) на неделе 4. Средние титры NAb у макак, вакцинированных Ad26-S.PP, в 4 раза превышали средние титры Nab, (ранее опубликованные данные в когортах из 9 выздоравливающих макак и 27 выздоравливающих людей после выздоровления от инфекции SARS-CoV-210 (фиг. 93). Вакцина Ad26-S.PP также индуцировала низкие, но детектируемые S-специфические ответы IgG и IgA в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) (фиг. 94).

Наблюдалась индукция клеточных иммунных ответов у большинства вакцинированных животных на неделе 4 по данным анализов IFN-γ ELISPOT с использованием собранных S-пептидов (фиг. 89A). Многопараметрические анализы окрашивания внутриклеточных цитокинов использовали для оценки ответов Т-клеток IFN-γ+ CD4+ и CD8+ (фиг. 89B). Ответы оказались

сопоставимыми в различных группах вакцин, хотя наблюдалась тенденция к более низким ответам после введения вакцины Ad26-S.PP. IFN-γ+ и IL-2+ CD4+ Т клеточные ответы превышали IL-4+ и IL-10+ CD4+ Т клеточные ответы (фиг. 95), что свидетельствует об индукции Th1-смещенных клеточных иммунных ответов.

Защитная эффективность вакцин-кандидатов Ad26

На неделе 6 всех животных заражали в дозе $1,2\times10^8$ вч ($1,1\times10^4$ PFU) SARS-CoV-2 интраназальным (IN) и интратрахеальным (IT) методами (Chandrashekar A. и др. Science, doi:10.1126/science. abc4776 (2020), Yu, J. и др. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020)). Вирусную нагрузку в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) и мазках из носа (NS) оценивали методом ОТ-ПЦР на наличие субгеномной мРНК (sgmPHK), которая, как полагают, представляет собой реплицирующийся вирус (Chandrashekar A. и др., см. выше, Wolfel R. и др. Nature, doi:10.1038/s41586-020-2196-x (2020).

Все 20 контролей плацебо были инфицированы и у них наблюдался средний пик 4,89 (диапазон 3,85-6,51) $\log_{10}$ копий sgmPHK/мл в BAL (фиг. 90A). Напротив, у животных, которым вводили Ad26-S.PP, в образцах BAL вирус не обнаруживался (предел обнаружения 1,69 $\log_{10}$ копий sgmPHK/мл). Значительную защиту также наблюдали при действии других вакцин, причем у отдельных животных наблюдались низкие уровни sgmPHK в образцах BAL (фиг. 90B). Аналогичным образом в образцах плацебо наблюдался средний пик 5,59 (диапазон 3,78-8,01) $\log_{10}$ sgmPHK в образцах NS (фиг. 90C). Одно животное, которому вводили Ad26.S.PP, характеризовалось низким количеством вируса в образцах NS. Другие вакцины в целом характеризовались сниженной вирусной нагрузкой в образцах NS по сравнению с контролями, хотя наилучшая защита наблюдалась после введения Ad26.S.PP (фиг. 90D).

Сравнение пиковых вирусных нагрузок у вакцинированных животных свидетельствовало о том, что защита в образцах BAL в целом была более стабильной по сравнению с защитой в образцах NS (фиг. 91). Вакцина Ad26-S.PP обеспечивала полную защиту в нижних дыхательных путях и защиту у 5/6 животных в верхних дыхательных путях со снижением среднего пика sgmPHK >3,2 и >3,9 $\log_{10}$ в образцах BAL и NS, соответственно, по сравнению с плацебо-контролем ($P<0,0001$ и $P<0,0001$, соответственно, двусторонний критерий Манна-Уитни) (фиг. 91). Эти данные подтверждают актуальность

предварительной стабилизации S иммуногена перед слиянием. Из 32 вакцинированных 17 животных оказались полностью защищенными и не характеризовались детектируемой sgmPHK в образцах BAL или NS после заражения, а еще 5 животных не содержали sgmPHK в образцах BAL, но у них наблюдалось некоторое количество вируса в образцах NS.

Иммунный ответ у животных, вакцинированных Ad26.S.PP, после заражения

В контрольных группах плацебо наблюдались стабильные псевдовирусные ответы NAb (фиг. 92) и CD8+ и CD4+ T клеточные ответы (данные не показаны) в день 14 после заражения SARS-CoV-2. Ответ CD8+ и CD4+ T клеток у этих животных направлен против нескольких белков SARS-CoV-2, включая шиповидный (S1, S2), нуклеокапсидный (NCAP) и неструктурные белки (NS6, NS71, NS8). Напротив, у животных, которым вводили вакцину Ad26.S.PP, не наблюдались анамнестические ответы NAb (фиг. 92) и наблюдались только низкие T клеточные ответы против шиповидного белка (S1, S2) после заражения. Эти результаты согласуются с почти отсутствующими данными о вирусной нагрузке у этих животных (фиг. 90-91) и указывают на чрезвычайно низкие уровни репликации вируса у этих животных, если таковые вообще имеются, после заражения.

Разработка безопасной и эффективной вакцины против SARS-CoV-2 является важнейшим глобальным приоритетом. В настоящем изобретении было установлено, что однократная иммунизация вектором Ad26, экспрессирующим сконструированный S иммуноген, индуцирует стабильные ответы NAb и защищает от заражения SARS-CoV-2 макак резус. Лучшей вакциной в этом исследовании оказалась Ad26-S.PP (Ad26COVS1 или Ad26NCOV030), которая содержит лидерную последовательность дикого типа, полноразмерный связанный с мембраной S, мутацию фуринового сайта и две стабилизирующие мутации пролина.

Эти данные дополняют полученные ранее доклинические исследования инактивированных вирусных и ДНК-вакцин против SARS-CoV-2 на нечеловекообразных приматах (Yu J. и др. Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020), Gao Q. и др. Science, doi:10.1126/science.abc1932 (2020)). Инактивированные вирусные вакцины и вакцины на основе нуклеиновых кислот обычно требуют по меньшей мере 2 вакцинации, тогда как вакцины на основе

аденовирусных векторов могут индуцировать стабильный и продолжительный ответ антител после однократной иммунизации. Одноразовая вакцина против SARS-CoV-2 будет характеризоваться важными логистическими и практическими преимуществами по сравнению с двухдозовой вакциной для кампаний массовой вакцинации и борьбы с пандемией. Тем не менее, ранее также было установлено, что гомологичное бустерное введение векторов Ad26-HIV может повышать титры антител более чем в 10 раз как у нечеловекообразных приматов, так и у людей, что свидетельствует о том, что как однодозовые, так и двухдозовые схемы вакцинации Ad26-S.PP следует оценивать в ходе клинических испытаний. В настоящем исследовании вакцина Ad26.S.PP индуцировала ответы NAb после однократной иммунизации и обеспечивала полную или почти полную защиту от заражения SARS-CoV-2. Более того, титры NAb и ответы Т клеток у этих животных существенно не увеличивались после заражения, а ответы Т клеток не были напрвлены на невакцинные антигены, такие как нуклеокапсид и неструктурные белки, тогда как в контролях плацебо наблюдались стабильные титры NAb и ответы Т клеток к нескольким белкам SARS-CoV-2 после заражения. Эти данные позволяют предположить о минимальной репликации вируса или об ее отсутствии у животных, вакцинированных Ad26COVS1 после заражения.

Кроме того, следует отметить, что вакцины Ad26 вызывали Th1-смещенный, а не Th2-смещенный ответ CD4+ Т клеток, и у животных, у которых наблюдали субзащитные титры NAb, не наблюдалась усиленная репликация вируса.

Материалы и методы

Животные и дизайн исследования. 52 беспородных взрослых самца и самки макак резус индийского происхождения (Macaca mulatta) в возрасте 6-12 лет рандомизовали по группам. Все животные содержались в условиях Bioqual, Inc. (Роквилл, Мэриленд). Животным вводили векторы Ad26, экспрессирующие tPA.S (N=4), tPA.S.PP (N=4), S (N=4), tPA.WT.S (N=4), S.PP (N=6) и животным в группе плацебо (N = 20). Животных однократно иммунизировали в дозе 10^{11} вч векторов Ad26 внутримышечно без адъюванта на неделе 0. На неделе 6 всех животных заражали в дозе $1,2\times10^{8}$ вч ($1,1\times10^{4}$ PFU) SARS-CoV-2 (USA-WA1/2020, запас NR-52281; ресурсы BEI). Вирус вводили по 1 мл интраназально (IN) (по 0,5 мл в каждую ноздрю) и по 1 мл интратрахеально (IT). Все

иммунологические и вирусологические анализы проводили слепым методом. Все исследования на животных проводили в соответствии со всеми соответствующими местными, государственными и федеральными нормами и были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных Bioqual (IACUC).

Векторы Ad26 сконструировали с использованием нескольких версий последовательности шиповидного белка (S) SARS-CoV-2 (Wuhan/WIV04/2019). Последовательности оптимизировали по кодонам и синтезировали. Некомпетентные к репликации вектора Ad26 с делецией E1/E3 (Abbink P. и др. J Virol, т. 81, сс. 4654-4663, doi: JVI.02696-06 [pii]10.1128/JVI.02696-06 (2007)) получали в клетках PER.C6.TetR с использованием плазмиды, содержащей полный геном вектора Ad26 и экспрессионную кассету трансгена. Векторы секвенировали и тестировали на экспрессию перед использованием.

Анализ вестерн-блоттингом. Флаконы T-25, засеянные клетками 293T при слиянии 70-80%, временно трансфектировали векторами Ad26 SARS-Cov-2, а клеточные лизаты собирали через 48 ч после трансфектирования и отдельно смешивали с восстанавливающим буферным раствором для образцов (Pierce), нагревали в течение 5 мин при 95°C и запускали цикл на предварительно полученном геле для ЭФ 4-15% SDS-PAGE геле (Bio-Rad). Белок переносили на мембрану из поливинилидендифторида (PVDF) с использованием системы сухого блоттинга iBlot (Invitrogen) и блокирование мембраны проводили в течение ночи при 4°C в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко T (D-PBST), содержащем 0,2% Твин 20 (Sigma) (об./об.) и 5% (масс./об.) обезжиренного сухого молока. После блокирования в течение ночи мембрану PVDF инкубировали в течение 1 ч в 3% растворе молока DPBS-T, содержащем поликлональное антитело морской свинки против SARS в разведении 1:10000 (ресурсы BEI), в течение 1 ч. После этой инкубации мембрану PVDF пять раз промывали 5% раствором молока DPBS-T, а затем инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) против морской свинки или кролика в соотношении 1:30 000 (Jackson Immunoresearch) в 3% м растворе молока DPBS-T. В завершение мембрану PVDF снова пять раз промывали 5% раствором молока DPBS-T и проявляли в системе детекции Amersham ECL Plus Western blotting (GE Healthcare).

Анализ субгеномной иРНК. Субгеномную иРНК гена E SARS-CoV-2 (sgmPHK) оценивали методом ОТ-ПЦР и подхода, аналогичного описанному ранее[9,10,20]. Для получения стандартной кривой sgmPHK гена E SARS-CoV-2 клонировали в экспрессионную плазмиду pcDNA3.1, эту вставку транскрибировали с использованием набора для создания сообщений AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker Kit (Cellscript) для получения РНК для стандартов. Перед проведением ОТ-ПЦР образцы, собранные у зараженных животных, или стандарты подвергали обратной транскрипции с использованием Superscript III VILO (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Был разработан специальный анализ экспрессии генов Taqman (ThermoFisher Scientific) с использованием последовательностей, направленных на sgmPHK20 гена E. Реакции проводили в системае ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 и 7 Flex (Applied Biosystems) в соответствии со спецификациями производителя. Стандартные кривые использовали для расчета sgmPHK в копиях на мл или на мазок, чувствительность количественного анализа составляла 50 копий на мл или на мазок.

Анализ PFU. Для анализа бляшкообразования готовили конфлюэнтные монослои клеток Vero E6 в 6-луночных планшетах. Готовили серийные разбавления указанных образцов, полученных у зараженных животных, добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 1,5 мл 0,5% метилцеллюлозной среды и планшеты инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO_2 в течение 2 дней. Планшеты фиксировали при добавлении 400 мкл ледяного метанола на лунку и инкубации при -20°C в течение 30 минут. После фиксации метанол сливали и монослои клеток окрашивали 600 мкл в лунку 0,23% кристаллического фиолетового в течение 30 мин. После окрашивания кристаллический фиолетовый удаляли, а планшеты один раз промывали 600 мкл воды для визуализации и подсчета бляшек.

ИФА. Краткое описание метода: на 96-луночные планшеты наносили 1 мкг/мл белка RBD SARS-CoV-2 (Aaron Schmidt, MassCPR) в 1X DPBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты один раз промывали буферным раствором для промывки (0,05% Твин20 в 1 x DPBS) и блокировали 350 мкл казеинового блокирующего раствора/лунку в течение 2-3 ч при комнатной температуре. После инкубации блокирующий раствор удаляли, а

планшеты вытирали насухо. В лунки добавляли серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки, разбавленной в блокирующем растворе казеина, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед тремя дополнительными промывками и последующей инкубацией в течение 1 ч в разведении 1:1000 антител анти-макака IgG HRP (NIH NHP Reagent Program) в темноте при комнатной температуре. Затем планшеты трижды промывали буферным раствором для промывки и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора SeraCare KPL TMB SureBlue Start, реакцию в планшете останавливали добавлением 100 мкл стоп-раствора SeraCare KPL TMB на лунку. Поглощение при 450 нм регистрировали с использованием микропланшетного ридера VersaMax или Omega. Конечные титры ИФА определяли как самое высокое обратное разведение сыворотки, при котором поглощение > 0,2. Результаты представляли в виде конечного параметра титров Log10.

Анализ нейтрализации псевдовирусов. Псевдовирусы SARS-CoV-2, экспрессирующие репортерный ген люциферазы, конструировали с помощью подхода, аналогичного описанному ранее[9,10,16]. Краткое описание метода: пакующий конструкт psPAX2 (AIDS Resource and Reagent Program), люциферазную репортерную плазмиду pLenti-CMV Puro-Luc (Addgene) и шиповидный белок, экспрессирующий pcDNA3.1-SARS CoV-2 SΔCT, совместно трансфектировали в клетки HEK293T, содержащие фосфат кальция. Супернатанты, содержащие вирусы псевдотипа, собирали через 48 ч после трансфектирования, вирусы псевдотипа очищали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для определения нейтрализующей активности антисыворотки вакцинированных животных клетки HEK293T-hACE2 высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур при плотности $1{,}75\times10^4$ клеток/лунка в течение ночи. Готовили двукратные серийные разведения образцов сыворотки, инактивированной нагреванием, и смешивали с 50 мкл псевдовируса. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч перед добавлением к клеткам HEK293T-hACE2. Через 48 ч после инфицирования клетки лизировали в растворе Steady-Glo Luciferase Assay (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Титры нейтрализации SARS-CoV-2 определяли как разведение образца, при котором наблюдалось 50% снижение в единицах RLU по сравнению со средним значением для контрольных лунок с вирусом.

Анализ ELISPOT. На планшеты ELISPOT наносили мышиные моноклональные антитела против человеческого IFN-γ (BD Pharmingen) в концентрации 5 мкг/лунка в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали DPBS, содержащим 0,25% Твин20, и блокировали средой R10 (RPMI, содержащей 11% FBS и 1,1% пенициллин-стрептомицин) в течение 1 ч при 37°C. Собранные пептиды Spike 1 и Spike 2 содержат 15-членные пептиды, перекрывающиеся с 11 аминокислотами, которые охватывают последовательность белка и отражают N- и C-концевые половины белка, соответственно. Собранные пептиды Spike 1 и Spike 2 готовили в концентрации 2 мкг/лунку и добавляли 200000 клеток/лунку. Пептиды и клетки инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C. Все этапы, следующие за этой инкубацией, выполняли при комнатной температуре. Планшеты промывали буферным раствором для анализатора Коултера и инкубировали в течение 2 ч с кроличьим поликлональным биотинилированным анти-человеческим IFN-γ фирмы U-Cytech (1 мкг/мл). Планшеты промывали второй раз и инкубировали в течение 2 ч с антителами к стрептавидин-щелочной фосфатазе фирмы Southern Biotechnology (1 мкг/мл). После окончательной промывки добавляли раствор субстрата Nitor синий тетразолия хлорид/5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат пара-толудиновой соли (хромаген NBT/BCIP) в течение 7 мин. Хромоген удаляли, планшеты промывали водой и сушили в темном месте в течение 24 ч. Планшеты сканировали и считывали на анализаторе Immunospot Analyzer фирмы Cellular Technologies Limited.

Анализ окрашивания внутриклеточных цитокинов. 10^6 PBMC на лунку ресуспендировали в 100 мкл среды R10 с добавлением моноклонального антитела CD49d (1 мкг/мл). Каждый образец оценивали по сравнению с плацебо контролем (100 мкл R10 плюс 0,5% ДМСО, базовая линия), собранными пептидами (2 мкг/мл) или 10 мкг/мл ацетата форболмиристата (ФМА) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich) (100 мкл, положительный контроль) и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 0,25 мкл раствора GolgiStop и 0,25 мкл раствора GolgiPlug в 50 мкл R10 и инкубировали при 37°C в течение 8 ч, а затем выдерживали при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки дважды промывали DPBS, окрашивали красителем live/dead в ближней ИК области в течение 10 мин, а затем окрашивали заранее установленными титрами mAb против CD279 (клон EH12.1, BB700), CD38 (клон OKT10, PE), CD28 (клон 28.2, PE CY5), CD4 (клон L200,

BV510), CD45 (клон D058-1283, BUV615), CD95 (клон DX2, BUV737), CD8 (клон SK1, BUV805) в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали 2% буферным раствором FBS/DPBS и инкубировали в течение 15 мин в смеси с 200 мкл раствора BD CytoFix/CytoPerm Fixation/Permeabilization. Клетки дважды промывали 1X Perm Wash буферным раствором (BD Perm/WashTM Buffer 10X в наборе CytoFix/CytoPerm Fixation/Permeabilization, разбавленным водой MilliQ и пропущенным через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм) и окрашивали внутриклеточно моноклональными mAb и против Ki67 (клон B56, FITC), CD69 (клон TP1.55.3, ECD), IL10 (клон JES3-9D7, PE CY7), IL13 (клон JES10-5A2, BV421), TNF-α (клон Mab11, BV650), IL4 (клон MP4-25D2, BV711), IFN-γ (клон B27; BUV395), IL2 (клон MQ1-17H12, APC), CD3 (клон SP34.2, Alexa 700) в течение 30 мин. Клетки дважды промывали 1X Perm Wash буферным раствором и фиксировали 250 мкл свежеприготовленного 1,5% формальдегида. Фиксированные клетки переносили в 96-луночный круглодонный планшет и анализировали в системе BD FACSymphonyTM.

Статистический анализ. Анализ вирусологических и иммунологических данных проводили с использованием GraphPad Prism 8.4.2 (программное обеспечение GraphPad). Сравнение данных между группами проводили с использованием двусторонних критериев Манна-Уитни. Корреляции оценивали с использованием двусторонних критериев ранговой корреляции Спирмена. Значение P менее 0,05 считалось значимым.

Пример 21

Вакцина Ad26 защищает от тяжелой формы клинического заболевания SARS-CoV-2 у хомяков

В этом исследовании оценивали клинические и вирусологические характеристики высокой дозы инфекции SARS-CoV-2 у хомяков, а также в строгой модели оценивали защитную эффективность вакцины на основе вектора Ad26 по настоящему изобретению, кодирующего стабилизированный шиповидный SARS-CoV-2 (S).

20 сирийских золотистых хомяков (возраст 10-12 недель) заражали в дозе $5x10^4$ $TCID_{50}$ (N=4, низкая доза) или $5x10^5$ $TCID_{50}$ (N=16, высокая доза) SARS-CoV-2 интраназальным способом. В группе, в которой вводили высокие дозы, 4 животных умерщвляли в день 2, а 4 животных - в день 4 для выявления вирусной

нагрузки в тканях и гистопатологии, а за оставшимися 8 животными наблюдали в течение продолжительного времени.

Всех оставшихся животных умерщвляли в день 14. В группе с низкими дозами хомяки потеряли в среднем 14,7% массы тела к дню 6, но полностью восстановились к дню 14 (фиг. 96A, 96B), что согласуется с предыдущими исследованиями (Chan и др., Clin Infect Dis, doi:10.1093/cid/ciaa325, (2020), Sia и др., Nature, doi:10.1038/s41586-020-2342-5 (2020), Imai и др., Procc Natl Acad Sci USA, т. 117, сс. 16587-16595 (2020). В группе, в которой вводили высокие дозы, хомяки потеряли в среднем 19,9% массы тела к дню 6. Из 8 животных в этой группе, за которыми наблюдали в течении длительного времени, 4 соответствовали критериям гуманной эвтаназии IACUC: потеря веса >20% и респираторный дистресс в день 6, еще 2 дополнительных животных соответствовали этим критериям в день 7. Остальные 2 животных выздоровели к дню 14.

Эти данные свидетельствуют о том, что высокие дозы инфекции SARS-CoV-2 у хомяков приводили к серьезной потере веса и частичной смертности.

Вирусную нагрузку в ткани оценивали у 4 животных, которым вводили высокие дозы SARS-CoV-2 и умерщвлённых в день 2, у 4 животных, умерщвленных в день 4, и у 5 из 6 животных, которые соответствовали критериям эвтаназии в день 6-7 (фиг. 96C). Высокие средние тканевые вирусные нагрузки наблюдали в день 2: 10^{12} копий РНК/г в легочной ткани и 10^{8}–10^{9} 60 копий РНК/г в ноздрях и трахее, при среднем значении 10^{5}–10^{8} копий РНК/г сердца, желудочно-кишечного тракта, головного мозга, селезенки, печени и почкек, что указывает на диссеминированную инфекцию. В день 6-7 вирусная нагрузка в тканях составляла примерно на 2 log ниже, несмотря на продолжающуюся потерю веса.

Хомяков, инфицированных высокими дозами SARS-CoV-2, оценивали с использованием гистопатологии в дни 2 (N=4), 4 (N=4), 6-7 (N=6) и 14 (N=2). Инфекция связана с выраженными воспалительными инфильтратами и мультифокальным некрозом эпителия носовых раковин (фиг. 97a) и бронхиолярного эпителия, что приводило к дегенеративным нейтрофилам и клеточному дебрису в просвете (фиг. 97b). Эндотелий близлежащих сосудов проявлял реактивность с прилипанием мононуклеарных клеток к эндотелию и их трансмиграцией в стенки сосудов, что свидетельствует об эндотелиите (фиг.

97b). Отмечалась многоочаговая интерстициальная пневмония от умеренной до тяжелой формы, характеризующаяся легочной консолидацией, поражающей 30-60% легочной паренхимы уже в день 2 после заражения SARS-CoV-2 (фиг. 97c). Воспалительные инфильтраты состояли из большого количества макрофагов и нейтрофилов с меньшим количеством лимфоцитов. Эпителий носовых раковин (фиг. 97d) и бронхиолярные эпителиальные клетки (фиг. 97e) по данным иммуногистохимии (IHC) являются в значительной степени положительными в отношении нуклеокапсидного белка SARS (SARS-CoV-N) в областях воспаления и некроза. Анализ IHC SARS-CoV-N также свидетельствовал о локальном обширном окрашивании альвеолярных перегородок и интерстициальных мононуклеарных клеток, которое морфологически соответствовало макрофагам (фиг. 97f). Аналогичным образом значительное количество вирусной РНК (вРНК) SARS-CoV-2 наблюдали в бронхиолярном эпителии и легочном интерстиции в областях воспаления (фиг. 97g, 97h).

Уровни экспрессии как вРНК SARS-CoV-2, так и белка SARS-CoV-N в легких оказались самыми высокими в день 2 и снижались в день 4, при этом минимальные значения вРНК и белка SARS-CoV-N обнаруживались в день 7 (фиг. 100). Пневмония характеризовалась большими воспалительными инфильтратами макрофагов Iba-1+ в интерстиции легких, а также CD3+ Т лимфоцитов (фиг. 97i, 97j). Многочисленные жизнеспособные и дегенеративные нейтрофилы были обнаружены по всему легкому, особенно в областях некроза, с высокой экспрессией миелопероксидазы нейтрофилов (MPO) по всему легкому (фиг. 97k). Диффузная экспрессия продукта гена, индуцируемого интерфероном, MX1, также была обнаружена в легких (фиг. 971). В отличие от кинетики обнаружения вРНК SARS-CoV-2 и SARS-CoV-N, пик которой приходится на день 2, пик этих маркеров воспаления приходится на день 7 (фиг. 100), что совпадает с максимальной потерей веса и смертностью (фиг. 96A, 96B). Обнаружение вРНК в легких методом RNAscope не просто отражало вирусный инокулят, поскольку авторы изобретения обнаружили не только отрицательную антисмысловую вРНК, но и положительную смысловую вРНК, которые перекрывались по местоположению и профилю, с дня 2 по день 7 после заражения. Экспрессия вРНК SARS-CoV-2 (как антисмысловая, так и смысловая) присутствовала в легких со стабильной экспрессией рецептора ACE2 (данные не показаны).

Авторы изобретения получили рекомбинантные, неспособные к репликации векторы Ad26, кодирующие (i) шиповидный (S) SARS CoV-2 с делецией трансмембранной области и цитоплазматического хвоста, отражающего растворимый эктодомен с доменом тримеризации фолдона (S.dTM.PP), или (ii) полноразмерный S (S.PP), как с мутацией сайта расщепления фурином, так и с двумя стабилизирующими мутациями пролина (фиг. 98A). В примере 20 описана иммуногенность и защитная эффективность вакцины S.PP против заражения SARS-CoV-2 у макак резус.

В этом примере 50 сирийских золотистых хомяков иммунизировали в дозе 10^{10} или 10^{9} вч векторов Ad26, кодирующих S.dTM.PP или S.PP (N=10/группа), или контролей плацебо (N=10). Животным проводили однократную внутримышечную вакцинацию на неделе 0. Авторы изобретения наблюдали антитела, специфичные к домену связывания рецептора (RBD), методом ИФА (фиг. 98B) и нейтрализующие антитела (NAb) с использованием анализа нейтрализации псевдовируса (фиг. 98C) у всех животных на неделе 2 и неделе 4. На неделе 4 Ad26-S.PP вызывал в 4,0-4,7 раза более высокие средние титры ИФА (4470, 4757) по сравнению с Ad26-S.dTM.PP (1014, 1185) (фиг. 98B, $P<0,0001$, двусторонний критерий Манна-Уитни). Аналогичным образом Ad26-S.PP вызывал в 1,8–2,6 раза более высокие средние титры NAb IC50 (359, 375) по сравнению с Ad26-S.dTM.PP (139, 211) ($P <0,05$, двусторонний критерий Манна-Уитни). Для каждого вектора две исследованные дозы оказались сопоставимыми. Данные ИФА и NAb коррелировали как на неделе 2, так и на неделе 4 ($R=0,7074$, $P<0,0001$ и $R=0,7849$, $P<0,0001$, соответственно, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена).

Кроме того, авторы изобретения исследовали S-специфический и RBD-специфический ответ антител у вакцинированных животных на неделе 4 с использованием системной серологии (Chung и др., Cell, т. 163, сс. 988-998, doi:10.1016/j.cell.2015.10.027 (2015)). Оценивали ответы IgG, IgG2a, IgG3, IgM, Fc-рецепторов FcRγ2, FcRγ3 и FcRγ4 и антителозависимое отложение комплемента (ADCD) (фиг. 98D-98F). Более высокие и более стабильные ответы наблюдали при использовании Ad26-S.PP по сравнению с Ad26.S.dTM.PP (фиг. 98D, 98F), и анализ основных компонентов этих характеристик антител подтвердил, что эти две вакцины имели разные профили (фиг. 98E).

На неделе 4 всех животных заражали в дозе 5×10^5 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 интраназальным способом. Трех животных в каждой группе умерщвляли на день 4 для определения вирусной нагрузки в тканях и гистопатологии, а за оставшимися 7 животными в каждой группе наблюдали до дня 14. В группе плацебо хомяки теряли в среднем 19,6% массы тела в день 7 и 43% (3 из 7) животных, за которыми проводили длительное наблюдение, соответствовали критериям эвтаназии в дни 6-7 (фиг. 99A, 99B). Вакцинированные Ad26-S.dTM.PP животные потеряли в среднем 8,7% массы тела, а вакцинированные Ad26-S.PP животные потеряли в среднем 4,0% массы тела (фиг. 99A, 99B). Максимальная потеря массы оказалась заметно ниже в обеих вакцинированных группах по сравнению с плацебо-контролем ($P<0,0001$, двусторонний критерий Манна-Уитни, фиг. 99C), и у животных, которым вводили Ad26-S.PP, наблюдалась меньшая потеря массы по сравнению с животными, которым вводили Ad26.S.dTM.PP ($P<0,0001$, двусторонний критерий Манна-Уитни, фиг. 99C). Обе вакцины защищали от смертности, определенной как отвечающей критериям гуманной эвтаназии, по сравнению с контролем плацебо ($P = 0,02$, двусторонний точный критерий Фишера). Комбинированный анализ двух экспериментов на хомяках подтвердил, что обе вакцины эффективно защищают от смертности ($P = 0,007$, двусторонний точный критерий Фишера). Ответы ИФА на неделе 2 ($R=-0,8992$, $P<0,0001$) и неделе 4 ($R=-0,9344$, $P<0,0001$) обратно пропорционально коррелировали с максимальным процентом потери массы. Ответы NAb на неделе 2 ($R=-0,7380$, $P<0,0001$) и неделе 4 ($R=-0,8075$, $P<0,0001$) также обратно пропорционально коррелировали с максимальным процентом потери массы.

Гистиоцитарные и нейтрофильные воспалительные инфильтраты оказались заметно уменьшенными во всех долях легких, а у хомяков, вакцинированных Ad26-S.dTM.PP и Ad26-S.PP, наблюдали значительное снижение вРНК SARS-CoV-2 по сравнению с контрольной плацебо группой ($P = 0,004$ и $P = 0,004$ соответственно, двухсторонний критерий Манна-Уитни).

В этом примере было установлено, что однократная иммунизация вектором Ad26, кодирующим полноразмерный стабилизированный до слияния S иммуноген (S.PP), защищала хомяков от тяжелой формы клинического заболевания после введения высоких доз SARS-CoV-2. В контрольной группе плацебо регистрировали заметную потерю массу, тяжелую пневмонию и

частичную смертность. Напротив, вакцинированные животные характеризовались минимальной потерей массы и пневмонией и отсутствием смертности. Вызванные вакциной ответы связывания и нейтрализации антител коррелируют с защитой от клинического заболевания, а также со снижением репликации вируса в верхних и нижних дыхательных путях.

Такая тяжелая форма клинического заболевания в этой модели протеворечит предыдущим исследованиям, связанным с инфекцией SARS-CoV-2 у хомяков и других видов. Хомяки являются допустимой моделью для SARS-CoV-2 в результате их гомологии с человеческим рецептором ACE2, и описана передача инфекции между хомяками (Sia и др., Nature, doi: 10.1038/s41586-020-2342-5). (2020)). Высокая доза заражения привела к обширному клиническому заболеванию в настоящем исследовании, хотя биологические факторы, которые еще предстоит полностью определить, также могут влиять на клиническое заболевание, например, возраст животного, происхождение животного и стимуляция антигеном.

На сегодняшний день исследования вакцины против SARS-CoV-2 на нечеловекообразных приматах свидетельствовали о защите от инфекции или снижении репликации вируса в верхних и нижних дыхательных путях. В примере 20 описано, что однократная иммунизация Ad26-S.PP обеспечивала полную или почти полную защиту от заражения SARS-CoV-2 у макак резус. Однако инфекция SARS-CoV-2 у нечеловекообразных приматов не приводит к тяжелой форме клинического заболевания или летальному исходу. Таким образом, модель тяжелого заболевания представляется пригодной для дополнения существующих моделей заражения нечеловекообразных приматов, поскольку защита от репликации вируса не обязательно подразумевает защиту от тяжелого заболевания. Действительно, при гистопатологическом анализе хомяков в настоящем исследовании вирусная нагрузка в легких снижалась с дня 2 по день 7, в то время как маркеры воспаления продолжали увеличиваться в течение этого периода времени и коррелировали с продолжающейся потерей веса. Эти данные свидетельствуют о том, что прогрессирующее клиническое заболевание у хомяков представляет собой в первую очередь воспалительный процесс, который вызывается инфекцией, но продолжает нарастать даже при снижении репликации вируса.

Поскольку COVID-19 у людей может прогрессировать до тяжелой формы клинического заболевания, важно протестировать вакцины-кандидаты против SARS-CoV-2 на доклинических моделях, которые воспроизводят тяжелую форму клинического заболевания, включая молниеносную пневмонию и смертность. Модель хомяка с высокими дозами, описанная в этом примере, удовлетворяет многим из этих критериев и, следовательно, может являться пригодной для изучения патогенеза тяжелого заболевания и проверки контрмер. Первичным проявлением клинического заболевания в этой модели является тяжелая форма пневмонии, а не энцефалит, о котором сообщалось в некоторых моделях трансгенных мышей hACE2. Более того, ответы связывающих и нейтрализующих антител коррелируют с защитой.

Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что однократная иммунизация Ad26-S.PP обеспечивает надежную защиту от тяжелой формы клинического заболевания после заражения высокими дозами SARS-CoV-2 у хомяков. Насколько известно, о вакцинной защите от тяжелой пневмонии и смертности от SARS-CoV-2 ранее не сообщалось. Ad26-S.PP, также называемый Ad26.COV2.S, в настоящее время проходит клинические испытания. Эта модель тяжелой формы заболевания хомяков должна оказаться пригодной для тестирования вакцин, терапевтических средств и других контрмер против SARS-CoV-2.

Методы

Животные и дизайн исследования. 70 самцов и самок сирийских золотистых хомяков (Envigo) в возрасте 10-12 недель рандомизовали по группам. Все животные содержались в условиях Bioqual, Inc. (Роквилл, Мэриленд). Животным вводили векторы Ad26, экспрессирующие S.dTM.PP или S.PP, или контроли плацебо (N=10/группа). Животных однократно иммунизировали в дозе 10^{10} или 10^{9} вч векторов Ad26 внутримышечно без адъюванта на неделе 0. На неделе 4 всех животных заражали в дозе $5{,}0x10^{5}$ $TCID_{50}$ ($6x10^{8}$ вч, $5{,}5x10^{4}$ PFU) или $5{,}0x10^{4}$ $TCID_{50}$ ($6x10^{7}$ вч, $5{,}5x10^{3}$ PFU) SARS-CoV-2, полученный поле одного пересеивания из штамма USA-WA1/2020 (NR52281, ресурсы BEI). Вирус вводили интраназально (IN) в объеме 100 мкл (по 50 мкл в каждую ноздрю). Массу тела оценивали ежедневно. Все иммунологические и вирусологические анализы проводили слепым методом. В день 4 часть животных подвергали эвтаназии для оценки вирусной нагрузки на

ткани и патологии. Все исследования на животных проводили в соответствии со всеми соответствующими местными, государственными и федеральными нормами и были одобрены Комитетом по институциональному уходу и использованию животных Bioqual (IACUC).

Векторы Ad26. Векторы Ad26 конструировали с двумя вариантами последовательности шиповидного белка (S) SARS-CoV-2 (Wuhan/WIV04/2019; Genbank MN996528.1). Последовательности оптимизировали по кодонам и синтезировали. Неспособные к репликации вектора Ad26 с делецией E1/E3 получали в клетках PER.C6.TetR с использованием плазмиды, содержащей полный геном вектора Ad26 и трансгенную экспрессионную кассету. Плацебо контроли включали векторы Ad26-Empty. Векторы секвенировали и тестировали на экспрессию перед использованием.

Гистопатология и иммуногистохимия. Ткани фиксировали в свежеприготовленном 4% параформальдегиде в течение 24 ч, переносили в 70% этанол, заливали парафином на 7-10 дней и готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы нагревали в течение 30–60 мин при 65°C, затем депарафинизировали в ксилоле и регидратировали с использованием водно-этанольных растворов с постепенно понижающейся концентрацией этанола до дистиллированной воды. Для SARS-CoV-N высокотемпературную демаскировку эпитопов Iba-1 и CD3 IHC (HIER) выполняли с использованием скороварки на пару в течение 25 мин в цитратном буферном растворе (Thermo, AP-9003-500) с последующей обработкой 3% перекисью водорода. Затем срезы промывали дистиллированной водой и блокировали белком (BioCare, BE965H) в течение 15 мин, а затем промывали в 1x фосфатно-солевом буферном растворе.

Первичное кроличье антитело против нуклеопротеина SARS-CoV (Novus, NB100-56576 в разведении 1:500 или 1:1000), кроличье антитело против Iba-1 (Wako, 019-19741 в разведении 1:500) или кроличье анти-CD3 (Dako, A0452 в разведении 1:300) наносили в течении 30 мин, затем наносили кроличий конъюгат Mach-2 HRP-Polymer (BioCare; RHRP520L) в течении 30 мин, затем окрашивали гематоксилином с использованием подсиняющего раствора 0,25% водного раствора аммиака. Маркировку для SARS-CoV-N, Iba-1 и CD3 проводили в системе Biogenex i6000 (v3.02). В некоторых случаях окрашивание CD3, Iba-1 и ACE-2 проводили в присутствии CD3 в соотношении 1:400 (Thermo Cat. No. RM-9107-S, клон SP7), Iba-1 в соотношении 1:500 (BioCare Cat. №

CP290A, поликлональные антитела) или ACE-2 (Abcam; ab108252), все из которых были обнаружены с использованием кроличьего конъюгата Polink-1 HRP (номер по каталогу GBI Labs D13-110). Ответ на нейтрофилы (MPO) и IFN 1 типа (Mx1) определяли с использованием MPO (Dako, кат. № A0398, поликлональные антитела) при детекции в разведении 1:1000 с использованием кроличьего конъюгата Polink-1 HRP и Mx1 (EMD Millipore, кат. № MABF938, клон M143/CL143) при обнаружении в разведении 1:1000 с использованием мышиного конъюгата Polink-2 HRP (номер по каталогу GBI Labs D37-110). Окрашивание CD3, Iba-1, MPO и Mx1 IHC проводили, как описано ранее, в системе Biocare intelliPATH, при этом все антитела инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Патологию тканей оценивали независимо друг от друга два ветеринарных патологоанатома.

Гибридизация RNAscope *in situ*. Гибридизацию RNAscope *in situ* проводили, как описано ранее (Chandrashekar A. и др., Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020)) с использованием антисмыслового специфического зонда против SARS-CoV2 v-nCoV2019-S (ACD № по кат. , 848561), направленного на смысловую вирусную РНК, и специфического зонда vnCoV2019-orf1ab-sense (ACD Cat. No. 859151), направленного на геномную антисмысловую вирусную РНК. Краткое описание метода: после депарафинизации срезов в ксилоле и повторной гидратации с использованием водно-этанольных растворов с понижающейся концентрацией этанола до дистиллированной воды, демаскирование проводили в течение 30 мин в буферном растворе для демаскирования ACD P2 (ACD, кат. № 322000) при 95-98°C с последующей обработкой протеазой III (ACD № по каталогу 322337), разбавленной 1:10 в PBS в течение 20 мин при 40°C. Затем срезы инкубировали в смеси с 3% H_2O_2 в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Перед гибридизацией фракции зондов центрифугировали при 13 000 об/мин с использованием микроцентрифуги в течение 10 мин, затем разбавляли 1:2 в разбавителе для зондов (ACD, кат. № 300041) для уменьшения тканевых артефактов агрегации зонда. Срезы обрабатывали с использованием реагентов RNAscope® 2.5 HD Detection-RED (ACD № по каталогу 322360).

Количественный анализ изображений. Количественный анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения HALO (v2.3.2089.27 или v3.0.311.405, Indica Labs) по крайней мере на одном

поперечном срезе доли легкого от каждого животного. В тех случаях, когда было доступно > 1 поперечного сечения, каждую долю легкого оценивали количественно как отдельное значение данных. Для SARS-CoV-N использовали алгоритм Multiplex IHC v2.3.4 со скринингом исключения для кислого гематина, чтобы определить долю клеток, положительных по белку SAR-N, в процентах от общего числа клеток. Для количественного определения Iba-1 использовали алгоритм Multiplex IHC v2.3.4. Для количественного определения ISH и Mx1 в системе RNAscope SARS-CoV-2, модуль Area Quantification v2.1.3 использовали для определения доли общего антисмыслового или смыслового зонда SARS-CoV-2 или белка Mx1 в процентах от общей площади ткани. Для количественного определения MPO (нейтрофилов) и CD3+ клеток срезы снабжали комментариями, чтобы исключить кровеносные сосуды (> 5 мм^2), бронхи, бронхиолы, хрящи и соединительную ткань, впоследствии модуль Cytonuclear v1.6 использовали для обнаружения клеток MPO+ или CD3+ и рассчитывали как долю от общей альвеолярной ткани (PMN/мм^2), которую определяли с использованием модуля Area Quantification v2.1.3 21. Во всех случаях, чтобы убедиться, что комментарии были точными, проверку всех изображений на каждом образце выполняли вручную.

Анализ субгеномной иРНК. Субгеномную иРНК гена E SARS-CoV-2 (sgmPHK) оценивали с использованием ОТ-ПЦР и праймеров и зондов, как описано ранее[10,11,23]. Краткое описание метода: общую РНК экстрагировали из гомогенатов тканей из нескольких анатомических участков с использованием набора QIAcube HT (Qiagen) и RNeasy 96 QIAcube HT (Qiagen). Стандартную кривую строили с использованием sgmRNA гена E SARS-CoV-2 при клонировании в экспрессирующую плазмиду pcDNA3.1, эту вставку транскрибировали с использованием набора для создания сообщений AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker (Cellscript). Перед проведением ОТ-ПЦР образцы, полученные у зараженных животных, или стандарты подвергали обратной транскрипции в системе Superscript III VILO (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Специальный анализ экспрессии генов Taqman (ThermoFisher Scientific) разрабатывали с использованием последовательностей, направленных на sgmPHK гена E. Реакции проводили в системах ПЦР QuantStudio 6 и 7 Flex RealTime PCR (Applied Biosystems) в соответствии со спецификациями производителя. Для расчета копий sgmPHK на

грамм ткани использовали стандартные кривые, чувствительность количественного анализа составляла 100 копий.

ИФА. RBD-специфические связывающие антитела оценивали методом ИФА в основном, как описано в статье (Chandrashekar и др., Science, doi:10.1126/science.abc4776 (2020), Yu и др., Science, doi:10.1126/science.abc6284 (2020))[10,11]. Краткое описание метода: на 96-луночные планшеты наносили 1 мкг/мл белка RBD SARS-CoV-2 (Aaron Schmidt, MassCPR) или 1 мкг/мл шиповидного белка SARS-CoV-2 (Sino Biological) в 1X DPBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты однократно промывали буферным раствором для промывки (0,05% Твин20 в 1X DPBS) и блокировали 350 мкл казеинового раствора для блокировки на лунку в течение 2–3 ч при комнатной температуре. После инкубации раствор для блокировки удаляли, а планшеты вытирали насухо.

В лунки добавляли трехкратные серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки в казеиновом растворе для блокировки и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, планшеты промывали три раза, а затем инкубировали в течение 1 ч в присутствии 0,1 мкг/мл анти-хомякового конъюгата IgG HRP (Southern Biotech) в казеиновом растворе для блокировки при комнатной температуре в темноте. Планшеты промывали три раза, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора SeraCare KPL TMB SureBlue Start; реакцию в планшете останавливали добавлением 100 мкл стоп-раствора SeraCare KPL TMB на лунку. Поглощение при 450 нм регистрировали с использованием ридера для микропланшетов VersaMax или Omega. Конечные титры ИФА определяли как самое высокое обратное разведение сыворотки, при котором поглощение в 2 раза превышало фоновое.

Анализ нейтрализации псевдовирусов. Псевдовирусы SARS-CoV-2, экспрессирующие репортерный ген люциферазы, конструировали с использованием подхода, аналогичного описанному ранее[10,11,21].

Краткое описание метода: пакующий конструкт psPAX2 (AIDS Resource и Reagent Program), люциферазную репортерную плазмиду pLenti-CMV Puro-Luc (Addgene) и шиповидный белок, экспрессирующий pcDNA3.1-SARS CoV-2 SΔCT, совместно трансфектировали в клетках HEK293T с использованием липофектамина 2000 (ThermoFisher). Супернатанты, содержащие вирусы псевдотипа, собирали через 48 ч после трансфекции, вирусы псевдотипа

очищали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для определения нейтрализующей активности антисыворотки вакцинированных животных клетки HEK293T-hACE2 высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур при плотности $1,75\times10^4$ 293 клеток/лунку в течение ночи. Готовили трехкратные серийные разведения образцов сыворотки, инактивированной нагреванием, и смешивали с 50 мкл псевдовируса. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч перед добавлением к клеткам HEK293T-ACE2. Через 48 ч после инфицирования клетки лизировали в растворе Steady-Glo Luciferase Assay (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Титры нейтрализации SARS-CoV-2 определяли как разведение образца, при котором наблюдали 50% снижение в единицах RLU по сравнению со средним значением для контрольных лунок с вирусом.

Luminex. Специфический анализ Luminex проводили для определения относительного количества титров антиген-специфических антител, как описано ранее[25]. Таким образом, флуоресцентно меченные микросферы (Luminex) конденировали с антигенами SARS-CoV-2, включая шиповидный белок (S) (Eric Fischer, Dana Farber Cancer Institute), S1 и S2 (Sino Biological), а также рецептор-связывающий домен (RBD). (Aaron Schmidt, Ragon Institute) через ковалентные связи в присутствии эфира гидроксисукцинимида (NHS)–эфир N5O5 в присутствии EDC (Thermo Scientific) и Sulfo-NHS (Thermo Scientific). $1,2\times10^3$ 506 микросфер на область и антиген добавляли в 384-луночный планшет (Greiner) и инкубировали с разбавленной сывороткой (1:90 для анализа IgG2a, IgG3, IgM, 1:500 для анализов общего связывания IgG и Fc-рецепторов) в течение 16 ч при встряхивании при 900 об/мин и 4°C. После образования иммунных комплексов микросферы трижды промывали в 0,1% BSA и 0,05% Твин-20 (буферный раствор для анализа Luminex) в автоматической системе для промывки планшетов (Tecan). Меченые PE козьи антимышиные IgG, IgG2a, IgG3 и антитела IgM (southern biotech) для детектирования разводили в буферном растворе для анализа Luminex до 0,65 мкг/мл и инкубировали с микросферами в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании при 900 об/мин. Аналогично, для профилей связывания Fc-рецептора рекомбинантные мышиные FcγR2, FcγR3 и FcγR4 (Duke Protein Production) биотинилировали (Thermo Scientific) и конъюгировали со стрептавидином-PE в течение 10 мин перед добавлением к образцам (Southern Biotech). Эти мышиные антитела и белки

проявляют перекрестную реакционноспособность в отношении хомяков. Микросферы с покрытием затем промывали и считывали на проточном цитометре iQue (Intellicyt), снабженном роботизированным манипулятором (PAA). События гейтировали для каждой области микросфер и регистрировали среднее значение флуоресценции PE для положительных событий микросфер. Образцы анализировали в двух повторах для каждого вторичного агента обнаружения.

Антителозависимое отложение комплемента (ADCD). Анализ ADCD проводили, как описано ранее[26]. Краткое описание метода: SARS-CoV-2 S и RBD биотинилировали (Thermo Fisher) и конденсировалии с красными флуоресцентными нейтравидиновыми микросферами размером 1 мкм (Thermo Fisher) в течение 2 ч при 37 C, после чего избыток антигена смывали. Для образования иммунных комплексов в каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета добавляли $1{,}82\times10^{8}$ микросфер, покрытых антигеном, и инкубировали с образцами, разведенными 1:10, при 37°C в течение 2 ч. Лиофилизированный комплемент морской свинки растворяли в соответствии с инструкциями производителя (Cedarlane) в воде и добавляли по 4 мкл на лунку в буферном растворе веронал-желатин, содержащем Mg^{2+} и Ca^{2+} (GVB++, Boston BioProducts), к иммунным комплексам в течение 20 мин при 37°C. Иммунные комплексы промывали 15 мМ ЭДТА в PBS и добавляли фракцию козьего IgG, конъюгированного с флуоресцеином, к комплементу C3 морской свинки (MpBio).

После окрашивания образцы фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) и анализировали с использованием проточной цитометрии (Intellicyt, iQue Screener plus) и робота-манипулятора (PAA). Все события гейтировали по отдельным клеткам и положительным событиям в микросферах, результаты представляли в виде средних положительных событий C3. Все образцы анализировали в двух повторах в разные дни.

Статистический анализ. Анализ иммунологических, вирусологических данных и данных о массе тела проводили с использованием GraphPad Prism 8.4.2 (программное обеспечение GraphPad). Сравнение данных между группами проводили с использованием двусторонних критериев Манна-Уитни. Смертность оценивали с использованием двустороннего точного критерия Фишера. Корреляции оценивали с использованием двусторонних критериев ранговой

корреляции Спирмена. Значение P менее 0,05 считали значимым. Все системные серологические данные преобразовывали в log10. Для лепестковых графиков перед использованием среднего значения внутри группы каждую характеристику антител нормализовали таким образом, чтобы ее минимальное значение равнялось 0, а максимальное значение равнялось 1 по группам. Анализ основных компонентов (PCA) проводили с использованием пакета R версии 3.6.1 «ropls» для сравнения многомерных профилей. Для визуализации на тепловой карте представлены различия в средних значениях групп S.dTM.PP и S.PP для признаков с z-оценкой. Для указания значимости на тепловых картах использовали поправку Бенджамини-Хохберга для коррекции множественных сравнений в строке.

Пример 22

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 для оценки эффективности и безопасности Ad26.COV2.S для профилактики COVID-19, опосредованного SARS-CoV-2, у взрослых в возрасте 18 лет и старше.

Проведили рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 для оценки эффективности и безопасности Ad26.COV2.S для профилактики COVID-19, опосредованного SARS-CoV-2, у взрослых в возрасте 18 лет и старше.

Вектор Ad26.COV2.S, как описано в данном контексте, представляет собой моновалентную вакцину, состоящую из рекомбинантного, некомпетентного к репликации вектора аденовируса типа 26 (Ad26), сконструированного для кодирования шиповидного белка (S) коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2), как описано в данном контексте.

Это многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, основное исследование, фаза 3, эффективности и безопасности взрослых в возрасте ≥18 лет. Эффективность, безопасность и иммуногенность Ad26.COV2.S оценивали у участников с более высоким риском заражения COVID-19 (в зависимости от возраста, пола, расы/этнической принадлежности, профессии, сопутствующих заболеваний), проживающих или посещающих места с высокой активностью SARS-CoV-2 после введения 2 доз исследуемой вакцины.

Участников рандомизировали параллельно в соотношении 1:1 для введения внутримышечных (IM) инъекций Ad26.COV2.S или плацебо, как показано в таблице ниже. Ad26.COV2.S вводили в дозе 1×10^{11} вирусных частиц (в.ч.) или в дозе 1×10^{10} по схеме с одной или двумя дозами.

Предполагалось, что как минимум примерно 25% включенных в испытания участников находятся в возрасте ≥60 лет, а максимум примерно 25% включенных в испытания участников находятся в возрасте от ≥18 до <40 лет.

Использовали следующую поэтапную стратегию включения в испытания:

Этап 1: первоначально 1000 участников без сопутствующих заболеваний, связанных с повышенным риском прогрессирования тяжелой формы COVID-19 (включая 500 реципиентов Ad26.COV2.S и 500 реципиентов плацебо, равномерно распределяли по возрастным группам) включали в 2 возраст-зависимые подгруппы (от ≥ 18 лет до <60 лет на этапе 1a и ≥60 лет на этапе 1b), исходя из приемлемых данных по безопасности в день 29 и адекватных данных по иммуногенности, включая Т-хелперы 1/Т-хелперы 2 (Th1/ Th2) из соответствующих возрастных групп первого исследования на людях (FIH) VAC31518COV1001 (дополнительные сведения см. в основной части этого документа).

Этап 2: после перерыва в вакцинации на этапе 1, чтобы обеспечить для независимого комитета по мониторингу данных (IDMC, также известному как Совет по мониторингу безопасности данных [DSMB]) изучение 3-дневных данных о безопасности (состоящие из всех нежелательных явлений (AE) 4-й степени и всех серьезных нежелательных явлений (SAE)), при отсутствии проблем с безопасностью регистрацию продолжали, при этом набор участников расширяли с включением участников с сопутствующими заболеваниями, связанными с повышенным риском прогрессирования тяжелой формы COVID-19, в 2 возрастных подгруппах (от ≥ 18 лет до <60 лет на этапе 2a и ≥60 лет на этапе 2b).

Сопутствующие заболевания (или факторы риска), которые связаны или могут быть связаны с повышенным риском прогрессирования тяжелой формы COVID-19, включали: астму средней и тяжелой степени, хронические заболевания легких, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) (включая эмфизему и хронический бронхит), идиопатический легочный фиброз и кистозный фиброз, диабет (включая тип 1, тип 2 или гестационный),

тяжелые сердечные заболевания, включая сердечную недостаточность, ишемическую болезнь сердца, врожденный порок сердца, кардиомиопатию и (легочную) гипертензию или высокое кровяное давление, ожирение (индекс массы тела [BMI] $\geq$30 кг/м^2), хронические заболевания печени, включая цирроз, серповидно-клеточную анемию, талассемию, цереброваскулярное заболевание, неврологические состояния (слабоумие), терминальную стадию почечной недостаточности, трансплантацию органов, рак, инфекцию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и другие инфекции иммунодефицита гепатита B, апноэ во сне, болезнь Паркинсона, судороги, ишемические инсульты, внутричерепное кровоизлияние, синдром Гийена-Барре, энцефалопатию, менингоэнцефалит, и участников, которые живут в домах престарелых или лечебных учреждениях для хронических больных. Подробности и исключения см. в критериях исключения в этом документе.

Продолжительность индивидуального участия, включая скрининг, составляла максимум 2 года и 3 месяца. При невозможности завершения исследования, но при сохранении согласия участником, проводили ранний выход из исследования. Завершением исследования считали завершение последнего визита последнего участника исследования.

Ключевые оценки эффективности включали наблюдение за признаками и симптомами, подобными COVID-19, регистрацию госпитализаций и осложнений, связанных с COVID-19, а также лабораторное подтверждение инфекции SARS-CoV-2 с использованием молекулярного анализа (на основе ОТ-ПЦР) и с использованием серологии анти-SARS-CoV-2. Проводили также оценки иммуногенности и прежде всего оценки гуморальных иммунных ответов с учетом нейтрализующих и связывающих антител. Ключевые оценки безопасности включали мониторинг сообщаемых и несообщаемых пациентами AE (только в подгруппах безопасности) и сбор SAE и MAAE у всех участников. Вирусную нагрузку SARS-CoV-2 оценивали в подтвержденных случаях COVID-19. Изучали также биомаркеры, коррелирующие с инфекцией SARS-CoV-2 и тяжестью течения COVID-19. Использование медицинских ресурсов (MRU) после вакцинации было зарегистрировано для всех участников с симптоматическим COVID-19, подтвержденным на молекулярном уровне. На выбранных площадках для ковариационного анализа собирали дополнительные базовые характеристики, связанные с текущей рабочей ситуацией, жизненной

ситуацией и взаимодействием с населением, если это разрешено местным законодательством.

В течение 1 года после второй вакцинации каждого участника не реже двух раз в неделю с использованием электронной оценки клинических результатов (eCOA) опрашивали в отношении развития у него каких-либо новых симптомов или проблем со здоровьем, которые могут быть связаны с инфекцией SARS-CoV- 2. Начиная с 1 года после 2-й вакцинации и до конца 2-летнего периода наблюдения частота этих опросов с использованием eCOA уменьшалась до одного раза в 2 недели. Все участники оставались под наблюдением на предмет обострения заболевания до последнего предусмотренного исследованием. Для всех участников, которые были потеряны для последующего наблюдения в рамках eCOA и для которых госпитализация не была зарегистрирована, были предприняты все усилия для документального подтверждения их статуса.

Все участники с COVID-19-подобными признаками или симптомами, соответствующими заранее установленным критериям подозрения на COVID-19 на COVID-19 дни 1-2 и дни 3-5, должны пройти процедуры лечения COVID-19 (как описано в основной части этого протокола) до тех пор, пока не проходило 14 дней после проявления симптомов (COVID-19, день 15) или до разрешения эпизода COVID-19, в зависимости от того, что наступало раньше, если только не будет подтверждено, что оба мазка из носа, полученные на COVID-19 в дни 1-2 и 3-5 дали отрицательный результат в отношениидля SARS-CoV-2. Разрешение эпизода COVID-19 определялось как наличие 2 последовательных отрицательных мазков из носа на SARS-CoV-2 и 2 последовательных дней без признаков или симптомов, связанных с COVID-19. Во время разрешения эпизода COVID-19 собранная информация применялась к определению клинического случая.

Должны быть приняты все необходимые меры предосторожности (в соответствии с местным законодательством) для защиты медицинского персонала и других лиц, контактировавших с участниками, у которых подозревается наличие COVID-19, до тех пор, пока не был получен отрицательный результат с использованием молекулярных методов, или которые являются положительными и соответствуют предварительно установленным критериям для подозрения на COVID-19 в дни 1-2 и 3-5 до тех пор, пока они не

переставали быть положительными. В случае подтвержденной инфекции SARS-CoV-2 уведомляли участника и поставщика медицинских услуг участника и/или местные органы здравоохранения (при необходимости), а участнику предлагали соблюдать соответствующие меры и ограничения, как определено местным законодательством.

Определение случая COVID-19 от умеренной до тяжелой формы

В качестве первичного конечного параметра рассматриваются все умеренные и тяжелые/критические случаи COVID-19.

Определение случая COVID-19 умеренной степени тяжести

Положительный результат ОТ-ПЦР или молекулярного теста на SARS-CoV-2 из любого доступного образца из дыхательных путей (например, образца мазка из носа, образца мокроты, образца мазка из горла, образца слюны) или другого образца.

И в любой момент в ходе наблюдения:

Одышка (затрудненное дыхание)

Или

Любой 1 из следующих новых или ухудшающихся симптомов и любой 1 из следующих новых или ухудшающихся симптомов:

Признаки	Симптомы
Частота дыхания ≥20 вдохов/минуту	Лихорадка (≥38,0°C или ≥100,4°F)
Аномальное насыщение кислородом (SpO_2), но все еще >93% в комнатном воздухе на уровне моря*	Кашель
ЧСС ≥90 ударов в минуту	Больное горло
Клинические или рентгенологические признаки пневмонии	Недомогание, о чем свидетельствует 1 или более из следующих признаков: - Потеря аппетита - В целом плохое состояние - Повышенная утомляемость - Физическая слабость
Рентгенологические признаки тромбоза глубоких вен (ТГВ)	Головная боль
	Мышечная боль (миалгия)
	Желудочно-кишечные симптомы (диарея, рвота, тошнота, боль в животе)

* Критерии SpO_2 следует корректировать в зависимости от высоты над уровнем моря.

Или

Любые 2 из следующих новых или ухудшающихся симптомов:

Лихорадка (≥38,0°C или ≥100,4°F)
Сильный озноб или мышечная ригидность
Кашель
Больное горло
Недомогание, о чем свидетельствует 1 или более из следующих элементов*: - потеря аппетита - в целом плохое состояние - повышенная утомляемость - физическая слабость
Головная боль
Мышечная боль (миалгия)
Желудочно-кишечные симптомы, о чем свидетельствует 1 или более из следующих элементов*: - диарея - рвота - тошнота - боль в животе
Покраснение или синяки на ногах или пальцах ног
Новые или изменяющиеся обонятельные или вкусовые расстройства

*Наличие 2 или более элементов симптома (например, рвота и диарея или утомляемость и потеря аппетита) регистрируется только как 1 симптом для определения случая. Чтобы соответствовать определению случая, у участника должны наблюдаться по меньшей мере 2 разных симптома.

Определение случая тяжелой/критической формы COVID-19

Положительный результат ОТ-ПЦР или молекулярного теста на SARS-CoV-2 любого доступного образца из дыхательных путей (например, образца мазка из носа, образца мокроты, образца мазка из горла, образца слюны) или другого образца.

И любой 1 признак из следующих в любое время в ходе наблюдения:

Клинические признаки в покое, свидетельствующие о тяжелом системном заболевании (частота дыхания ≥30 вдохов/мин, частота сердечных сокращений ≥125 ударов/мин, насыщение кислородом (SpO_2) ≤93% в комнатном воздухе на уровне моря* или парциальное давление кислорода/фракция вдыхаемого кислорода (PaO_2/FiO_2) <300 мм рт.ст.)

* Критерии SpO_2 следует корректировать в зависимости от высоты над уровнем моря.

Дыхательная недостаточность (определяется как потребность в высокопоточной оксигенации, неинвазивной вентиляции, механической вентиляции или экстракорпоральной мембранной оксигенации [ECMO])

Признаки шока (определяемые как систолическое артериальное давление <90 мм рт.ст., диастолическое артериальное давление <60 мм рт.ст. или требующие повышающих кровяное давление факторов)

Значительная острая почечная, печеночная или неврологическая дисфункция

Поступление в отделение интенсивной терапии

Летальный исход

Определение случая легкой формы COVID-19

Положительный результат ОТ-ПЦР или молекулярного теста на SARS-CoV-2 любого доступного образца из дыхательных путей (например, образца мазка из носа, образца мокроты, образца мазка из горла, образца слюны) или другого образца,

И в любой момент в ходе наблюдения:

Один из следующих симптомов: лихорадка (≥38,0°C или ≥100,4°F), боль в горле, недомогание (потеря аппетита, общее недомогание, утомляемость, физическая слабость), головная боль, мышечная боль (миалгия), желудочно-кишечные симптомы, кашель, заложенность грудной клетки, насморк, свистящее дыхание, кожная сыпь, раздражение или выделения из глаз, озноб или новая потеря вкуса или обоняния.

Случай считается клинически легким, если он соответствует приведенному выше определению случая, но не соответствует определению от умеренной до тяжелой/критической формы.

Пример 23

Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, первое у человека (FIH) многоцентровое исследование фазы 1/2a с участием взрослых в возрасте от ≥ 18 до ≤ 55 лет и старше 65 лет с оценкой безопасности, реактогенности и иммуногенности Ad26.COV2.S

Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование фазы 1/2a было разработано для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности Ad26.COV2.S, вектора на основе нереплицирующегося аденовируса 26, экспрессирующего

стабилизированный перед слиянием шиповидный (S) белок SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, вводимый в дозе 5×10^{10} или 1×10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на одну вакцинацию либо в виде однократной дозы, либо в виде двух доз с интервалом в 56 дней для здоровых взрослых (18-55 лет, когорта 1a, n=377) и здоровых пожилых людей (старше 65 лет, когорта 3, n=394). Уровни индуцированных вакциной S-специфических антител измеряли методом ИФА, нейтрализующие титры измеряли методом нейтрализации вируса дикого типа (wtVNA). Th1 и Th2 оценивали с использованием окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS).

Методы

Дизайн исследования и участники

Исследование представляет собой многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности Ad26.COV2.S в дозах $5x10^{10}$ вч или $1x10^{11}$ вч, вводимых внутримышечно (IM) в виде одной или двух доз с интервалом 8 недель здоровым взрослым в возрасте 18–55 лет и > 65 лет. Схема клинического испытания представлена на фиг. 101.

Ad26.COV2.S представляет собой рекомбинантный, неспособный к репликации вектор Ad26, кодирующий сконструированную версию S белка SARS-CoV-2, полученного из первого клинического изолята штамма Wuhan (Wuhan, 2019, последовательность полного генома NC_045512), как описано в данном контексте. Исследование проводили в нескольких клинических центрах в Бельгии и США. Всех субъектов проверяли на наличие COVID-19 при сборе образцов из носа для ПЦР, и в случае положительного результата таких пациентов исключали, а также с использованием доступных на месте серологических анализов для выявления предыдущей инфекции SARS-CoV-2 с максимальным числом серопозитивных участников 25, разрешенных между когортой 1a и когортой 3. Исследование рассматривали и одобряли экспертным советом учреждения. Все участники предоставляли письменное информированное согласие перед включением в испытания.

Рандомизация и осуществление слепого исследования

402 подходящих участника в возрасте 18–55 лет и 405 участников старше 65 лет рандомизировали в группы для проведения одной или двух вакцинаций в дозе вакцины $5x10^{10}$ или $1x10^{11}$ вч или плацебо (PL) (1:1:1:1 на возрастную

группу): $5x10^{10}$ вч/$5x10^{10}$ вч, $5x10^{10}$ вч/ PL, $1x10^{11}$ вч/ $1x10^{11}$ вч, $1x10^{11}$ вч/ PL, или PL/PL (фиг. 101). Рандомизацию проводили с использованием интерактивной системы веб-связи (IWRS) и стратифицировали по сайтам с использованием рандомизации внутри блоков. Участников и исследователей оценивали слепым методом на протяжении всего исследования. Вакцину и плацебо поставляли в идентичных непомеченных шприцах. Спонсор и специалисты по статистике были разделены открытым методом на группы для промежуточного анализа после завершения всеми участниками испытания в день 29 или после его более раннего завершения.

Конечные параметры

Конечные параметры обеспечения основных целей безопасности и реактогенности каждой схемы включалинежелательные явления (AE) в течение 28 дней после каждой вакцинации, местная и системная реактогенность в течение 7 дней после каждой вакцинации и серьезные нежелательные явления (SAE) на протяжении всего исследования. AE оценивали в соответствии с руководством FDA «Шкала оценки токсичности для здоровых взрослых и подростков-добровольцев, участвующих в клинических испытаниях профилактических вакцин». Вторичным конечным параметром являлся гуморальный иммунный ответ на S белок SARS-CoV-2 по данным S специфического ИФА и нейтрализующих титров против SARS-CoV-2 дикого типа в wtVNA, и клеточные иммунные ответы, измеренные методом ICS.

Методики

Участникам вводили внутримышечные (IM) инъекции в дозе $5x10^{10}$ вч или $1x10^{11}$ вч Ad26.COV2.S или плацебо (0,9% физиологический раствор) в объеме 1 мл в дельтовидную мышцу в день 1. Сообщаемые пациентом AE регистрировали в дневниках пациента в течение 7 дней после вакцинации, нежелательные AE в течение 28 дней после вакцинации и SAE на протяжении всего исследования. Образцы крови для химического анализа сыворотки, гематологии и для определения иммунных показателей собирали в несколько моментов времени на протяжении всего исследования, образцы мочи для теста на беременность собирали до вакцинации.

В начальный день и в день 29 с использованием ИФА измеряли антитела, специфически связывающие шиповидный S белок. Серопозитивность определяли как титр >50,3 EU/мл. Титры сывороточных нейтрализующих

антител против SARS-CoV-2 измеряли в wtVNA с использованием штамма SARS-CoV-2 Victoria/1/2020 в Public Health England (PHE). Серопозитивность в wtVNA определяли как титр IC50 >58. S специфические Т клеточные ответы SARS-CoV-2 измеряли в начале исследования (базовая линия) и в день 15 с использованием внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) и двух 15-членных S пептидных фракций, перекрывающихся по 11 аминокислотным остаткам. Ответ Th1 характеризовали CD4+ Т-клетками, экспрессирующими IFNg и/или IL-2, а не IL-4, IL-5 и/или IL13, и ответ Th2 характеризовали экспрессией IL-4, IL-5 и/или IL-13 и CD40L с использованием CD4+ Т-клеток. Все анализы проводили слепым методом, как описано ниже.

Анализы нейтрализации вируса дикого типа SARS-CoV-2

Нейтрализующие антитела, способные ингибировать вирусные инфекции дикого типа, количественно определяли методом анализа микронейтрализации вируса дикого типа (MNA), который был разработан и одобрен Управлением общественного здравоохранения Англии (PHE). Используемые штаммы вируса получены из штамма Victoria/1/2020.

Краткое содержание метода: 6 двукратных серийных разведений инактивированных нагреванием образцов сыворотки человека готовили в 96-луночных планшетах для переноса. Вирус дикого типа SARS-CoV-2 последовательно добавляли к разведениям сыворотки в целевой рабочей концентрации (примерно 100 бляшкообразующих единиц [PFU] на лунку) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 60–90 мин. Затем смесь сыворотки и вируса переносили на планшеты для анализа, предварительно засеянные в течение ночи клетками почек африканской зеленой мартышки Vero E6, и инкубировали при 37°C и в атмосфере 5% CO_2 в течение 60–90 мин перед добавлением покровной (двухфазной) среды на основе карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и последующей инкубации в течении 24 ч. После этой инкубации клетки фиксировали и окрашивали с использованием пары антител, специфичных к белку SARS-CoV-2 RBD S, и визуализировали иммунные бляшки с использованием субстрата TrueBlueTM. Иммунобляшки подсчитывали с использованием анализатора Immunospot от CTL. Количество иммунобляшек экспортировали в программное обеспечение SoftMaxpro, и нейтрализующий титр образца сыворотки рассчитывали как обратное разведение сыворотки, соответствующее 50% титру нейтрализующих антител (ID50) для этого образца.

Иммуноферментный анализ (ИФА) шиповидного белка

Концентрации антител, специфически связывающихся с SARS-CoV-2 с предшественником шиповидного белка, определяли методом ИФА человеческого IgG предшественника шиповидного белка SARS-CoV-2, который представляет собой непрямой ИФА, основанный на взаимодействиях антитело/антиген. Используемый антиген SARS-CoV-2 представляет собой стабилизированный шиповидный белок до слияния ((2P), Δфурин, фолдон T4, His-Tag), продуцируемый в клетках ES-293. ИФА был разработан и аттестован для человеческой сыворотки в Nexelis, Laval, Канада. Краткое описание метода: очищенный антиген SARS-CoV-2 предшиповидного белка адсорбировали в лунки микропланшета и добавляли разбавленные образцы сыворотки (исследуемые образцы, стандарт и контроль качества). Несвязанный образец смывали и добавляли конъюгированный с ферментом античеловеческий IgG. После отмывания избытка конъюгата добавляли колориметрический субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB). По истечении установленного периода времени реакцию останавливали. Эталонный стандарт на каждом исследованном планшете использовали для количественного определения количества антител против SARS-CoV-2 прешественника шиповидного белка в образце в соответствии с единицей, установленной стандартом (лабораторная единица ИФА на миллилитр: ELU/мл).

Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS)

Т клеточный ответ на S-белок SARSCoV2 была охарактеризована с использованием 27-цветного ICS, квалифицированного в лабораториях сети испытаний вакцины против ВИЧ, Fred Hutchinson Cancer Research Center (HVTN, FHCRC), Сиэтл, Вашингтон, США.

Криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) оттаивали и оставляли на ночь, затем стимулировали в течение 6 ч при 37°C двумя консенсусными пептидными фракциями, входящими во всю длину последовательности шиповидного белка SARSCoV2, диметилсульфоксидом (ДМСО) (отрицательный контроль) или стафилококковым энтеротоксином B (SEB) (положительный контроль). Брефельдин A добвляли в ходе стимуляции для предотвращения высвобождения цитокинов. Клетки сначала окрашивали красителем для оценки жизнеспособности, затем смесью внеклеточных антител, затем фиксировали, подвергали пермеабилизации и окрашивали смесью антител

для внутриклеточных маркеров, включая цитокины Th1 и Th2. Флуоресценцию клеток измеряли с использованием 5-лазерных 30-параметрических цитометров Becton-Dickinson FACSymphony и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo.

Статистические методы

Это исследование было разработано для оценки безопасности и иммуногенности. Данные по безопасности были проанализированы описательно в полном наборе для анализа, а данные об иммуногенности были проанализированы в популяции иммуногенности согласно протоколу. Титры антител, связывающих шиповидный белок (S) SARS-CoV-2, выраженные в единицах ИФА на миллилитр (EU/мл), и титры нейтрализующих антител в wtVNA, выраженные как обратное разведение сыворотки, нейтрализующее 50% дозы исследуемого вируса (50% ингибирующая концентрация [IC50]), приводили в масштабе log10 и описывали с использованием среднегеометрических GMT и 95% доверительных интервалов (CI). Для обоих анализов сероконверсию определи как наличие титра антител выше нижнего предела количественного определения (LLOQ) после вакцинации, если исходный титр был ниже LLOQ, или 4-кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем после вакцинации, если исходный титр был выше LLOQ. Ответы ICS описывали как % родительской популяции. Положительность образца определяли с использованием одностороннего точного критерия Фишера при сравнении нестимулированных лунок с лунками, стимулированными S пептидом. LLOQ составлял 0,22%, а не поддающиеся количественной оценке значения были рассчитаны как LLOQ/2. Соотношение Th1/Th2 рассчитывали, если ответы Th1 и/или Th2 являлись положительными и превышали 2xLLOQ. Если ответ участника Th1 или Th2 не соответствовал этим критериям, соотношение Th1/Th2 считали равным более 1, если отсутствовал ответ Th2, и составлял менее 1, если отсутствовал ответ Th1.

Полученные результаты

Участники исследования

Участники были обследованы по состоянию на 13 июля 2020 г., вакцинацию участников групп в когортах 1a и 1б (возраст 18–55 лет) начали 22 июля 2020 г. (группа 1a), 22 июля 2020 г. (группа 1б) и первые вакцинации были завершены в когорте 1a 4 августа 2020 г. и в когорте 1b 7 августа 2020 г. Было

обследовано 575 добровольцев, из которых 380 были включены в когорту 1a (377 вакцинированных), 28 добровольцев прошли скрининг и 25 включены в группу 1b (25 вакцинированных) (фиг. 102A и 102B, соответственно). 7 (1,7%) участников оказались серопозитивными к SARS-CoV-2 при скрининге, уровень серопозитивности к Ad26 будет сообщен позже. Вакцинацию участников в когорте 3 (возраст >65 лет) начинали 3 августа 2020 г., а первые вакцинации завершали 24 августа 2020 г. Было обследовано 660 добровольцев, из которых 405 были включены в испытания (394 вакцинированных) (фиг. 102C). Доступными оказались результаты иммуногенности только первых 15 участников в когорте 3. Исходные характеристики в целом оказались сопоставимыми между группами.

Безопасность и реактогенность вакцины

Сообщаемые пациентами AE регистрировали в дневниках пациентов в течение 7 дней после вакцинации, несообщаемые AE в течение 28 дней после вакцинации и SAE на протяжении всего курса исследования. Для того, чтобы участники и исследователи, проводившие оценку участников этих двух исследований, оставались “слепыми”, в этом промежуточном отчете данные по безопасности представлены без группового раскрытия.

В когортах 1a и 1b (возраст 18 – ≤ 55 лет) оценка исследователями реактогенности являлась доступной для 402 участников, из которых у 288 (72%) были зарегистрированы несообщенные SAE. Сообщенные местные AE были зарегистрированы у 235 (58%) участников – в основном степени 1/2. Три участника сообщили о боли/болезненности 3 степени. Наиболее частым AE оказалась боль в месте инъекции. Сообщенные системные AE были зарегистрированы у 258 (64%) участников, в основном степени 1/2, а о системных AE 3-й степени сообщали 46 (11%) участников. Наиболее частыми AE оказались утомляемость, головная боль и миалгия. Лихорадку зарегистрировали у 76 (19%) участников, лихорадку 3 степени - у 22 (5%) участников. В целом, 98 участников сообщили о 178 несообщенных AE, из них 12 сообщили о AE 3 степени.

В целом в когорте 3 (возраст ≥65 лет) оценка исследователями реатогенности является доступной для 394 участников, из которых 183 (46%) участника сообщили о несообщенных AE. Сообщенные местные AE были зарегистрированы у 108 (27%) участников, большинство из которых относились

к степени 1/2, при этом 1 участник сообщил о припухлости и эритеме 3 степени. Наиболее частым АЕ являлась боль в месте инъекции. Сообщенные системные АЕ были зарегистрированы у 140 (36%) участников, большинство из которых относились к степени 1/2, при этом 3 участника сообщили о АЕ 3-й степени. Наиболее частыми АЕ оказались головная боль, утомляемость и миалгия. Легкая или умеренная лихорадка 1 или 2 степени была зарегистрирована у 14 (4%) участников, только у 1 из которых была зарегистрирована 2 степень. В когорте 3 не было отмечено сильных или других признаков лихорадки, ограничивающей повседневную активность (3 степень). Всего у 46 участников зарегистрировали 77 сообщенных АЕ. У 4 участников зарегистрировали несообщенные АЕ 3 степени. Ни в одной когорте не было зарегистрировано сообщенных или несообщенных АЕ 4-й степени.

Ни один участник не завершил исследование из-за АЕ. Было зарегистрировано два SAE: одна гипотензия, по мнению исследователя, не была связана с вакциной из-за анамнеза рецидивирующей гипотензии, и один участник с лихорадкой был госпитализирован на ночь из-за подозрения на COVID-19 и выздоровел в течение 12 ч.

Иммуногенность Ad26.COV2.S

Антитела к стабилизированному полноразмерному шиповидному белку SARS-CoV-2 оценивали методом ИФА. В когорте 1a у 94% и 98% участников в начале исследования были зарегистрированы среднегеометрические титры (GMT) к S белку SARS-CoV-2 ниже LLOQ, которые в день 29 после вакцинации увеличились до 528 (95% ДИ: 442, 630) и 695 (95% CI: 596, 810) для групп доз 5×10^{10} и 1×10^{11} вч, соответственно, с сероконверсией 99% в каждой группе доз (фиг. 103A). 88% (7/8) и 67% (2/3) участников когорты 1a (для $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ групп дозы vp соответственно), которые в начале исследования являлись серопозитивными, соответствовали заданному критерию 4-кратного увеличения титра связывающих антител и рассматривались как чувствительные к вакцине. Все 15 впервые включенных участников в когорте 3 изначально являлись серонегативными и сероконвертированными в день 29 после вакцинации, а GMT составлял 507 (95% ДИ: 181, 1418) и 248 (95% ДИ: 122, 506) для доз $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно. GMT, равный 899, наблюдали в панели реконвалесцентной сыворотки человека (HCS), использованной в этом

исследовании, с перекрытием 95% ДИ GMT для обеих доз в каждой когорте, что указывает на отсутствие существенной разницы титров, вызванных вакциной.

В подгруппе участников (n = 50 для каждой из групп доз $5x10^{10}$ вч и $1x10^{11}$ вч) уровни нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 измеряли с использованием wtVNA. В когорте 1a, в которой для обеих доз титр GMT < LLOQ в начале испытаний для обеих доз в день 29 увеличился до IC50 GMT 214 (95% ДИ: 177, 259) и 243 (95% ДИ: 200, 295) для групп, которым вводили $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно. Аналогичные результаты наблюдали в индикатороной группе когорты 3, в которой в начале исследования GMT < LLOQ, GMT в день 29 увеличился до 196 (95% ДИ: 69, 560) и 127 (95% ДИ: <LLOQ, 327) для групп 5×10^{10} и 1×10^{11} вч, соответственно, (фиг. 103B). Для сравнения, GMT 522 измеряли в панели HCS, использованной в данном анализе, с перекрытием в 95% ДИ GMT между панелью HCS и группами обеих доз и когортами. Несколько образцов для исследования вакцин достигли верхнего предела количественного определения (ULOQ = 640) для анализа образцов вакцины и проходили повторный анализ. Тестирование образца более высокого разведения позволило определить более высокие титры с более высоким ULOQ. Образцы HCS анализировали при более высоком разведении по сравнению с образцами для исследования вакцины, поэтому некоторые из этих образцов характеризуются титром более ULOQ, представленного в данном контексте. В день 29 после вакцинации у 98% участников в когорте 1a были обнаружены нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2, независимо от введенной дозы вакцины. Степень сероконверсии в день 29 составила 92% для группы $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч в группе когорты 1a и 100% (6/6) и 83% (5/6) для группы $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч в когорте 3. В когорте 1a, в общей сложности 82% и 94% участников в группе $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно, достигались титры выше 100, что указывает на устойчивый ответ, вызванный у подавляющего большинства участников после однократной вакцинации Ad26.COV2. C. Титры wtVNA и S-ELISA в когорте 1a хорошо коррелировали с корреляцией Спирмена 0,86. Данные анализа нейтрализации псевдовируса, экспрессирующего S-белок SARS-CoV-2, будут обсуждены и включены в полную публикацию промежуточного анализа после введения дозы 1.

S-специфические ответы CD4+ и CD8+ T клеток SARS-CoV-2 характеризовали в подгруппе участников исследования в начале исследования и

через 15 дней после вакцинации. После стимуляции пептидами, включающими всю последовательность S белка, ответы CD4+ Th1 увеличились с недетектируемого в начале исследования до 0,08% (95% ДИ: 0,05, 0,16) и 0,11 (95% ДИ: 0,07, 0,16) через 15 дней после вакцинации для групп $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно, у участников в когорте 1a и от недетектируемого в начале исследования до 0,36% (95% ДИ: 0,15, 0,89) и 0,13 (95% ДИ: 0,04, 0,50) для доз $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно, в индикаторной группе в когорте 3 (фиг. 103C). 76% (95% ДИ: 65, 86) и 83% (95% ДИ: 73, 91) положительных ответов Th1 наблюдали у реципиентов дозы $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно, в когорте 1a. У первых 15 участников в когорте 3 100% (95% ДИ: 54, 100) и 67% (95% ДИ: 22, 96) положительные ответы Th1 наблюдали у реципиентов дозы $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно. Ответы Th2 не оценивали количественно (значениям приписаны величины LLOQ/2) ни в одной из групп, за исключением одного участника в группе 5×10^{10} вч в когорте 1a (фиг. 103C). Однако соотношение Th1/Th2 для этого участника составило 28,9, что свидетельствует о фенотипе с Th1-смещением. У всех других участников, у которых регистрировали детектируемые ответы Th1 и/или Th2, соотношение Th1/Th2 изменялось в диапазоне от 1,0 до 68,5. В целом эти данные указывают на то, что Ad26.COV2.S индуцирует Th1-смещенные ответы в обеих возрастных группах.

S-специфические ответы CD8+ T клеток идентифицировали по экспрессии цитокинов IFNg и/или IL-2 при стимуляции S пептидом (фиг. 103D). Через 15 дней после вакцинации величина S-специфического ответа CD8+ T-клеток составила 0,07% (95% ДИ: 0,03, 0,19) и 0,09% (95% ДИ: 0,05, 0,19) для группы, в которой вводили $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно, в когорте 1a, и 0,05% (0,02, 0,24) и до 0,07% (0,02, 0,14) для групп $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно, в когорте 3, 51% (95% ДИ: 39, 63) и 64% (95 % ДИ: 52, 75) участников характеризовались положительным ответом CD8+ T клеток на стимуляцию S пептидом для групп $5x10^{10}$ и $1x10^{11}$ вч, соответственно, в когорте 1a, и 33% (95% ДИ: 4%, 78%) участников из групп обеих доз в когорте 3 проявляли стойкий индуцируемый вакциной ответ T клеток CD8+.

Обсуждение результатов

Промежуточный анализ данного исследования фазы 1/2a свидетельствует о том, что вакцина-кандидат Ad26.COV2.S характеризуется пригодным

профилем безопасности и реактогенности и является иммуногенной как в группе дозы $5x10^{10}$ вч, так и $1x10^{11}$ вч.

Однократная доза Ad26.COV2.S вызывала сильные гуморальные ответы у подавляющего большинства реципиентов вакцины. Уровни S-связывающих антител, измеренные методом ИФА, увеличились от базовой линии до дня 29 после вакцинации у 99% участников в когорте 1a и у 100% первых участников в когорте 3, независимо от уровня введенной дозы вакцины. Точно так же высокие показатели ответа наблюдали в wtVNA. Через 29 дней после вакцинации у 98% участников обнаруживали нейтрализующие антитела. 92% участников в когорте 1a и, соответственно, 6 из 6 и 5 из 6 реципиентов дозы $5x10^{10}$ вч и $1x10^{11}$ вч в когорте 3 характеризовались сероконверсией по нейтрализующим антителам против SARS-CoV-2. В когорте 1a от 84% до 92% участников харакетризовались титром нейтрализующих антител более 100. Ответ нейтрализующих антител почти у всех участников, о которых сообщается в данном контексте, наблюдался после однократной дозы Ad26.COV2.S.

Эти клинические данные свидетельствуют о том, что Ad26.COV2.S при обоих уровнях доз индуцирует сильный ответ нейтрализующих антител у подавляющего большинства здоровых молодых и пожилых участников со стабильным состоянием здоровья. Хотя до сих пор в анализ было включено лишь ограниченное число участников когорты 3, сходная иммуногенность Ad26.COV2.S у взрослых в возрасте 18–55 лет и взрослых в возрасте >65 лет, описанная в данном контексте, является обнадеживающей, так как защита пожилых людей, риск развития тяжелой формы COVID-19 у которых гораздо выше, чрезвычайно важна, особенно для снижения нагрузки на системы здравоохранения во время этой пандемии. По сравнению с сывороткой выздоравливающих людей от COVID-19 уровни связывающих и нейтрализующих антител, индуцированных Ad26.COV2.S, оказались ниже, хотя и в том же диапазоне для большинства участников. Однако значимость этого сравнения еще не установлена из-за изменчивости состава панелей сыворотки человека, а также отсутствия стандартизации анализов антител в сыворотке выздоравливающих пациентов. При использовании другой панели HCS сравнение (соотношение) с титрами образцов вакцины будет отличаться. Демографические данные, такие как возраст, тяжесть заболевания и время, прошедшее с начала заболевания, а также количество образцов в панели, могут

влиять на измеренный уровень антител, что приводит к произвольности надлежащего сравнения образцов вакцины.

Предыдущий опыт работы с животными моделями вакцин против SARS-CoV и MERS-CoV вызвал обеспокоенность по поводу ассоциированного с вакциной усиленного респираторного заболевания (VAERD). Была предложена связь между этой проблемой безопасности и слабой нейтрализующей способностью гуморального иммунитета и Th2-сдвигом. В данном изобретении было установлено, что Т-клеточные ответы, вызванные Ad26.COV2.S, в подавляющем большинстве случаев оказались со сдвигом Th1 с отсутствием или очень низкими ответами Th2. Действительно, у всех реципиентов соотношение Th1/Th2 составляло более 1, что соответствует предыдущему опыту авторов настоящего изобретения при разработке вакцинной платформы на основе Ad26. Этот устойчивый ответ Th1 сопровождался устойчивым ответом Т клеток CD8+ после вакцинации. Общая устойчивая индукция ответов CD4+ Th1 и CD8+ Т клеток в дополнение к сильным гуморальным ответам, вызванным Ad26.COV2.S, сводит к минимуму теоретический риск VAERD.

Очевидно, что эффективная однодозовая вакцина против COVID-19 характеризуется большими преимуществами перед двухдозовой схемой вакцинирования в отношении с текущей пандемией и значительно повышает вероятность немедленного воздействия на временные рамки, в которых пандемию SARS-CoV-2 можно контролировать. При условии, что иммунный ответ, вызванный однократной дозой Ad26.COV2.S, может защитить от инфекции SARS.CoV.2 или COVID-19, важным неизвестным фактором является стойкость этого иммунного ответа. Данные о стойкости иммунного ответа, вызванного однократной дозой Ad26.COV2.S, а также об иммунном ответе после второй дозы Ad26.COV2.S, станут доступны в ходе этого продолжающегося исследования ph1/2a.

В заключение следует отметить, что профиль безопасности и иммуногенность после однократной вакцинации являются стимулом дальнейшей клинической разработки вектора Ad26.COV2.S в качестве потенциально защитной вакцины против COVID-19. Этот промежуточный анализ указывает на то, что однократная доза Ad26.COV2.S либо в дозе $5x10^{10}$ вч, либо $1x10^{11}$ вч является безопасной, хорошей переносимостью и обладает высокой иммуногенностью. На основании схожей иммуногенности обоих уровней дозы

для дальнейшего исследования была выбрана доза 5×10^{10} вч. В первом исследовании фазы 3 оценивали эффективность однократной дозы $5x10^{10}$ вч вакцины-кандидата Ad26.COV2.S. В настоящее время готовится дополнительное исследование фазы 3 для оценки эффективности и устойчивости иммунитета при двухдозовой схеме вакцины $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S.

Пример 24

Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, впервые с участием человека (FIH) многоцентровое исследование фазы 1/2a у взрослых в возрасте от ≥ 18 до ≤ 55 лет и ≥ 65 лет, для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности вектора Ad26.COV2.S - Отчет о промежуточном анализе иммуногенности в когорте 3

Этот промежуточный анализ в когорте 3 включает открытые данные групповой гуморальной иммуногенности, полученные методом анализа нейтрализации вируса дикого типа (wtVNA) и твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), собранные до (и включая) визита в день 28 после первой дозы (день 29). Кроме того, описаны данные о клеточной иммуногенности, полученные методом внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), собранные до (и включая) визита в день 14 после первой дозы (день 15) для подгруппы участников.

Цели и конечные параметры

Цели/конечные параметры этого исследования, применимые к промежуточному анализу группы 3, представлены ниже.

Цели	Конечные параметры
Вторичные	
Оценить гуморальный и клеточный иммунный ответ на Ad26.COV2.S.	Гуморальный иммунный ответ Все участники когорты 3: - Титры нейтрализации SARS-CoV 2 в сыворотке, измеренные методом psVNAa или wtVNA. - Антитела, связывающие SARS-CoV-2, измеренные методом ИФА. Клеточный иммунный ответ Подмножество участников когорты 3: - Иммунные ответы Т-хелперов (Th) 1 и Th2, оцененные методом проточной цитометрии после стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) пептидом S белка SARS-CoV-2 и ICS, включая CD4+/CD8+, гамма-интерферон (IFNγ), интерлейкин (IL)-2, фактор некроза опухоли альфа (TNF-α)[b], IL-4, IL-5, IL-13 и/или другие маркеры Th1/Th2.

[b]TNF-α не включен в промежуточный анализ иммуногенности когорты 3.

Методы

Обзор дизайна исследования

Схема исследования описана в примере 23.

Иммуногенность

При оценке гуморальной иммуногенности (wtVNA и ИФА) образец считали положительным, если значение строго более LLOQ (>LLOQ). Определение реципиента для гуморальной иммуногенности осуществляли следующим образом:

- Исходное значение образца менее или равно LLOQ (≤LLOQ), а значение образца после исходного уровня строго более LLOQ (>LLOQ)

- Исходное значение образца строго больше, чем LLOQ (>LLOQ), а значение образца после исходного уровня представляет собой по крайней мере 4-кратное (≥4-кратное) увеличение по сравнению с исходным значением образца.

При оценке клеточной иммуногенности (ICS) положительность образца определяли с использованием точного критерия Фишера, где происходит сравнение ложных и стимулированных условий.

Оценка соотношения ответов Th1/Th2

На основе комбинированной пептидной фракции SARS-Cov2-S и с использованием только временных точек после исходного уровня соотношение ответа Th1/Th2 рассчитывали для образцов, которые удовлетворяют хотя бы одному из следующих двух условий:

- ответ Th1 («IFN-g или IL2 не равен TH2»), который одновременно является положительным и ≥ 2 x LLOQ,

или

- ответ Th2 («IL4 или IL5, или IL13 и CD40L»), который является положительным и ≥ 2 x LLOQ

При анализе соотношения Th1/Th2, LLOQ составляет 0,022% для обеих клеточных популяций (Th1 и Th2).

Если обе клеточные популяции (Th1 и Th2) являлись положительными и ≥ 2 x LLOQ, то отношение Th1/Th2 рассчитывали как числовой результат.

Если только одна клеточная популяция (либо Th1, либо Th2) являлась положительной и ≥ 2 x LLOQ, то для определения качественной оценки соотношения Th1/Th2 использовали следующие правила:

- Если одна клеточная популяция являлась положительной, а другая отрицательной, то положительная клеточная популяция больше, чем отрицательная клеточная популяция: если ответ Th1 положительный, а ответ Th2 отрицательный, то соотношение Th1/Th2 составляет « >1”. Если ответ Th1 отрицательный, а ответ Th2 положительный, то соотношение Th1/Th2 составляет «<1».

- Если обе клеточные популяции положительны, то клеточная популяция составляет ≥ 2 x LLOQ, больше, чем клеточная популяция, которая составляет < 2 x LLOQ: если ответ Th1 составляет ≥ 2 x LLOQ, а ответ Th2 составляет < 2 x LLOQ, тогда соотношение Th1/Th2 составляет «>1». Если ответ Th1 < 2 x LLOQ, а ответ Th2 ≥ 2 x LLOQ, тогда соотношение Th1/Th2 составляет «<1».

Результаты

В этом примере описан анализ данных гуморального иммунного ответа (wtVNA и ИФА), полученных в когорте 3 до (и включая) визита в день 28 после введения дозы 1 (день 29). Кроме того, в этом примере описаны данные о клеточном иммунном ответе (ICS), полученные в когорте 3 до (и включая) визита в день 14 после введения дозы 1 (день 15) для подгруппы участников. Сводка данных об иммуногенности представлена ниже.

Демографические и исходные характеристики

Демографические данные участников и исходные характеристики приведены в таблице 2. Большинство участников являлись белокожими (09,5%). В целом участники включали 50,1% женщин и 49,9% мужчин. Средний возраст составил 69,00 лет (диапазон: 65,0–88,0 лет), а средний индекс массы тела (BMI) — 25700 кг/м^2 (диапазон: 16,60–29,90 кг/м^2). Демографические и исходные характеристики в целом были хорошо сбалансированы между группами вакцинации.

Таблица 2: Сводка демографических и исходных характеристик, когорта 3, полный набор для анализа (исследование VAC31518COV1001)

Набор анализов: полный	Ad26 5e10	Ad26 1e11	Плацебо	Все субъекты
	161	161	81	403
Возраст (лет)				
N (число)	161	161	81	403
Среднее отклонение (СО)	69,63 (3,990)	69,99 (4,249)	69,89 (3,732)	69,83 (4,040)
Среднее значение	69,00	69,00	69,00	69,00
Интервал	(65,0, 83,0)	(65,0, 88,0)	(65,0, 79,0)	(65,0, 88,0)

65-75 лет	148 (91,9%)	148 (91,9%)	74 (91,4%)	370 (91,8%)
> 75 лет	13 (8,1%)	13 (8,1%)	7 (8,6%)	33 (8,2%)
Пол				
N (число)	161	161	81	403
Женский	77 (47,8%)	82 (5,9%)	43 (53,1%)	202 (50,1%)
Мужской	84 (52,2%)	79 (49,1%)	38 (46,9%)	201 (49,9%)
Неопределяемый	0	0	0	0
Раса				
N (число)	161	161	81	403
Белая	158 (98,1%)	158 (98,1%)	81 (100,0%)	397 (98,5%)
Черная или афро-американская	1 (0,6%)	2 (1,2%)	0	3 (0,7%)
Азиатская	0	0	0	0
Коренные жители Гавайских островов или других островов Тихого океана	0	0	0	0
Американские индейцы или коренные жители Аляски	1 (0,6%)	0	0	1 (0,2%)
Смешанная	0	0	0	0
Неизвестная	1 (0,6%)	0	0	1 (0,2%)
Несообщенная	0	1 (0,6%)	0	1 (0,2%)
Этническая принадлежность				
N (число)	161	161	81	403
Испанцы или латиноамериканцы	1 (0,6%)	2 (1,2%)	3 (3,7%)	6 (1,5%)
Не испанцы или латиноамериканцы	160 (99,4%)	159 (98,8%)	78 (96,3%)	397 (98,5%)
Неизвестная	0	0	0	0
Несообщенная	0	0	0	0
Масса (кг)				
N (число)	161	161	81	403
Среднее отклонение (СО)	73,917 (11,8631)	73,584 (12,8941)	71,806 (13,5441)	73,360 (12,6223)
Среднее значение	72,900	73,900	69,900	72,900
Интервал	(46,00, 109,10)	(46,30, 108,90)	(45,10, 98,90)	(45,10, 109,10)
Рост (см)				
N (число)	161	161	81	403
Среднее отклонение (СО)	170,719 (8,8360)	169,288 (9,8092)	168,275 (10,5211)	169,656 (9,6068)

Среднее значение	169,200	168,500	170,000	169,000
Интервал	(146,70, 193,00)	(151,10, 193,00)	(147,50, 193,20)	(146,70, 193,20)
BMI (кг/м^2)				
N (число)	161	161	81	403
Среднее отклонение (СО)	25,272 (2,8286)	25,515 (2,6968)	25,205 (3,1319)	25,356 (2,8370)
Среднее значение	25,700	25,700	25,600	25,700
Интервал	(16,60, 29,90)	(17,90, 29,90)	(17,20, 29,80)	(16,60, 29,90)
Центр исследований				
N (число)	161	161	81	403
BE10001	21 (13,0%)	21 (13,0%)	10 (12,3%)	52 (12,9%)
BE10002	12 (7,5%)	10 (6,2%)	5 (6,2%)	27 (6,7%)
BE10003	14 (8,7%)	14 (8,7%)	7 (8,6%)	35 (8,7%)
BE10004	28 (17,4%)	27 (16,8%)	14 (17,3%)	69 (17,1%)
US10001	23 (14,3%)	25 (15,5%)	12 (14,8%)	60 (14,9%)
US10003	21 (13,0%)	21 (13,0%)	11 (13,6%)	53 (13,2%)
US10004	13 (8,1%)	14 (8,7%)	8 (9,9%)	35 (8,7%)
US10006	15 (9,3%)	14 (8,7%)	7 (8,6%)	36 (8,9%)
US10008	14 (8,7%)	15 (9,3%)	7 (8,6%)	36 (8,9%)
Серопозитивный статус SARS-CoV-2 на исходном уровне				
N (число)	161	161	81	403
Положительный	1 (0,6%)	2 (1,2%)	1 (1,2%)	4 (1,0%)
Отрицательный	160 (99,4%)	159 (98,8%)	80 (98,8%)	399 (99,0%)
Примечание: Ns для каждого параметра отражают непропущенные данные. СО: стандартное отклонение, диапазон: минимальное значение - максимальное значение Примечание: Ad26 5e10: Ad26.COV2.S 5x10^{10} в.п.; Ad26 1e11: Ad26.COV2.S 1x10^{11} в.п. Включены все данные субъектов до 21 сентября 2020 г.				

Результаты оценки иммуногенности

Проанализированные наборы данных

Анализ результатов оценки иммуногенности основан на популяции иммуногенности согласно протоколу, состоящей из всех рандомизированных и вакцинированных участников, для которых были доступны данные об иммуногенности. Результаты иммуногенности после вакцинации 1 объединяли для групп 1 и 2 (5×10^{10} вч) и для групп 3 и 4 (1×10^{11} вч).

В полном наборе анализов 1 участник в группе вакцины 5×10^{10} вч, 2 участника в группе вакцины 1×10^{11} вч и 1 участник в группе плацебо являлись серопозитивными в отношении SARS-COV-2 на исходном уровне (табл. 2).

Гуморальные иммунные реакции

Нейтрализующие антитела у участников когорты 3 COV1001 измеряли при анализе нейтрализации вируса дикого типа. Рандомизированную подгруппу из 125 участников исследования (по 25 в группе) отбирали в соответствии с заранее определенной стратегией отбора подгруппы (проспективная случайная выборка, стратифицированная по назначению вакцины) независимым внешним статистиком открытым методом.

Нейтрализующий ответ антител против SARS-CoV-2

Анализ нейтрализации вируса дикого типа

Для этого анализа рандомизированную подгруппу из 125 участников исследования (по 25 на группу) отбирали в соответствии с заранее определенной стратегией отбора подгруппы (проспективная случайная выборка, стратифицированная по назначению вакцины) независимым внешним статистиком открытым методом.

Титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, измеренные методом wtVNA, выражены в единицах 50% ингибирующей концентрации (IC50). Графическое представление ответов VNA против SARS-CoV-2 (средние геометрические титры [GMT] с соответствующими 95% ДИ) во времени представлены на фиг. 106.

На исходном уровне у 47 участников в группе вакцины 5×10^{10} вч, у 45 участников в группе вакцины 1×10^{11} вч и у 24 участников в группе плацебо титры IC50 SARS-CoV-2 (нижний предел количественного определения [LLOQ] для анализа составлял IC50 58) являлись недетектируемыми. Детектируемые исходные уровни титров IC50 SARS-CoV-2, потенциально свидетельствующие о предыдущем контактировании с SARS-CoV-2, наблюдали у 2 участников в группе вакцины 5×10^{10} вч, у 5 участников в группе вакцины 1×10^{11} вч и ни у одного из участников группы плацебо (рис. 106).

В день 15,75% участников обеих групп с активной вакциной достигли титров IC50 более 100, что указывает на то, что у большинства участников был индуцирован быстрый и сильный ответ. Частота ответивших реципиентов в день 15 составила 87% для группы, в которой вводили вакцину 5×10^{10} вч, и 83% для

группы, в которой вводили вакцину 1×10^{11} вч в день 15, GMT составляли 197 (95% ДИ: 137, 284) и 180 (95% ДИ: 117, 276) для групп вакцины 5×10^{10} вч и 1×10^{11} вч, соответственно. Стандартное отклонение (СО) в день 15 оказалось одинаковым для двух вакцинированных групп.

Ответы нейтрализующих антител в день 29 оказались сопоставимыми с ответами в день 15. В день 29 в общей сложности 81% участников в группе, в которой вводили 5×10^{10} вч, и 88% участников в группе, в которой вводили 1×10^{11} вч, достигли титров IC50 более 100. Доля ответивших реципиентов в день 29 составила 90% в группе вакцины 5×10^{10} вч и 91% в группе вакцины 1×10^{11} вч. В день 29, GMT составляли 221 (95% ДИ: 160, 307) и 210 (95% ДИ: 155, 285) для групп вакцины 5×10^{10} вч и 1×10^{11} вч, соответственно. Стандартное отклонение (СО) оказалось одинаковым для двух вакцинированных групп.

Величина ответа нейтрализующих антител и доля ответивших реципиентов на лечение могут быть недооценены в ходе данного анализа, поскольку у некоторых участников титры после вакцинации достигли верхнего предела количественного определения (ULOQ) анализа. Эти образцы анализировали повторно на более позднем этапе с более высокими разведениями, чтобы можно было определить индивидуальные титры. Повышение титров wtVNA не наблюдали в группе плацебо в дни 15 или 29.

Статус ответившего реципиента отсутствовал у трех участников, у которых выявлены детектируемые уровни нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 на исходном уровне. Остальные четыре участника, которые проходили испытания по активным схемам вакцинации, показали увеличение GMT в дни 15 и 29. Однако не все из этих участников соответствовали заранее определенным критериям ответившего реципиента.

Тенденции к снижению ответа нейтрализующих антител с возрастом не наблюдалось. При сравнении данных по нейтрализующим антителам в когорте 3 и когорте 1a для обеих вакцинированных групп в день 29 величина ответов антител (GMT, когорта 3 по сравнению с когорта 1a: 221 по сравнению с 214 для группы вакцины $5x10^{10}$ вч и 210 по сравнению с 243 для группы вакцины $1x10^{11}$ вч) и частота ответа на лечение в когорте 3 находятся в том же диапазоне, что и в когорте 1a.

Уровни антител в день 29 у участников группы 5×10^{10} вч, которые использовали (185 GMT, 78% ответивших реципиентов) и не использовали (238

GMT, 95% ответивших реципиентов) жаропонижающие/анальгетики после вакцинации, оказались одинаковыми. В день 29 уровни антител у участников группы 1×10^{11} вч, использовавших (229 GMT, 90% ответивших реципиентов) и не использовавших (202 GMT, 91% ответивших реципиентов) жаропонижающие/анальгетики после вакцинации, также оказались одинаковыми, что указывает на то, что использование этих препаратов, по-видимому, не влияет на реакцию нейтрализующих антител, измеренную методом wtVNA.

Кривые обратного кумулятивного распределения для группы вакцины 5×10^{10} вч и группы вакцины 1×10^{11} вч были близкими как в день 15, так и в день 29 (фиг. 107).

Ответы связывания антител против S белка SARS-CoV-2 (ИФА)

Описательная статистика ответов антител, связывающих S белок SARS-CoV-2, индуцированных вектором Ad26.COV2.S, измеренных методом ИФА, фактические значения и кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем (с соответствующим 95% ДИ) графически представлены на рис. 108.

Определяемые исходные уровни титров S-ИФА SARS-CoV-2, потенциально свидетельствующие о предыдущем контактировании с SARS-CoV-2, наблюдали у 2 участников в группе вакцины 5×10^{10} вч, у 3 участников в группе вакцины 1×10^{11} вч и 3 участников в группе плацебо. У одного из этих участников, который состоял в группе вакцины 1×10^{11} вч, был выявлен серопозитивный статус SARS-COV-2 при скрининге.

Частота ответивших реципиентов в день 15 составила 75% и 77% для групп вакцины 5×10^{10} вч и 1×10^{11} вч, соответственно. Соответствующие GMT составили 122 (95% ДИ: 97, 152) и 141 (95% ДИ: 114, 175) для групп 5×10^{10} вч и 1×10^{11} вч, соответственно (рис. 108). В группе плацебо не наблюдалось увеличения антител, связывающих белок.

Ответы связывающих антител в день 29 оказались выше по сравнению с днем 15. Частота ответивших реципиентов в день 29 составила 96% для обеих групп активной вакцины. В день 29 GMT составляли 312 (95% ДИ: 246, 396) и 350 (95% ДИ: 284,; 431) для групп 5×10^{10} вч и 1×10^{11} вч, соответственно. Стандартное отклонение (СО) оказалось одинаковым для двух вакцинных групп. В группе плацебо в оба момента времени не наблюдали увеличения количества

антител, связывающих белок, после вакцинации, как в отношении GMT, так и в отношении частоты ответивших реципиентов.

Тенденции снижения ответов связывающих антител с увеличением возраста в когорте 3 не наблюдали. При сравнении данных по связыванию антител в когорте 3 и когорте 1a для обеих вакцинированных групп в день 29 величина ответов антител (GMT, когорта 3 по сравнению с когортой 1a: 312 по сравнению с 528 для группы вакцины $5x10^{10}$ вч и 350 по сравнению с 695 для группы вакцины $1x10^{11}$ вч) в когорте 3 оказалась ниже, но в том же диапазоне, что и в когорте 1a (фиг. 110). Доля ответивших реципиентов на связывание антител была сопоставима между когортой 1a и когортой 3, 99% и 96%, соответственно (фиг. 108 и фиг. 110).

Уровни связывающих антител в день 15 и день 29 у участников, принимавших жаропонижающие/анальгетики после вакцинации, были аналогичны уровням тех, кто этого не делал. GMT и доля ответивших реципиентов в группе 5×10^{10} вч в день 29, принимавшей жаропонижающие/анальгетики, составляли 357 и 94%, соответственно. GMT и доля ответивших реципиентов в группе 5×10^{10} вч в день 29, не принимавших указанных препаратов, составляли 302 и 97%, соответственно.

GMT и доля ответивших реципиентов в группе 1×10^{11} вч в день 29, принимавшей жаропонижающие/анальгетики, составляли 357 и 94%, соответственно. GMT и доля ответивших реципиентов в группе 5×10^{10} вч в день 29 день, не принимавших жаропонижающие/анальгетики, составляли 302 и 97%, соответственно.

Кривые обратного кумулятивного распределения для группы вакцины 5×10^{10} вч и группы вакцины 1×10^{11} вч оказались аналогичными (фиг. 111).

Анализ wtVNA по сравнению с ИФА

Дальнейшее изучение корреляций гуморального анализа показало, что титры wtVNA в значительной степени коррелировали с титрами ИФА как в день 15, так и и в день 29 с коэффициентами корреляции Спирмена 0,734 и 0,72, соответственно (фиг. 112). Корреляция устойчива в пределах низкого и высокого диапазона обоих анализов, что указывает на то, что ИФА можно использовать в качестве заменителя данных wtVNA в будущих анализах.

Клеточный иммунный ответ на S пептиды SARS-CoV-2

Ответы Th1 и Th2 оценивали с использованием ICS в день 1 (до вакцинации) и в день 15 после введения дозы 1. PBMC собирали у подгруппы участников.

CD4+/CD8+ T клеточный ответ (ICS)

Индукцию CD4+ и CD8+ T клеточных ответов определяли методом ICS после стимуляции PBMC S пептидами SARS CoV 2 (пептидные фракции S1 и S2). Измерение ответов T хелперов (Th)1 характеризовали долей в процентах CD4+ T клеток, продуцирующих IFNγ и/или IL-2, а не IL-4, IL-5 и/или IL-13. Ответ Th2 определяли как процент CD4+ T-клеток, экспрессирующих IL-4 и/или IL-5/IL-13 и CD40L. Эти данные использовали для определения соотношения Th1/Th2. Обнаружение ответов CD8+ T клеток характеризовалось долей в % CD8+ T клеток, продуцирующих IFNγ и/или IL-2. В приведенной ниже сводке ответов CD4+ и CD8+ T-клеток представлены и обсуждены комбинированные значения для пептидных фракций S1 и S2.

Ответы CD4+ T клеток

Процент CD4+ T клеток, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1), а не цитокины Th2, и экспрессирующих IL-4 и/или IL-5/IL-13 и CD40L (Th2), представлен на фиг. 113. Схема комбинированной схемы представлена на фиг. 114.

Ответы Th1

Исходные ответы Th1 оказались менее LLOQ (<0,022%) в день 1 как для групп, в которой вводили активную вакцину, так и для плацебо. Средние ответы Th1 увеличилась через 14 дней после вакцинации до 0,09% (Q1, Q3: 0,04, 0,17) для участников группы вакцинации $5x10^{10}$ вч и до 0,11% (Q1, Q3: 0,04, 0,15) для участников группы вакцинации $1x10^{11}$ вч (фиг. 45). Через 14 дней после первой вакцинации повышение ответа Th1 в группе плацебо отсутствовало. Эти ответы сопоставимы с более молодыми взрослыми из когорты 1a, у которых средние ответы Th1 составили 0,08% (Q1, Q3: 0,05, 0,16) в группе вакцинации $5x10^{10}$ вч и 0,11% (Q1, Q3: 0,07, 0,16) в группе вакцинации $1x10^{11}$ вч в день 15.

Стандартное отклонение в группе вакцины 5×10^{10} вч и группе вакцины 1×10^{11} вч составляло 0,41 и 0,36 соответственно.

В общей сложности 60% (95% ДИ: 46%, 74%) участников группы вакцины $5x10^{10}$ вч и 67% (95% ДИИ: 53%, 79%) участников группы вакцины $1x10^{11}$ вч

характеризовались CD4+ Т клеточным ответом через 14 дней после вакцинации. Это немного ниже по сравению с данными в когорте 1a, в которой у 76% (95% ДИ: 65%, 86%) участников группы вакцины $5x10^{10}$ вч и у 83% (95% ДИ: 73%, 91%) участников группы вакцины $1x10^{11}$ вч выявлены детектируемые CD4+ Т клеточные ответы.

Ответы Th2

Ответы Th2 не обнаруживались на исходном уровне и в день 15 как в группах активной вакцины, так и в группах плацебо (фиг. 113). Эти результаты сопоставимы с результатами для более молодых взрослых из группы 1a. Только у одного участника наблюдался ответ Th2. Этот участник, включенный в группу вакцины $1x10^{11}$ вч, характеризовался также ответом Th1, более высоким по сравнению с ответом Th2, с соотношением Th1/Th2 20,12, что указывает на смещение фенотипа Th1.

Расчет соотношения Th1/Th2

После вакцинации вектором Ad26.COV2.S рассчитывали соотношение Th1/Th2 для оценки смещения Т клеточного фенотипа у участников с положительным Т клеточным ответом. Соотношение Th1/Th2 составляло более 1 для всех участников групп вакцинации Ad26.COV2.S, что указывает на то, что в целом Ad26.COV2.S индуцирует Th1-смещенный ответ. Это сравнимо с результатами в когорте 1a, в которой также было выявлено 100% участников с соотношением Th1/Th2 выше 1 при вакцинации Ad26.COV2.S.

Ответ CD8+ Т клеток

Описательная статистика CD8+ Т клеток, продуцирующих IFNγ и/или IL-2 в ответ на стимуляцию S пептидом SARS-CoV-2, представлена на фиг. 115. Профиль комбинированного режима представлен на фиг. 116.

Исходные ответы CD8+ Т клеток до вакцинации составляли менее LLOQ (<0,022%) как в группах вакцинации, так и в группе плацебо. Через 14 дней после вакцинации средний уровень CD8+ Т клеточного ответа увеличился до 0,06% (Q1, Q3: 0,02, 0,12) для группы, в которой вводили $5x10^{10}$ вч, и до 0,02% (Q1, Q3: 0,01, 0,08) для группы, в которой вводили $1x10^{11}$ вч. В группе плацебо после вакцинации ответ CD8+ Т клеток не увеличивался. Такие CD8+ Т клеточные ответы в группе $5x10^{10}$ вч сопоставимы с теми, которые наблюдались у более молодых взрослых в когорте 1a (0,7%, Q1, Q3: 0,02, 0,12). Наблюдалась

тенденция к более низкому ответу CD8+ Т клеток в группе $1x10^{11}$ вч по сравнению с ответом у более молодых взрослых (0,09%, Q1, Q3: 0,05, 0,19).

Стандартное отклонение для двух вакцинных групп составляло 0,40 для группы 5×10^{10} вч и 0,41 для группы 1×10^{11} вч.

В общей сложности 36% (95% ДИ: 23%, 51%) участников в группе $5x10^{10}$ вч и 24% (95% ДИ: 13%, 37%) участников в группе $1x10^{11}$ вч характеризовались CD8+ Т клеточным ответом через 14 дней после вакцинации. Эта величина оказалась ниже по сравнению с величиной для молодых взрослых в когорте 1a, в которой наблюдался ответ CD8+ в дент 15 (группа 5×10^{10} вч = 51% и группа 1×10^{11} вч = 64%).

Выводы и обсуждение

Ранее сообщалось об иммунологическом анализе 15 контрольных участников из когорты 3. Полный промежуточный анализ когортыы 3 соответствует контрольному отчету и свидетельствует о том, что Ad26.COV2.S обладает высокой иммуногенностью у участников в возрасте 65 лет и старше после однократной вакцинации в дозах $5x10^{10}$ вч или $1x10^{11}$ вч.

Через 14 и 28 дней после вакцинации для обеих групп, вакцинированных Ad26.COV2.S, наблюдали увеличение нейтрализующих и связывающих S антител против SARS-CoV-2 по сравнению с исходным уровнем. Частота ответов реципиентов для группы вакцины 5×10^{10} вч составила 90% и 96% для анализов wtVNA и ИФА, соответственно. Уровень ответов реципиентов в группе вакцины $1x10^{11}$ вч составил 91% и 96% для анализов wtVNA и ИФА, соответственно.

Ad26.COV2.S также индуцировал клеточные иммунные ответы по оценке методом ICS. Повышенный ответ CD4+ и CD8+ Т клеток наблюдали через 14 дней после однократной вакцинации 5×10^{10} вч или 1×10^{11} вч. После вакцинации CD4+ Т клетки характеризовались смещенным фенотипом Th1, и Th2-ответы не наблюдались или наблюдалось очень ограниченное их количество. У всех участников с Т клеточным ответом соотношение Th1/Th2 составляло >1.

Общая величина и частота ответов реципиентов гуморальных ответов в когорте 3 сопоставимы с ответами, наблюдаемыми в когорте 1a, как описано ранее. Клеточные ответы CD4+ Т клеток оказались аналогичными ответам для более молодых взрослых в когорте 1a, а ответы CD8+ Т клеток в целом оказались ниже по сравнению с ответами у молодых взрослых в когорте 1a.

В целом у участников в возрасте 65 лет однократная вакцинация $5x10^{10}$ вч или $1x10^{11}$ вч Ad26.CoV.2 индуцировала стабильные ответы нейтрализующих и связывающих антител, Th1-смещенный фенотип и повышенный ответ CD4+ и CD8+ Т клеток.

Пример 25

Рандомизированное двойным методом плацебо-контролируемое исследование фазы 3 для оценки эффективности и безопасности Ad26.COV2.S для профилактики COVID-19, опосредованного SARS-CoV-2, у взрослых в возрасте 18 лет и старше

В исследовании принимали участие до 30000 участников для оценки эффективности Ad26.COV2.S при профилактике молекулярно подтвержденной средней и тяжелой/критической формы коронавирусной болезни-2019 (COVID-19) по сравнению с плацебо у взрослых участников.

Подробное описание

Целью программы клинических исследований вакцины против COVID-19 является разработка безопасной и эффективной вакцины для профилактики COVID-19. В настоящее время доступные вакцины для профилактики COVID-19 отсутствуют. Ad26.COV2.S, вакцина против COVID-19, основанная на некомпетентном к репликации векторе Ad26 человека, кодирующем S-белок SARS-CoV-2, находится в процессе разработки и предназначена для кодирования шиповидного белка (S) тяжелого острого респираторного синдрома коронавирус-2 (SARS-CoV-2). Исследование состояло из следующих этапов: фаза скрининга (до 28 дней), период двойного слепого метода исследования (60 недель) и период длительного наблюдения (1 дополнительный год). Общая продолжительность исследования для участников составляет максимум 2 года и 3 месяца. На протяжении всего исследования проводили такие оценки, как эффективность (признаки и симптомы COVID-19 и т. д.), иммуногенность (например, гуморальные иммунные реакции) и безопасность (например, мониторинг нежелательных явлений (AE)).

Участникам вводили внутримышечную (IM) инъекцию вакцины Ad26.COV2.S или плацебо в день 1 и день 57.

Пример 26

Иммуногенность однодозовой и двухдозовой схем вакцины-кандидата Ad26.COV2.S против COVID-19 у взрослых и пожилых макак резус

Как показано выше в примерах 20 и 21, в доклинических исследованиях эффективности однократная доза Ad26.COV2.S обеспечивала надежную защиту от заражения SARS-CoV-2 как в верхних, так и в нижних дыхательных путях у макак резус и защищала сирийских золотистых хомяков от тяжелых клинических проявлений болезни. Защитная эффективность в значительной степени коррелировала с наличием вирус-нейтрализующей активности в сыворотке NHP. Эти данные подтверждают ранее опубликованные данные о SARS-CoV, в которых было установлено, что нейтрализующие ответы антител против шиповидного белка SARS-CoV (S), который связывается с тем же клеточным рецептором, что и SARS-CoV-2 для проникновения в клетку, связаны с защитой от SARS-CoV в доклинических моделях.

Было установлено, что вакцина-кандидат Ad26.COV2.S по настоящему изобретению характеризуется пригодным профилем безопасности и реактогенности и вызывает быстрый и сильный иммунный ответ после однократной дозы как у взрослых, так и у пожилых людей по данным промежуточного анализа, который проводили в день 29 после иммунизации в исследовании фазы 1/2a. Иммунные ответы соответствовали предварительно заданным минимальным критериям для продолжения тестирования Ad26.COV2.S в исследованиях фазы 3.

В данном примере представлены данные об иммуногенности после однодозовой и двухдозовой схемы Ad26.COV2.S как у взрослых, так и у взрослых нечеловекообразных приматов (NHP) в течение периода наблюдения до 14 недель после первой вакцинации.

Методы

Животные

Взрослые NHP. Исследование NHP с участием взрослых животных проводили в условиях Charles River Laboratories (CRL), Montreal ULC, Laval Site (CA). Животных получали на фирме Kunmings Biomed international Ltd, Китай. Перед переводом из лаборатории испытательного центра оценивали состояние здоровья всех животных и по меньшей мере один раз проверяли на туберкулез с использованием внутрикожной инъекции туберкулина. Каждому животному

вводили антигельминтную обработку с использованием подкожной инъекции. Оценки проводились техническим персоналом в соответствии со стандартными операционными процедурами. Одобрение эксперимента на животных было предоставлено Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) CRL Montreal ULC, Laval Site (CA). Эксперименты на животных проводили в соответствии с Руководством, опубликованным Canadian Council on Animal Care, и Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованным National Research Council Canada. Испытательный центр аккредитован Canadian Council on Animal Care (CCAC) и American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Кроме того, исследование проводили в соответствии с руководством EMA, ICH M3(R2): Guidance on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals and FDA guideline, Redbook 2000: General Guidelines for Designing and Conducting Toxicity Studies.

Пожилые NHP — исследование с использованием пожилых NHP проводили в Biomedical Primate Research Center, Рейсвейк, Нидерланды (учреждение, аккредитованное AAALAC). Животных разводили и социализировали в неволе для исследовательских целей. Содержание животных соответствовало международным рекомендациям по уходу и использованию нечеловекообразных приматов (Директива Европейского Совета 86/609/EEC и Конвенция ETS 123, включая пересмотренное Приложение A, а также «Standard for humane care and use of Laboratory Animals by Foreign institutions' identification number A5539-01, предоставленный Department of Health and Human Services of the United States of America's National Institutes of Health (NIH)). Все операции с животными проводили в Department of Animal Science (ASD) в соответствии с законодательством Нидерландов. В ASD присутствует большой опытный персонал, в том числе штатные ветеринары и патологоанатом. ASD регулярно контролируется ответственным органом (Voedsel en Waren Autoriteit, VWA) и независимым инспектором по защите животных. Некоторые животные являлись серопозитивными в отношении антител к вирусу обезьяньего герпеса B, в то время как некоторые животные из контрольной группы плацебо являлись положительными в отношении антител к вирусу обезьяньего T-клеточного лейкоза и обезьяньему ретровирусу. Всех животных классифицировали как здоровых в соответствии с физическим осмотром и оценкой полного анализа

крови и химического состава сыворотки. Institutional Animal Care and Use Committee of the Biomedical Primate Research Centre (dierexperimentencommissie, DEC-BPRC) утвердил протоколы исследований, разработанные в соответствии со строгими международными этическими и научными стандартами и рекомендациями. Согласно голландскому закону об экспериментах на животных для этого комитета необходима квалификация его членов, в том числе их независимость от научно-исследовательского института.

Вакцины

Вакцину Ad26.COV2.S разрабатывали, как описано в данном контексте. Изготовление вектора Ad26 осуществляли в комплементарной клеточной линии PER.C6 TetR (Wunderlich и др., 2018, Zahn и др., 2012). Вектор отрицательного контроля Ad26.RSV.gLuc кодирует белок F RSV, гибридизованный с люциферазой светлячка Gaussia, в виде отдельного трансгена, разделенного пептидной последовательностью 2A, что приводит к экспрессии обоих отдельных белков. Получение вектора проводили в клетках PER.C6.

Схема экспериментов по исследованию животных

Взрослые NHP – 60 (57 самок и 3 самца, 3 самцов распределяли на исследуемые группы 3, 4 и 5, по 1 самцу в каждой группе) макак резус (Macaca Mulatta) китайского происхождения в возрасте от 3,3 до 5,0 лет распределяли на пять групп с использованием рандомизирующей системы стратификации, основанной на массе тела, четырнадцать животных включали в каждую вакцинированную группу, а четыре животных включали в плацебо-контрольную группу. Группа 1 (n=4) являлась плацебо-контрольной группой и в этой группе вводили инъекцию физиологического раствора на неделе 0 и 8, в группах 2 и 3 (n=14 в каждой группе) вводили одну иммунизацию 1×10^{11} вч и 5×10^{10} вч Ad26.COV2.S, соответственно, на неделе 0 в группах 4 и 5 (n=14 в каждой группе) вводили две иммунизации 5×10^{10} вч Ad26.COV.2 с интервалом в четыре (неделя 0 и неделя 4) и восемь недель (неделя 0 и неделя 8), соответственно. Все иммунизации проводили внутримышечно в четырехглавую мышцу левой задней ноги. Кровь для получения сыворотки брали перед введением первой дозы вакцины и затем каждые 2 недели вплоть до 14-й недели исследования.

Взрослых NHP - 20 самок макак резус (Macaca Mulatta) в возрасте от 13,75 до 21,9 лет распределяли по 4 экспериментальным лечебным группам и размещали в условиях ABSL-III попарно с социально совместимыми

животными. В группе 1 (n=6) вводили 1×10^{11} вч Ad26.COV2.S на неделе 0. В группе 2 (n=6) вводили $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S на неделе 0 и 8. В группе 3 (n=4) вводили 100 мкг S белка с адъювантом, 500 мкг гидроксида алюминия ($Al(OH)_3$, 2% Alhydrogel, InvivoGen) на неделе 0 и 8. Плацебо-контрольную группу (группа 4, n=4) иммунизировали 1×10^{11} вч Ad26.RSV.gLuc, вектором Ad26, экспрессирующим нерелевантный антиген. Все иммунизации проводили внутримышечно в четырехглавую мышцу левой задней ноги. Кровь для выделения сыворотки и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) получали, как описано в данном тексте.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Связывание IgG с S белком SARS-CoV-2 измеряли методом ИФА с использованием рекомбинантного антигена S белка на основе штамма Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2 (MN908947). Белковый антиген SARS-CoV-2 S адсорбировали на 96-луночных микропланшетах в течение как минимум 16 ч при 4°C. После инкубации планшеты промывали в PBS/0,05% Твин-20 и блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS/0,05% Твин-20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Стандарты сыворотки, контроли и образцы сыворотки NHP разводили и инкубировали на планшетах в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и затем инкубировали с конъюгатом пероксидазы хрена с козьими антителами против IgG человека в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали и проявляли субстратом тетраметилбензидин (TMB) в течение 30 мин при комнатной температуре и защищали от света, затем реакцию останавливали с помощью H_2SO_4. Оптическую плотность регистрировали при 450/620 нм. Концентрации антител рассчитывали по обратно пропорциональной стандартной кривой, и значение регистрировали на основе всех разведений, выраженных в единицах ИФА [EU]/мл. Нижний предел обнаружения (LLOD) составил 3,4 EU/мл, исходя из стандартной концентрации с наименьшим диапазоном интерполяции, умноженной на коэффициент разбавления, эту величину использовали в качестве информативного LLOD. Нижний предел количественного определения (LLOQ) основан на квалификации, проведенной для образцов человека, и установлен на уровне 50,3 EU/мл.

Анализ нейтрализации псевдовирусов (psVNA)

Титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 S измеряли методом анализа нейтрализации псевдовируса. Псевдотипированные вирусные частицы получали из основы модифицированного вируса везикулярного стоматита (VSVΔG), они содержали гликопротеин S SARS-CoV-2. Псевдочастицы содержали репортерную люциферазу, используемую для обнаружения. Серийные разведения образцов сыворотки, инактивированной нагреванием NHP, готовили в 96-луночных планшетах для переноса. Псевдовирус SARS-CoV-2 последовательно добавляли к разведениям сыворотки и инкубировали при 37°C с добавлением 5% CO_2 в течение 60 ± 5 мин. Затем комплексы сыворотка-вирус переносили на чашки, предварительно засеянные в течение ночи клетками Vero E6, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 20 ± 2 ч. После такой инкубации к клеткам добавляли субстрат люциферазы для оценки уровня люминесценции в лунке. Затем планшеты считывали на люминесцентном ридере. Интенсивность люминесценции количественно оценивали в относительных единицах люминесценции (RLU). Нейтрализующий титр образца сыворотки рассчитывали, как обратное разведение сыворотки, соответствующее 50% титру нейтрализующих антител (IC50) для этого образца. LLOD равно 10, что является первым разведением образца (1:10), используемым в качестве информативного LLOD. LLOQ основан на квалификации, проведенной для образцов человека, и установлен на уровне 33 IC50.

Анализ нейтрализации дикого типа (wtVNA)

Анализы нейтрализации жизнеспособного SARS-CoV-2 проводили методом анализа микронейтрализации, как описано ранее (Bos и др., 2020), с использованием модификации другого штамма. Клинический изолят SARS-CoV-2/human/NLD/Leiden-0008/2020 (Leiden-0008) выделяли из мазка из горла и дважды пересеивали в клетках Vero E6. Полный геном этого изолята вируса, полученный с использованием NGS, доступен под регистрационным номером GenBank MT705206.1. Изолят Leiden-0008 размножали и титровали в клетках Vero E6.

Анализ ELISpot

Двойное окрашивание IFN-γ/IL-4 проводили на свежевыделенных PBMC. PBMC выделяли из цельной крови в присутствии этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) с использованием центрифугирования в градиенте Ficoll (10 мл

92% Ficoll-Paque (GE Healthcare) Plus в крови, разбавленной 1:4 DPBS). Анализ ELISpot проводили с использованием набора ImmunoSpot Human IFN-γ/IL-4 для двухцветного ферментативного анализа ELISpot в соответствии с протоколом производителя (Cellular Technology Limited). На активированные этанолом 96-луночные планшеты ELISpot наносили в течение ночи антитела, связывающие человеческие IFN-γ и IL-4. Клетки высевали в концентрации 250000 клеток на лунку и стимулировали либо средой для культивирования клеток в присутствии ДМСО, либо 2 фракциями последовательных 15-членных пептидов с перекрытием из 11 аминокислот (JPT), включающих всю длину S SARS-CoV-2 белка при концентрации пептида 2 мкг/мл или 1 мкг/мл PHA в качестве положительного контроля в течение 22 ч. Анализ проводили с использованием анализатора CTL ImmunoSpot и программного обеспечения ImmunoSpot (Cellular Technology). Пятнообразующие единицы на $1{,}0\times10^6$ PBMC рассчитывали при вычитании количества средних импульсов отдельных пептидных фракций на животное и суммировали по 2 пептидным фракциям.

Окрашивание внутриклеточных цитокинов (ICS)

Для анализа продуцирования внутриклеточных цитокинов $1x10^6$, свежевыделенные PBMC стимулировали при 37°C в течение ночи (приблизительно 15 ч) либо в среде для культивирования клеток, либо во фракциях пептидов S-белка SARS-CoV-2 с концентрацией 2 мкг/мл (как описано для ELISpot), либо в среде или 1 мкг/мл PHA в присутствии GolgiStop (BD Biosciences). Стимулированные клетки сначала инкубировали с красителем для оценки жизнеспособности LIVE/DEAD Aqua (Invitrogen) с последующим окрашиванием поверхности моноклональными антителами против CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-APC H7, CD8-BV650, CD14-BV605, CD69-BV786 человека. (BD Biosciences) и CD20-BV605 (Biolegend). Затем клетки фиксировали буферным раствором Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) и окрашивали внутриклеточно антителами против IL-2-PE, IFN-g-APC человека (BD Biosciences), IL-5-Vio515 (Miltenyi Biotec), IL-4- PE Dazzle594 и IL-13-BV421 (Biolegend). Сбор образцов выполняли с использованием устройства LSR Fortessa (BD Biosciences), а данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo V10 (TreeStar). Антиген-специфические Т клетки идентифицировали при последовательном гейтировании на отдельные клетки (FSC-H по сравнению с FSC-A), жизнеспособные клетки, по размеру (лимфоциты) (FSC-A по сравнению

с SSC-A), клетки CD3+, CD4+ или CD8+ и клетки CD69+ плюс цитокин - положительные (стратегия гейтирования показана на дополнительный фиг. 2). Цитокин-положительные ответы представлены после вычитания фонового ответа, обнаруженного в соответствующем образце, стимулированным средой, от каждого отдельного животного. Ответивших реципиентов определяли по техническому порогу (Bowyer и др., 2018), теоретической способности обнаруживать по крайней мере 1 событие в цитокиновом гейте, и в данном контексте определяли как обратную величину среднего значения числа CD4 или CD8 Т клеток в среде и пептидной фракции стимулированных образцов для каждого анализа. Соотношение цитокинов Th1 и Th2 рассчитывали с использованием логического гейтирования (булев граф) подмножеств Th1 (CD4+CD69+ Т клетки, экспрессирующие IFN-γ или IL-2) и Th2 (CD4+CD69+ Т клетки, экспрессирующие IL-4, IL-5 или IL-13), Т клетки, экспрессирующие субпопуляции IL-4, IL-5 или IL-13).

Статистический анализ

ИФА и psVNA

Для получения данных о связывании и нейтрализующих psVNA антителах проводили сравнения между конкретными группами вакцин с использованием двухвыборочного t-критерия в дисперсионном анализе (ANOVA). Последовательные моменты времени сравнивали с парным t-критерием для каждой вакцинированной группы. Значения p рассчитывали по среднему из преобразованных значений log10.

wtVNA, ELISpot и ICS

Группы вакцин сравнивали с группой отрицательного контроля с использованием U-критерия Манна-Уитни. Попарное сравнение между вакцинными группами выполняли с использованием анализа Tobit ANOVA с использованием вакцины при условии, что менее 50% титров вакцины соответствовали LLOD. Попарные сравнения между вакцинами проводили с использованием z-оценки.

Если для анализа какая-либо группа вакцин являлась цензурированной на 50% или более, то попарные сравнения проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Разницу в титрах между последовательными временными точками рассчитывали на животное для каждого анализа.

В зависимости от количества цензурированных измерений различия сравнивали с использованием анализа Tobit ANOVA с последующей ретроспективной z-оценкой или критерием знака.

Для всех статистических критериев уровень значимости составлял 5%. Поправку на множественное сравнение не использовали. Все статистические расчеты выполняли с использованием прогрммного обеспечения SAS 9.4. (SAS Institute Inc., Кэри, Северная Каролина, США).

Корреляционный анализ

Корреляционный анализ между концентрациями связывающих антител и измеренными титрами нейтрализующих антител рассчитывали с использованием двустороннего критерия ранговой корреляции Спирмена.

Полученные результаты

Иммуногенность одно- и двухдозовых схем вакцинирования Ad26.COV2.S у взрослых макак резус

Когорту из 60 взрослых макак резус (возраст 3,3–5,0 лет, 57 самок и 3 самца) иммунизировали однократной дозой $1x10^{11}$ вч или $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S на неделе 0 (n=14 в группе) или двумя дозами $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S с интервалом 4 или 8 недель (n=14 в группе). В плацебо-контрольной группе (n = 4) вводили инъекцию физиологического раствора на неделе 0 и неделе 8. S специфические ответы антител регистрировали каждые две недели вплоть до 14 недель после первой иммунизации с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и анализа нейтрализации псевдовируса (psVNA) и обнаруживали у всех вакцинированных животных уже через две недели после иммунизации, они значительно увеличивались к 4 неделе после иммунизации ($p \leq 0,030$, t-критерий ANOVA) (рис. 1A и B). Животные, которым вводили 1×10^{11} вч Ad26.CoV2.S (группа 2), характеризовались наличием в 1,6 раза больше связывающих и в 2 раза больше нейтрализующих антител ($p=0,008$ и $p=0,004$ соответственно, t-критерий ANOVA) по сравнению с животными, иммунизированными 5×10^{10} вч Ad26.CoV2.S (объединенные группы 3, 4 и 5). Подобные различия в уровнях ответа сохранялись на протяжении всего периода наблюдения. Уровни S-связывающих антител снижались быстрее по сравнению с уровнями нейтрализующих антител, независимо от дозы вакцины, полученной животными.

Вторая доза вакцины, введенная через 4 или 8 недель после первой вакцинации, вызывала значительное увеличение ответов S-специфических антител ($p \leq 0{,}001$, t-критерий ANOVA) (фиг. 117A и 117B) по сравнению с моментом времени до введения дозы 2. По сравнению с однократной иммунизацией $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S, вторая иммунизация, проведенная через 4 и 8 недель после первой дозы, вызывала 5,7- и 11,8-кратное увеличение ($p<0{,}001$, t-критерий ANOVA) концентраций связывающих антител и 7,6- и 15,2-кратное увеличение ($p<0{,}001$, t-критерий ANOVA) титров нейтрализующих антител, соответственно, при измерении через 2 недели после введения дозы 2. Подобные различия наблюдали при сравнении ответов антител, вызванных двухдозовыми схемами вакцинации, с ответами, вызванными однократной дозой вакцины $1x10^{11}$ вч.

В то время как двухдозовые схемы вакцинации с 4- и 8-недельным интервалом вызывали сопоставимые концентрации S-специфических связывающих антител через две недели после второй иммунизации, среднее геометрическое значение титров нейтрализующих антител составляло значение в 2,2 раза выше ($p = 0{,}005$, t-критерий ANOVA) для 8-недельного режима по сравнению с 4-недельным режимом. На 4-й и 6-й неделе после второй иммунизации уровни связывающих и нейтрализующих антител снижались в обеих группах с двумя дозами с аналогичной кинетикой, при этом сохранялась относительная разница в величине нейтрализующих антител (в 2,1 и 2,4 раза выше на 4-й и 6-й неделе, соответственно, для 8-недельного режима $p=0{,}021$ и $p=0{,}001$ соответственно, t-критерий ANOVA).

Несмотря на более быстрое снижение титров связывающих антител по сравнению с титрами нейтрализующих антител, у животных, которым вводили вакцинацию по однодозовой схеме, авторы изобретения наблюдали хорошую общую корреляцию между уровнями связывающих и нейтрализующих антител в моменты времени для всех протестированных режимов ($R = 0{,}7875$, $p <0{,}001$, критерий ранговой корреляции Спирмена) (фиг. 117C).

Иммуногенность одно- и двухдозовых схем вакцины Ad26.COV2.S у возрастных макак резус

Поскольку тяжесть и смертность от COVID-19 у пожилых людей увеличиваются, авторы изобретения также проанализировали иммуногенность Ad26.COV2.S у пожилых макак резус (20 самок, 13,75–21,9 лет). Растворимый

тримерный шиповидный белок с адъювантом гидроксида алюминия ($Al(OH)_3$), стабилизированный в его конформации до слияния, использовали в качестве контроля смещения вакцины Т-хелперов 2 (Th2). Группы иммунизировали по схеме с одной дозой, введенной на неделе 0, $1x10^{11}$ вч Ad26.COV2.S (n=6), по схеме с двумя дозами с $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S (n=6) или с двумя дозами - схема дозирования с адъювантом $Al(OH)_3$, 100 мкг S белка (n=4) для стимуляции ответов типа Th2 с интервалом в 8 недель. В плацебо-контрольной группе вводили вектор Ad26, кодирующий нерелевантный антиген (Ad26.RSV.gLuc, плацебо контоль, n=4) на 0-й и 8-й неделе. Уровни связывания и нейтрализации антител S белка SARS-CoV-2 измеряли каждые 2 недели - 10 недель после первой иммунизации, а специфические клеточные ответы, связанные с S белком, измеряли через 4 и 10 недель.

Концентрации антител, специфично связывающихся с S белком, значительно увеличивались для каждой схемы вакцинации, начиная со 2-й недели ($p \leq 0,034$, ANOVA с ретроспективным парным t-критерием, в ходе которого осуществляли сравнение данных на неделе 0 и неделе 2). На 6 и 8 неделе концентрации антител, индуцированных Ad26.COV2.S, оказались значительно повышеными по сравнению с концентрациями, индуцированными S белком с адъювантом $Al(OH)_3$ ($p \leq 0,036$, ANOVA с ретроспективным t-критерием). Статистически значимых различий в ответах антител, вызванных двумя уровнями дозы Ad26.COV2.S, не было обнаружено вплоть до 8-й недели. На 10-й неделе, через 2 недели после второй дозы, группа, в которой вводили вторую дозу $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2 .S, характеризовалась наличием значительно более высоких концентраций антител по сравнению с реципиентами однократной дозы $1x10^{11}$ вч Ad26.COV2.S (в 4,4 раза для группы $5x10^{10}$ вч, $p = 0,0002$), в то время как концентрации антител S оказались аналогичными для реципиентов S белка с адъювантом $Al(OH)_3$ ($p=0,482$) (фиг. 118A).

Кинетику титров нейтрализующих антител определяли методом анализа нейтрализации вируса дикого типа. Однократная доза $1x10^{11}$ вч Ad26.COV2.S индуцировала титры нейтрализующих антител на 2-й неделе, которые были значительно увеличены на 4-й неделе у всех животных по сравнению с предыдущим моментом времени ($p = 0,031$, критерий знака) и оставались стабильными после этого до 10-й недели. Аналогичным образом двухдозовая схема $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S индуцировали титры нейтрализующих антител у

всех животных, которые значительно увеличивались на 4-й неделе (p=0,031, знаковый тест) и 6-й неделе (p=0,008, битовый ретроспективный анализ, z-критерий) по сравнению с предыдущими моментами времени. На 10-й неделе, через 2 недели после введения второй дозы, титры антител увеличились в 3 раза по сравнению с 8-й неделей (p<0,001, битовый ANOVA с ретроспективным z-критерием). S Белок с адъювантом $Al(OH)_3$ индуцировал только низкие и кратковременные уровни нейтрализующих антител после первой дозы и только у 2 из 4 животных. Однако на 10-й неделе, через 2 недели после введения второй дозы, у всех 4 животных обнаруживались нейтрализующие антитела в том же диапазоне, что и в группах Ad26.COV2.S (статистический анализ невозможен из-за небольшого размера группы с адъювантным белком). Попарное сравнение групп вакцин на 10-й неделе показало, что двухдозовая схема $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S вызывала значительно более высокие титры нейтрализующих антител по сравнению с группой, в которой вводили однократную дозу $1x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S (в 10 раз, p<0,00, бит ANOVA и ретроспективный z-критерий), в то время как титры в группе NHP, которым вводили группу S белка, оказались близкими (p=0,303) (фиг. 118B). Уровни S-специфического связывания IgG, измеренные методом ИФА, в значительной степени коррелировали с титрами нейтрализующих антител дикого типа (R=0,92, p=<0,001, ранговая корреляция Спирмена), при этом с более высокой чувствительностью ИФА (фиг. 118C).

Специфичные для S белка ответы T клеток измеряли методом ELISpot и методом окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS) с использованием 15-мерных пептидов, перекрывающихся на 11 аминокислот, включающих полную последовательность S белка. Обе схемы введения Ad26.COV2.S, а также шиповидного белка с адъювантом $Al(OH)_3$ индуцировали ответы IFN-γ через 4 недели после первой иммунизации (фиг. 119A и 119B). Через две недели после второй дозы в группе, в которой вводили $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S и адъювантного шиповидного белка (неделя 10), ответы IFN-γ были сопоставимы с ответами в группе, в которой вводили $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S на 4-й неделе, но ниже по сравнению с ответами в группе, в которой вводили $1x10^{11}$ вч Ad26.COV2.S и адъювант S белка, что позволяет предположить лучшую стабильность T клеточных ответов, которую обеспечивает вторая доза Ad26.COV2.S. Значительные ответы IL-4 наблюдались только для группы, в которой вводили шиповидный белок с адъювантом $Al(OH)_3$, как на неделе 4 так

и на неделе 10, по данным метода ELISpot (фиг. 119A). Цитокиновые ответы CD4+ и CD8+ Т клеток также анализировали методом ICS. Специфичные для S белка CD4+ Т клеточные экспрессии IFN-γ и IL-4 подтвердили ответы ELISpot, при этом все группы вакцин индуцировали значительно более высокие уровни IFN-γ по сравнению с контрольной группой на неделе 4 ($p \leq 0,029$, критерий Манна-Уитни-Ю), которые снизились на неделе 10, за исключением группы, в которой вводили две дозы 5×1010 вч Ad26.COV2.S, уровни в которой значительно превышали уровни в группе плацебо ($p=0,010$). Экспрессия IL-4 оказалась значительно выше только в группе, в которой вводили шиповидный белок с адъювантом $Al(OH)_3$, по сравнению с контрольной группой в оба момента времени ($p=0,029$) (фиг. 119B). Измеряли дополнительные цитокины IL-2 или IL-5 и IL-13 и полученные данные отражали закономерности, полученные для IFN-γ или IL-4, соответственно, с минимальным усилением ответов или без него для групп, в которых вводили вторую дозу и только шиповидный белок с адъювантом $Al(OH)_3$, которые индуцировали устойчивые уровни цитокинов Th2 IL-4, IL-5 и IL-13 (фиг. 119C). Полученные данные подтверждали при расчете соотношения Th1 и Th2, которое оказалось смещенным в сторону Th1, что наблюдалось после иммунизации Ad26.COV2.S независимо от ее схемы (фиг. 119C). Специфичные для шиповидного белка CD8+ Т клетки, индуцированные Ad26.COV2.S, в основном продуцировали IFN-γ и IL-2, в то время как шиповидный белок с адъювантом $Al(OH)_3$ продуцировал только IL-2. Ни одна из схем иммунизации не индуцировала CD8+ Т клетки, продуцирующие значительные количества IL-4, IL-5 и IL-13 (фиг. 120).

В данном примере для получения представления о стабильности иммунитета после однократной дозы вакцины-кандидата и о влиянии второй дозы на величину иммунных ответов, специфичных к S белку, оценивали иммуногенность одно- и двухдозовых схем Ad26.COV2.S у взрослых и возрастных макак-резусов в течение до 14 недель после первой дозы.

Как у взрослых, так и у пожилых макак ответы, связывающие S, и нейтрализующих SARS-CoV-2 антител обнаруживали уже через две недели после первой иммунизации, которые значительно увеличились к 4-й неделе. Кинетика и величина ответа антител у взрослых и пожилых макак резус оказались аналогичными для всех исследованных схем вакцинирования

Ad26.COV2.S. Эти наблюдения согласуются с наблюдениями у взрослых и возрастных людей на 4-й неделе после однократной иммунизации Ad26.COV2.S.

При введении S белка с адъювантом $Al(OH)_3$ необходимо использовать 2 дозы, чтобы вызвать значительные уровни нейтрализующих антител, что также наблюдалось при введении других вакцин против COVID-19 на основе белков или иРНК-платформ в клинических испытаниях фазы 3, которые не были достаточно иммуногенными после однократного введения животным NHP и людям (Corbett и др., The New England Journal of Medicine, т. 383, № 16, сс. 1544–1555 (2020), Guebre-Xabier идр., BioRxiv, сс. 1–16 (2020)). В исследованиях NHP как у взрослых, так и у пожилых животных обнаружили значительную корреляцию между реакциями связывающих и нейтрализующих антител, хотя в двух исследованиях использовали разные анализы нейтрализации. Это свидетельствует о том, что метод ИФА с антителами, связывающими S белок, можно использовать в качестве маркера для считывания нейтрализующих ответов антител, что также подтверждается более ранними наблюдениями авторов изобретения (Mercado и др., Nature. https://doi.org/10.1038/s41586-020- 2607, 2020).

У взрослых макак однократная доза Ad26.COV2.S вызывала гуморальные иммунные ответы, которые сохранялись по меньшей мере до 14-й недели после иммунизации. Ответы связывающих антител со временем несколько снижались, в то время как ответы нейтрализующих антител сохранялись более стабильно, что является ранним признаком стойкости иммунитета, вызванного вакциной-кандидатом авторов настоящего изобретения. Гуморальный иммунный ответ оказался немного выше у NHP, которым вводили дозу $1x10^{11}$ вч, по сравнению с реципиентами дозы вакцины $5x10^{10}$ vp, но различия оказались слишком недостаточными, чтобы гарантировать использование более высокой дозы в дальнейших клинических исследованиях.

Вторая доза Ad26.COV2.S, введенная через 8 недель после первой иммунизации, привела к значительному увеличению ответа специфического связывания шиповидных белков и, что более важно, ответов нейтрализующих антител как у взрослых, так и у пожилых NHP по сравнению со схемой введения одной дозы. Это согласуется с наблюдениями, полученными при исследовании других вакцин на основе Ad26, где вторая доза всегда вызывала более сильный и стойкий иммунный ответ как на моделях животных, так и у людей. Результаты

двухдозовой схемы Ad26.COV2.S у животных NHP позволяют предположить, что двухдозовай схема вакцины Ad26.COV2.S может также привести к более сильным и устойчивым иммунным ответам у людей по сравнению с однодозовой схемой, предложенной авторами настоящего изобретения.

При оценке потенциального влияния продолжительности интервала между двумя дозами вакцины у взрослых NHP было установлено, что, хотя уровни вызванных концентраций связывающих антител являлись одинаковыми после двух доз с 4- или 8-недельным интервалом, ответы нейтрализующих антител оказались выше у животных. Которым вводили две дозы с 8-недельным интервалом. Таким образом, схема вакцинации с 8-недельными интервалами между двумя дозами являлась предпочтительнее схемы с 4-недельным интервалом.

Важным аспектом, который необходимо оценивать при разработке вакцины против COVID-19, является потенциальный и теоретический риск вакциноассоциированного усиленного респираторного заболевания (VAERD), которое обычно считается связанным с не-нейтрализующими ответами антител и Th2-смещенными клеточными иммунными ответами. В данном исследовании было установлено, что Ad26.COV2.S вызывал ответы CD4+ Т клеток у пожилых NHP, смещенные по Th1, как ранее было показано как у взрослых NHP, так и у взрослых и пожилых людей, и аналогично тому, что было обнаружено для другой генетической платформы вакцины у NHP и у людей, с использованием антигена S белка (van Doremalen и др., Nature, May. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2608-y, 2020) (Yu и др., Science (New York, NY), 369(6505), 806–811. https://doi.org/10.1126/science.abc6284, 2020) (Vogel et al., BioRxiv, 2020.09.08.280818. https://doi.org/ 10.1101/2020.09.08.280818, 2020) (Corbett и др., там же, 2020). Напротив, S белок с адъювантом $Al(OH)_3$ индуцировал более значительное смещение Th2 иммунного ответа, как и ожидалось при использовании этого адъюванта, что подтверждает тот факт, что смещенный Th2 ответ может быть вызван в этой модели животных NHP. Смещенный Th1 ответ у NHP вместе с индукцией надежного и устойчивого ответа нейтрализующих антител Ad26.COV2.S снижает вероятность VAERD для этой вакцины.

Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что схемы вакцинации Ad26.COV2.S с одной и двумя дозами вызывают аналогичные ответы антител у

взрослых и пожилых NHP. Важно отметить, что вторая доза вакцины, введенная через 8 недель после первой иммунизации, вызывала значительное усиление (нейтрализующего) ответа антител как у взрослых, так и у возрастных животных по сравнению с однократной дозой вакцины. Кроме того, последующее исследование иммуногенности у взрослых макак свидетельствует о том, что ответы антител сохраняются до 14 недель после первой иммунизации, что обеспечивает раннее указание на стойкие иммунные ответы, вызванные однократной дозой Ad26.COV2.S.

Пример 27

Промежуточные результаты фазы 1/2a испытания вакцины Ad26.COV2.S Covid-19

Как описано выше, проводили многоцентровое рандомизированное двойным слепым плацебо-контролируемым методом исследование фазы 1/2a с участием здоровых взрослых (в возрасте от 18 до 55 лет, когорта 1, n=405 или >65 лет, когорта 3, n= 405), которым вводили Ad26.COV2.S в дозе $5x10^{10}$ или $1x10^{11}$ вирусных частиц по схеме однократного или двукратного введения (интервал 56 дней).

В данном примере представлены результаты после первой (когорты 1 и 3) и второй (когорта 1) вакцинации.

Методы

Схема исследования и участники

Исследование представляет собой многоцентровое, рандомизированное, двойным слепым методом с плацебо-контролем испытание фазы 1/2a для оценки безопасности, реактогеноости и иммуногенности Ad26.COV2.S в дозе $5x10^{10}$ (более низкая доза, LD) или $1x10^{11}$ вирусных частиц (вч) (более высокая доза, HD) в объеме 1 мл, которую вводили внутримышечно (IM, дельтовидная мышца) по схеме однократной или двукратной дозы с интервалом 56 дней здоровым взрослым в возрасте от 18 до 55 лет (когорта 1a: целевое число n = 375, группа 1b (экспериментальная группа для углубленной иммуногенности): целевое число n = 25 и возраст старше 65 лет (когорта 3: целевое число n = 375).

Ad26.COV2.S представляет собой рекомбинантный, неспособный к репликации вектор Ad26, кодирующий полноразмерный и стабилизированный S белок SARS-CoV-2, полученный из первого клинического изолята штамма Wuhan (Wuhan, 2019, последовательность полного генома NC_045512), как

описано в данной патентной заявке. Исследование проводили в Бельгии и США и оно рассмотрено и одобрено местными комитетами по этике и институциональными экспертными советами (IRB). Все участники предоставили письменное информированное согласие перед включением в испытания.

Методики

405 пригодных участников в обеих когортах 1 и 3 рандомизировали (1:1:1:1:1) в одну из следующих групп лечения: LD/LD, ЛД/плацебо, HD/HD, HD /плацебо, плацебо/плацебо для первой и второй дозы. Рандомизацию проводили с использованием интерактивной системы веб-ответов (IWRS) и стратифицировали с использованием рандомизации с перестановкой блоков. Участников и исследователей регистрировали слепым методом на уровне отдельных участников на протяжении всего исследования. Чтобы соответствовать критериям “слепого” исследования, спонсор и статистики оставались в открытой группе для первичного анализа когорт 1 и 3 только после достижения всеми участниками 8-го дня после введения дозы 2.

Первичная цель представляла собой безопасность и реактогенность каждой схемы дозирования. Нежелательные явления (AE) регистрировали в дневниковых карточках в течение 7 дней после вакцинации, AE в течение 28 дней после вакцинации и SAE на протяжении всего исследования. AE оценивали в соответствии с руководством FDA «Шкала оценки токсичности для здоровых взрослых и подростков-добровольцев, участвующих в клинических испытаниях профилактических вакцин». Данные о безопасности включены до даты завершения учета данных 30 октября 2020 г. для когорт 1 и 3.

Вторичная цель представляла собой гуморальный и клеточный иммунитет к S белку SARS-CoV-2. В исходный момент и в дни 15, 29, 57 и 71 S-специфические связывающие антитела к SARS-CoV-2 измеряли методом ИФА. Серопозитивность определяли как титр выше нижнего предела количественного определения анализа (нижний предел количественного определения [LLOQ] = 50,3 EU/мл). Титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 в сыворотке измеряли в рандомизированной подгруппе образцов при микронейтрализации wtVNA с использованием штамма SARS-CoV-2 Victoria/1/2020 в Службе общественного здравоохранения Англии, при этом серопозитивность определяли как титр IC50 >58 (LLOQ). В эти же моменты времени также оценивали титры IC80 wtVNA. S специфические T клеточные ответы измеряли в исходный день и

день 15 с использованием ICS и двух S фракций из 15-членных пептидов, перекрывающихся по 11 аминокислотам. Ответ Th1 характеризовался Т клетками CD4+, экспрессирующими IFN-γ и/или IL-2, но не IL-4, IL-5 и/или IL13, и ответ Th2 - экспрессией IL-4, IL-5 и/или IL -13 и CD40L. Все анализы проводили слепым методом и подробно описаны в дополнительных материалах.

Статистические методы

Данные по безопасности были описаны и проанализированы в полном наборе для анализа, а данные об иммуногенности были проанализированы в популяции иммуногенности согласно протоколу. Дополнительные сведения см. в дополнительных материалах и плане статистического анализа.

Результаты

Участники исследования

Первую вакцинацию участников когорты 1 (в возрасте от 18 до 55 лет) начинали 22 июля 2020 г. К 7 августа 2020 г. 593 участника были обследованы, 405 включены в испытания и 402 иммунизированы первой дозой, а к 7 ноября 2020 г. - второй дозой в когорте 1 (объединенные когорты 1a и 1b). Иммунизацию участников когорты 3 (возраст >65 лет) начинали 3 августа 2020 г., и к 24 августа 2020 г. 660 человек были обследованы, 405 были включены в испытания и 403 иммунизированы первой дозой. Исходные показатели серопозитивности к специфическием антителам к SARS-CoV-2 S в когорте 1a и когорте 3 составляли 1,9% и 1,0%, соответственно. Исходные характеристики были в основном близки между группами.

Безопасность вакцин и реактогенность Ad26.COV2.S

Собирали и анализировали открытые групповые данные по безопасности для обеих когорт. Сообщенные AE регистрировали в дневниках пациентов в течение 7 дней после вакцинации, нежелательные AE - в течение 28 дней после вакцинации и SAE на протяжении всего исследования.

Оценка исследователя после введения дозы 1 доступна для 402 участников в когорте 1 и для 403 участников в когорте 3. В обеих когортах сообщаемые местные AE в основном характеризовались 1 или 2 степенью, наиболее частое AE представляло собой боль в месте инъекции. В когорте 1 сообщаемые местные AE были обнаружены у 103 реципиентов LD (64%), 123 реципиентов HD (78%) и 7 (9%), которым вводили плацебо. В когорте 3 сообщаемые местные AE были

зарегистрированы у 66 реципиентов LD (41%), 68 реципиентов HD (42%) и 11 реципиентов плацебо (14%).

В обеих когортах наиболее часто сообщаемые системные AE характеризовались 1 или 2 степенью, наиболее частые из них представляли собой утомляемость, головную боль и миалгию. В когорте 1 сообщаемые системные AE были зарегистрированы у 105 реципиентов LD (65%), 133 реципиентов HD (84%) и 21 реципиента плацебо (26%). В когорте 3 сообщаемые системные AE были зарегистрированы у 74 реципиентов LD (46%), 88 реципиентов HD (55%) и 19 реципиентов плацебо (23%). В когорте 1 системные AE 3-й степени были зарегистрированы у 15 реципиентов LD (9%) и у 32 реципиентов HD (20%), и ни у одного в группе плацебо. Сравнение участников с одним или более сообщаемыми AE 3ей степени в когорте 1a выявило 24%, 26% и 0% в группах LD, HD и плацебо, соответственно, в возрастной группе 18-30 лет, 3%, 14% и 0% в этих группах для возрастной группы 31-45 лет и 3%, 11% и 0% в этих группах для возрастной группы 46-55 лет. В когорте 3 сообщалось о системных AE 3-й степени у 1 участника (0,6%), которому вводили LD, у 4 (2,5%), которым вводили HD и ни у одного участника, которым вводили плацебо. В когорте 1 лихорадка была зарегистрирована у 25 реципиентов LD (15%) и 62 реципиентов HD (39%), и ни у одного в группе плацебо, при этом лихорадка 3 степени зарегистрирована у 8 реципиентов LD (5%) и 15 реципиентов HD (9%). В когорте 3 сообщалось о лихорадке у 7 реципиентов LD (4%) и у 14 реципиентов HD (9%) без лихорадки 3ей степени у участников, которым вводили LD или плацебо, и у двух реципиентов HD (1%). Все состояния лихорадки развивались в течение двух дней после иммунизации и пациенты выздоравливали в течение одного-двух дней, при этом более 80% использовали жаропонижающие при появлении симптомов.

В когорте 1 несообщаемые AE были зарегистрированы у 34 (21%), 56 (35%) и 14 (17%) человек в группах LD, HD и плацебо, соответственно. В когорте 3 несообщаемые AE были зарегистрированы у 27 (17%), 38 (24%) и 13 (16%) участников в группах LD, HD и плацебо соответственно. Ни в одной из когорт не было зарегистрировано AE 4-й степени, сообщаемых или несообщаемых.

В когорте 1a доступны данные о безопасности после введения второй дозы для 363 участников. Было зарегистрировано одно или более AE у 77,0% и

79,7% участников в группах LD и HD, соответственно, по сравнению с 33,8 и 31,3% участников, которым вводили плацебо в качестве второй дозы после первой дозы вакцины, и 21,6% участников, которым вводили плацебо (которым немедленно вводили плацебо). В отличие от участников после введения дозы 1, AE с наихудшей степенью 3 или выше были зарегистрированы у 1,4% и 6,8% участников в группах LD и HD, соответственно, у 1,4% и 1,5% в контрольных группах, которым ранее вводили первую дозу вакцины, и 0% в контрольных группах, которые никогда не вводили вакцину. Ни в одной группе после введения второй дозы вакцины не наблюдалась лихорадка 3 степени.

Ни один участник не прекратил исследование из-за AE. Было зарегистрировано пять SAE: один случай гипотензии, по мнению исследователя не связанный с вакциной из-за анамнеза рецидивирующей гипотензии, один случай двусторонней почечно-каменной болезни у участника с анамнезом камней в почках (не связанный с вакциной), один несвязанный с вакциной случай легионеллезной пневмонии, один случай обострения рассеянного склероза, которым участник страдал примерно 8-10 лет по данным МРТ, однако заболевание было диагностировано только после включения участника в исследование (не связанное), и один случай лихорадки, участник с которой был госпитализирован на ночь из-за подозрения на Covid-19, который выздоровел в течение 12 ч, лихорадка впоследствии по мнению исследователя была связанна с вакциной. Подробности см. в дополнительных материалах.

Иммуногенность Ad26.COV2.S

Данные об иммуногенности для данного промежуточного анализа были в открытом доступе по уровню дозы. Во всех 5 группах когорты 1a концентрации связывающих антител (EU/мл GMC) измеряли по отношению к стабилизированному полноразмерному шиповидному белку SARS-CoV-2. Изначально GMC составляли <LLOQ и увеличивались к дню 29 после вакцинации до 478 (95% доверительный интервал (ДИ): 379, 603), 586 (445, 771), 625 (505, 773) и 788 (628, 988) для групп LD/плацебо, LD/LD, HD/плацебо и HD/HD, соответственно, с сероконверсией >99% во всех группах (фиг. 121A). Затем к дню 57 GMC увеличился до 660 (513, 849), 754 (592, 961), 873 (701, 1087) и 1100 (908, 1332), соответственно. Сероконверсия после введения дозы 1 составила 100% во всех группах, кроме группы HD /плацебо (97%). Через 14 дней после введения второй дозы группы LD/LD и HD/HD достигли GMC 1677

(1334, 2109) и 2292 (1846, 2845), соответственно, со 100% сероконверсией в каждой группе. В группах LD/плацебо и HD/плацебо GMC в день 71 (600 (443, 814) и 951 (696, 1300), соответственно) оказались аналогичными GMC в день 57. В группе 3 GMT изначально составляли <LLOQ. К 15 дню после вакцинации либо с LD, либо с HD GMT увеличились соответственно до 122 (97, 152) и 141 (114, 175) с уровнем сероконверсии 77% в обеих группах доз (фиг. 121B). К 29 дню GMT составляли 312 (246, 396) и 350 (281, 429) с уровнем сероконверсии 96% и 96%.

Титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 (IC50) измеряли методом wtVNA в рандомизированной подгруппе участников из когорт 1a и 3. Изначально средние геометрические титры (GMT) составляли <LLOQ и увеличились к дню 29 после вакцинации до 224 (158, 318), 224 (168, 298), 215 (16, 273) и 354 (220,571) для групп LD/плацебо, LD/LD, HD/плацебо и HD/HD в когорте 1a, соответственно, с показателями сероконверсии 96%, 88%, 96% и 92% (фиг. 121C). GMT увеличился к дню 57 до 310 (228, 422), 288 (221, 376), 370 (268, 511) и 488 (334, 714) для групп LD/плацебо, LD/LD, HD/плацебо и HD/HD со 100% сероконверсией в группе LD/плацебо и 96% сероконверсией в других группах, соответственно. Через 14 дней после второй дозы в когорте 1a GMT достигали 775 (508, 1183) и 1272 (746, 2169) для групп LD/LD и HD/HD, соответственно, со 100% сероконверсией в обеих дозовых группах (фиг. 121B, левые панели). В группах LD/плацебо и HD/плацебо GMT в день 71, как и день 57, составило 315 (227, 438) и 388 (290, 509), соответственно. Обе группы включали 100% ответивших реципиентов. В когорте 3 GMT изначально составили <LLOQ и увеличились до 212 (137, 284) и 171 (119, 269) в день 15 и 277 (193, 307) и 212 (163, 266) в день 29 для группы LD и HD, соответственно (фиг. 121D). Уровень сероконверсии составил 92% в день 15 для каждой группы уровня дозы и 98% (83, 99) и 94% (76, 99) в день 29 для групп LD и HD в когорте 3. Полученные данные были подтверждены с использованием IC80 wtVNA (фиг. 122). Уровни антител wtVNA и ИФА в значительной степени коррелировали в обеих когортах (фиг. 122A), хотя эта корреляция характеризуется более широкой эллиптической формой в когорте 3, что свидетельствует о большей вариабельности взаимосвязи между титрами нейтрализующих и связывающих антител у пожилых людей.

Уровни антител в различных панелях сыворотки человека, взятой в период выздоровления (HCS), которые были включены в анализы для оценки гуморального иммунитета, проводимые разными лабораториями, и в сыворотках реципиентов вакцины находились в одном диапазоне.

Нейтрализующие антитела Ad26 на исходном уровне или после введения дозы 1 не оказывали никакого влияния на способность первой и второй иммунизации индуцировать нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 в дни 29 и 71 (после введения дозы 2), соответственно (фиг. 123).

Ad26.COV2.S вызывал S-специфические ответы CD4+ Th1 и Th2, а ответы CD8+ Т клеток были охарактеризованы у подгруппы участников в начале исследования и через 15 дней после введения дозы 1. В когорте 1a - 76% (95% ДИ: 65, 86) и 83% (73, 91), а в когорте 3, 60% (46, 74) и 67% (53, 79) реципиентов LD и HD, соответственно, характеризовались обнаруживаемыми ответами Th1 на S пептиды. Средние значения ответов CD4+ Th1 на S пептиды увеличилась в когорте 1a с недетектируемого исходного уровня до среднего значения 0,08% (Q1, Q3: 0,05, 0,16) и 0,11% (Q1, Q3: 0,07, 0,16) через 15 дней после вакцинации и в когорте 3 от недетектируемого на исходном уровне до среднего значения 0,09% (Q1, Q3: 0,04, 0,17) и 0,11% (Q1, Q3: 0,04, 0,15) для реципиентов LD и HD, соответственно (фиг. 124A). Один участник в когорте 1a (реципиент LD) и один участник в когорте 3 (реципиент HD) характеризовались измеряемыми ответами Th2 (фиг. 124B), но у всех участников с измеряемыми ответами Th1 и/или Th2 соотношение Th1/Th2 составляло значительно более 1.

S-специфические CD8+ Т клеточные ответы, определяемые по экспрессии цитокинов IFN-γ и/или IL-2 при стимуляции S-пептидом (фиг. 124C), отсутствовали на исходном уровне в обеих когортах. На 15-й день после вакцинации 51% (95% ДИ: 39, 63) и 64% (95% ДИ: 52, 75) участников когорты 1a характеризовались CD8+ Т клеточным ответом со средней величиной S-специфического CD8+ Т клеточного ответа 0,07% (Q1, Q3: 0,03, 0,19) и 0,09% (Q1, Q3: 0,05, 0,19) для групп LD и HD, соответственно. В когорте 3 ответы CD8+ Т клеток оказались ниже: 36% (95% ДИ: 23, 51) и 24% (95% ДИ: 13, 37) ответивших реципиентов со средней величиной 0,06% (Q1, Q3: 0,02, 0,12) и 0,02% (Q1, Q3: 0,01, 0,08) для групп LD и HD, соответственно. Корреляция между ответами CD4+ Th1 и CD8+ Т клеток в обеих группах была слабой (фиг. 122B).

Выводы

Промежуточный анализ данного исследования фазы 1/2a свидетельствует о том, что вакцина-кандидат Ad26.COV2.S характеризуется пригодным профилем безопасности и реактогенности и является иммуногенной после однократной вакцинации в дозе $5x10^{10}$ или $1x10^{11}$ вч. После введения дозы 1 наблюдалась тенденция к более высокой частоте сообщаемых системных АЕ с более высоким уровнем дозы вакцины, четкая тенденция к снижению АЕ степени 3 с увеличением возраста участников, что представляет собой ожидаемую целевую популяцию для эффективных вакцин против Covid-19. Местные и системные реакции развивались в день иммунизации или на следующий день и обычно исчезали в течение 24 ч. Системные реакции являлись чрезвычайно чувствительными к жаропонижающим средствам и необходимость в их профилактическом применении отсутствовала. После второй дозы в возрасте 18–55 лет частота системных сообщаемых нежелательных явлений 3-й степени оказалась намного ниже по сравнению с частотой после первой иммунизации как для более низкой, так и для более высокой дозы вакцины, в отличие от наблюдений при введении вакцин на основе иРНК, согласно которым вторая доза считается связанной с повышенной реактогенностью.

В то время как для всех других вакцин против Covid-19, разрабатываемых в настоящее время, необходимо использование двух доз, однократная доза Ad26.COV2.S вызывала сильные гуморальные реакции у подавляющего большинства реципиентов вакцины с S-связывающими и нейтрализующими антителами у более чем 90% участников независимо от возрастной группы и дозы вакцины. Кроме того, в течение доступного в настоящее время периода наблюдения, составляющего 71 день после введения дозы 1, титры антител дополнительно увеличились и стабилизировались, что свидетельствует о стойкости иммунных ответов, вызванных Ad26.COV2.S.

Эффективная однодозовая вакцина против Covid-19 имеет очевидные логистические преимущества по сравнению с двухдозовой вакциной, особенно при использовании в условиях пандемии. Как было отмечено в данном контексте, введение второй дозы вакцины у взрослых в возрасте 18–55 лет на 57-й день приводило к еще большему увеличению титров антител, что также соответствует недавним наблюдениям на модели животных NHP. Титры нейтрализующих антител против вектора Ad26, вызванные первой вакцинацией,

не коррелировали с величиной ответов после дозы 2. Вопрос о том, потребуется ли вторая доза для повышения эффективности и/или долговечности у людей, в настоящее время изучается в ходе фазы 3клинических испытаний.

Отсутствие стандартов и использование разных анализов усложняет сравнение эффективности различных разрабатываемых вакцин против Covid-19. Кроме того, сравнения с панелями HCS являются скорее произвольными, т.к. они характеризуются различными GMT, вероятно связанными с составом панелей (т.е. степень тяжести Covid-19 у доноров, время отбора проб с момента развития заболевания и др.).

Теоретический риск развития усиленного респираторного заболевания, связанного с вакциной (VAERD) связан со слабой эффективностью нейтрализации гуморального иммунитета и Th2-смещенными клеточными иммунными ответами. В данном контексте все ответы CD4+ Т клеток, вызванные Ad26.COV2.S, были смещены по отношению к Th1, что находится в соответствии с предыдущим опытом работы с платформой вакцины на основе Ad26. Сопутствующий устойчивый ответ CD8+ Т клеток, который у пожилых людей снижен, и сильный гуморальный ответ дополнительно минимизируют теоретический риск VAERD.

В заключение следует отметить, что промежуточный анализ авторов настоящего изобретения свидетельствует о том, что Ad26.COV2.S является безопасным, характеризуется хорошей переносимостью и иммуногенностью. В ходе двух продолжающихся исследований фазы 3 оценивают эффективность однократной или двухдозовой схемы $5x10^{10}$ вч Ad26.COV2.S.

Пример 28

Продуктивность Ad26.COV2.S

Продуктивность вектора Ad26.COV2.S (который также называют Ad26NCOV030, Ad26COVS1), которая определяется титрами вирусных частиц на мл (вч/мл), имеет большое значение для увеличения выхода векторов в биореакторах, чтобы обеспечить достаточное количество материала на различных этапах процесса вниз по потоку. Таким образом, продуктивность оценивали на установке малого масштаба при сравнении вектора-кандидата вакцины с соответствующими эталонными контролями, производительность которых в процессе интенсификации процесса (PIN) в 10-литровом биореакторе известна.

Продуктивность вакцины-кандидата Ad26NCOV030 тестировали вместе с вектором Ad26NCOV028 в одном эксперименте, поскольку изначально оба этих конструкта рассматривали для выбора ведущего кандидата. Краткое описание метода: клетки sPER.C6 и sPER.C6 TetR трансдуцировали с использованием 70 и 300 вч/клетка очищенного материала Ad26NCOV030 и Ad26NCOV028 и двумя контролями-маркерами Ad26, векторами Ad26.ZEBOV и 26ZIK001 (стандартная и низкая контрольная концентрация, соответственно).

Образцы собирали в день 0, 1, 2, 3 и 4 после инфицирования, а титры вектора Ad26 определяли по вирусным частицам с использованием количественной полимеразной цепной реакции (VP-qPCR). Как показано на фиг. 125A, продуктивность Ad26NCOV030 в клетках sPER.C6 находилась между низким и стандартным контролем и превышала продуктивность Ad26NCOV028, который аналогичен контролю с низкой концентрацией. Продуктивность клеток sPER.C6 TetR (фиг. 125B) оказалась максимальной как для Ad26NCOV030, так и для Ad26NCOV028 (оба аналогичны стандартному контролю). Результаты оценки продуктивности в малом масштабе были усилены запусками в биореакторе объемом 2 л с использованием клеток PER.C6 и sPER.C6 TetR (см. табл. ниже). Полученные данные свидетельствуют о том, что оба вектора Ad26NCOV028 и Ad26NCOV030 являются высокими продуцентами в клетках PER.C6 TetR на платформе 2L PIN, и что Ad26NCOV028 и Ad26NCOV030 в клетках PER.C6 оказались соответственно ниже средних значений и средних продуцентов.

Таблица (Ad26NCOV030) и циклы в биореакторе Ad26NCOV028 объемом 2 л

Вектор	Клеточная линия	Титр VP (VP/мл, VP-qPCR)	
		День 2 pi	День 3 pi
Ad26NCOV028	PER.C6 TetR	1.78E12	5.70E12
JNJ-78436735	PER.C6 TetR	3.10E12	6.14E12
Ad26NCOV028	PER.C6	1.14E11	5.57E10
JNJ-78436735	PER.C6	6.24E11	1.15E12

вч означает вирусные частицы, qPCR означает количественную полимеразную цепную реакцию, TetR означает тетрациклиновый репрессор.

Пример 29

Иммунитет, вызванный вектором Ad26.COV2.S, защищает сирийских хомяков от инфекции SARS-CoV-2, вызванной вариантом 614G шиповидного белка, и не усиливает респираторное заболевание у зараженных животных с возникновением инфекции после недостаточно оптимальной дозы вакцины

В данном примере описана альтернативная модель инфекции SARS-CoV-2 у хомяков, которую использовали для подтверждения иммуногенности Ad26.COV2.S и оценки его защитной эффективности против интраназальной инфекции вариантом шиповидного белка 614G SARS-CoV-2 (BetaCoV/Мюнхен/BavPat1/2020). У невакцинированных животных заражение этим вирусом приводило к заражению верхних и нижних дыхательных путей, что, по данным гистопатологических исследований, приводило к заболеванию от легкой до средней степени тяжести. Вектор Ad26.COVS.2 приводил к выработке связывающих и нейтрализующих антител после однократной дозы, которую дополнительно увеличивали второй дозой вакцины после 4-недельного интервала. Ad26.COV2.S вызвал самый высокий уровень антител и защиты по сравнению с двумя другими протестированными вакцинами-прототипами COVID-19 на основе Ad26. Недостаточно оптимальная доза Ad26.COV2.S вызывала гуморальный ответ, который не защищал от репликации вируса в легких после заражения, но не выявлял признаков VAERD по оценке мониторинга репликации респираторного вируса и подробного гистопатологического анализа.

Материалы и методы

Вакцины

Вакцины на основе Ad26 получали, как описано в данном контексте. Краткое описание метода: Вакцины основаны на неспособном к репликации векторе аденовируса серотипа 26 (Ad26), кодирующем стабилизированную до слияния последовательность шиповидного белка SARS-COV-2 (Wuhan Hu1, номер доступа в GenBank: MN908947). Неспособные к репликации векторы Ad26 с делецией E1/E3 конструировали с использованием системы AdVac (Abbink и др., J. Virol. т. 81, сс. 4654–4663 (2007)) и технологии единой плазмиды, содержащей геном вектора Ad26, включая трансгенную экспрессионную кассету. Оптимизированный по кодонам стабилизированный до слияния ген, кодирующий шиповидный белок SARS-COV-2, вставляли в положение E1

генома вектора Ad26. Получение векторов Ad26 осуществляли в комплементарной клеточной линии PER.C6 TetR (Wunderlich и др., Potent and short promoter for expression of heterologous genes. (2018), Zahn и др., PLoS One. T. 7, сс. 1–13 (2012)). Вектор отрицательного контроля Ad26.Irr (RSV-FA2-2A-GLuc) кодировал белок F RSV, конъюгированный с люциферазой светлячка Gaussia, в виде отдельного трансгена, разделенного пептидной последовательностью 2A, что приводило к экспрессии обоих отдельных белков. Получение вектора проводили в PER.C6. Перед использованием аденовирусные векторы тестировали на уровни бионагрузки и эндотоксина.

Дизайн исследования с участием животных

Исследования с участием хомяков

Эксперименты с участием животных были одобрены Центральным органом по научным процедурам на животных (Centrale Commissie Dierproeven) и их проводили в соответствии с европейскими рекомендациями (директива EU по испытаниям на животных 86/609/EEC) и местным законодательством Нидерландов об экспериментах с участием животных. Прижизненная фаза проходила в компании Viroclinics Biosciences BV. Весь персонал Viroclinics, принимавший участие в проведении клинических наблюдений и лабораторных анализов, для которых требовалась интерпретация данных, не был информирован о ключе назначения лечения в любое время до завершения исследования и присвоение уникального номера каждому собранному образцу и анализу проводили слепым методом.

Самцов сирийских (золотых) хомяков (*Mesocricetus auratus*), штамм HsdHan:AURA, в возрасте 9-11 недель на момент начала исследования приобретали на фирме Envigo ++++. Хомяков иммунизировали внутримышечно 100 мкл вакцины (50 мкл на заднюю лапу) под анестезией изофлураном. Хомякам интраназально вводили 100 мкл, содержащих 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 (BetaCoV/Munich/BavPat1/2020, содержащих замену D614G во фрагменте S1). Последовательность тестового штамма характеризовали, и было установлено, что материал соответствует родительскому штамму. В день заражения, перед заражением и ежедневно в течение четырех дней после заражения отбирали мазки из горла под анестезией изофлураном. Мазки из горла собирали в среде для переноса вирусов, разделяли на аликвоты и хранили до времени проведения анализа. Промежуточные образцы крови отбирали из ретроорбитального синуса

под анестезией изофлураном. Кровь обрабатывали для получения сыворотки. В конце эксперимента под наркозом животных умерщвляли путем смещения шейных позвонков и проводили вскрытие. Ткани дыхательных путей, собранные после вскрытия, анализировали на вирусную нагрузку и гистопатологические изменения.

Исследования с участием кроликов

Эксперименты с участием кроликов были одобрены местным органом по защите животных и проводили в соответствии с европейскими рекомендациями (Директива ЕС о защите животных, используемых в научных целях 2010/63/EU) и местным бельгийским законодательством об экспериментах с участием животных. Прижизненный этап исследований проходил в лаборатории доклинической безопасности Beerse компании Janssen Research and Development, одобренной AAALAC. Самок новозеландских белых кроликов в возрасте примерно 4 месяца в начале исследования приобретали на фирме Charles River Laboratories во Франции. Кроликов иммунизировали на 0-й и 8-й неделе исследования в дозе 5×10^{9} или 5×10^{10} вч Ad26.S, Ad26.dTM.PP или Ad26.COV2.S в объеме 0,5 мл внутримышечно. В контрольной группе пять кроликов иммунизировали физиологическим раствором. Промежуточные образцы крови для получения сыворотки собирали через боковую вену уха. В конце эксперимента животных умерщвляли внутривенной инъекцией пентобарбитала натрия с последующим обескровливанием через бедренную артерию.

Гистопатология

Гистопатологию оценивали патологоанатом из фирмы Viroclinics Biosciences BV и патологоанатом из фирмы Janssen Non-Clinical Safety (Beerse, Бельгия).

Через четыре дня после введения всех животных подвергали вскрытию при вскрытии грудной и брюшной полостей и осмотра всех основных органов. Степень легочной консолидации оценивали на основе визуальной оценки доли пораженной легочной ткани в %. Левые носовые раковины, трахею и левое легкое собирали для гистопатологического исследования и анализа методом IHC. Все ткани осторожно смачивали и/или погружали в 10% нейтральный буферный раствор формалина для фиксации. Легкие и трахею обрабатывали стандартным образом, заливали парафином, готовили микросрезы размером до 3 мкм на предметных стеклах и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для

гистопатологической оценки. Собранные и фиксированные носовые раковины обрабатывали после декальцинации и заливали в парафиновые блоки, разрезали и окрашивали аналогичным образом. Окрашенные H&E срезы тканей исследовали с помощью световой микроскопии с использованием оптического микроскопа Zeiss Axioplan или Leica DM2500 с шагом увеличения 25x, 100x, 200x и 400x для оценки гистопатологии, а также на наличие любых других поражений. Тяжесть воспалительной клеточной инфильтрации в носовых раковинах и трахеях оценивали в баллах ринита и трахеита: 0 означает отсутствие воспалительных клеток, 1 означает присутствие малого количества воспалительных клеток, 2 означает присутствие умеренного количества воспалительных клеток, 3 означает присутствие большого количества воспалительных клеток.

Каждый срез легочной ткани исследовали целиком и оценивали наличие или отсутствие альвеолярного отека, альвеолярного кровоизлияния и гиперплазии пневмоцитов II типа (0 означает отсутствие, 1 означает присутствие). Степень и тяжесть воспалительной клеточной инфильтрации и повреждения в альвеолах, бронхах/бронхиолах оценивали в баллах альвеолита и бронхита/бронхиолита: 0 означает отсутствие воспалительных клеток, 1 означает присутствие малого количества воспалительных клеток, 2 означает присутствие умеренного количества воспалительных клеток, 3 означает присутствие большого количества воспалительных клеток. Степень перибронхиальной/периваскулярной инфильтрации: 0 означает отсутствие, 1 означает толщину 1-2 клетки, 2 означает толщину 3-10 клеток, 3 означает толщину более 10 клеток. Кроме того, оценивали степень альвеолита/альвеолярного повреждения на предметном стекле: 0 означает 0%, 1 означает <25%, 2 означает 25–50%, 3 означает >50%.

Совокупный балл (сумма) степени и тяжести воспаления легочной ткани представлял собой общий балл нижних дыхательных путей (LRT) с возможным максимальным баллом 24. Следующие гистопатологические параметры включали в сумму параметров заболеваний нижних дыхательных путей: альвеолит, повреждение альвеол, альвеолярный отек, альвеолярное кровоизлияние, гиперплазия пневмоцитов II типа, бронхит, бронхиолит, перибронхиальная и периваскулярная инфильтрация.

Иммуногистохимия

Отбирали образцы тканей легких, носа и трахеи были взяты, фиксировали в 10% формалине (легкие заливали) в течение 14 дней и заливали парафином фирмы Viroclinics Biosciences B.V.

Парафиновые срезы легких, срезов трахеи и носа всех животных окрашивали автоматически (Ventana Discovery Ultra, Roche, Франция) с использованием кроличьего поликлонального антитела к нуклеокапсидному белку SARS-CoV (NP, Novus NB100-56576, 1/300), которое проявляет перекрестно реактогенность по отношению к NP SARS-CoV-2. Эти срезы полуколичественным методом оценивали по количеству иммунореактивных клеток в баллах 0: отсутствие положительных иммунореактивных клеток, 1: минимальное (несколько/очаговое) количество положительных клеток, 2 умеренное (очаговое/многоочаговое) количество положительных клеток и 3: много/высокое (фокально обширное/многоочаговое) количество иммунореактивных клеток.

Анализ нейтрализации вирусов

Анализы нейтрализации жизнеспособного SARS-CoV-2 проводили с использованием анализа микронейтрализации, ранее описанного Альгаисси и Хашемом (Algaissi & Hashem, Evaluation of MERS-CoV Neutralizing Antibodies in Sera Using Live Virus Microneutralization Assay. сс. 107–116 (2020). doi: 10.1007/978-1-0716-0211-9_9). Клетки Vero E6 [CRL-1580, Американская коллекция типовых культур (ATCC)] выращивали в минимальной питательной среде Игла (EMEM, Lonza) с добавлением 8% фетальной телячьей сыворотки (FCS, Bodinco BV), 1% пенициллин-стрептомицина (Sigma- Aldrich, P4458) и 2 мМ L-глутамина (PAA). Клетки поддерживали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Из образца носоглотки выделяли клинический изолят SARS-CoV-2/human/NLD/Leiden-0008/2020 (Leiden L-0008), который будет описан в другом документе (документ находится на стадии подготовки). Секвенирование изолята этого вируса следующего поколения доступна под инвентарным номером GenBank MT705206 и содержит 1 мутацию в вирусе Leiden-0008 по сравнению с последовательностью Wuhan, приводящую к замене Asp>Gly в положении 614 (D614G) шиповидного белка. Изолят Leiden-0008 размножали и титровали в клетках Vero E6 с использованием метода разведения конечного значения $TCID_{50}$. $TCID_{50}$ рассчитывали с использованием алгоритма

Спирмена-Кербера, как описано в статье (Hierholzer & Killington, Virology Methods Manual – Virusisolation and quantitation (1996).doi:10.1016/B978-0-12-465330-6.X5000-3). Все работы с жизнеспособным SARS-CoV-2 проводили в учреждении уровня биобезопасности 3 в Медицинском центре Лейденского университета.

Клетки Vero-E6 высевали по 12000 клеток/лунка в 96-луночные планшеты для тканевых культур за 1 день до инфицирования. Инактивированные нагреванием (30 мин при 56°C) образцы сыворотки анализировали в двух повторах. Панель сывороток последовательно разбавляли в 2 раза в двух повторах, с начальным разведением 1:10 и конечным разведением 1:1280 в 60 мкл среды EMEM с добавлением пенициллина, стрептомицина, 2 мМ L-глутамина и 2% FCS. Разведенные сыворотки смешивали с равными объемами 120 $TCID_{50}$/60 мкл вируса Leiden-0001 и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Затем на монослои клеток Vero-E6 наносили смеси вирус-сыворотка и инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO_2. Клетки, не подвергшиеся воздействию вируса, или смешанные с 120 $TCID_{50}$/60 мкл SARS-CoV-2, использовали в качестве отрицательного (неинфицированного) и положительного (зараженного), контроля соответственно. Через 3 дня после заражения клетки фиксировали и инактивировали 40 мкл 37% раствора формальдегида/PBS на лунку в течение ночи при 4 °C. Фиксатор удаляли из клеток и кластеры окрашивали 50 мкл/лунка раствором кристаллического фиолетового, инкубировали в течение 10 мин и промывали водой. Высушенные планшеты оценивали на вирусный цитопатический эффект. Титр нейтрализации рассчитывали при делении количества положительных лунок с полным ингибированием вирус-индуцированного цитопатогенного эффекта на количество повторов с последующим прибавлением 2,5 для стабилизации расчетного соотношения. Титр нейтрализующих антител определяли как обратный log2 данного значения. Обратное титрование SARS-CoV-2 включали в каждый цикл анализа для подтверждения нахождения дозы использованного инокулята в допустимом диапазоне от 30 до 300 $TCID_{50}$.

ИФА

Связывание IgG с шиповидным антигеном SARS-CoV-2 измеряли методом ИФА с использованием полноразмерного шиповидного белка COR200099, полученного авторами настоящего изобретения (исследования с участием

хомяков) или COR200153 (исследования с участием кроликов). COR200099 представляет собой шиповидный белок SARS-CoV-2, полученный авторами настоящего изобретения, стабилизированный двумя точечными мутациями в участке соединения S1/S2, которые отключают сайт расщепления фурином, и двумя недавно введенными пролинами в шарнирной области в S2. Кроме того, трансмембранная и цитоплазматическая области заменены доменом сборки (фолдон) для мутаций тримеризации, что позволяет продуцировать белок в виде растворимого белка. COR200153 представляет собой шиповидный белок SARS-CoV-2, полученный авторами настоящего изобретения, основанный на штамме Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2 (MN908947) и стабилизированный двумя точечными мутациями (R682A, R685G) в участке соединения S1/S2, которые отключают сайт расщепления фурином, и двумя последовательными пролинами (K986P, V987P) в шарнирной области в S2 и A942P. Кроме того, трансмембранная и цитоплазматическая области заменены доменом сборки фибритина для тримеризации. Белок биотинилировали в С-концевом фрагменте с использованием реакции сортазы А.

Для исследования с участием хомяков на 96-луночные планшеты белого цвета Perkin Elmer на половину площади наносили белок в течение ночи. Для исследования с участием кроликов и нанесения на планшеты белка, их инкубировали в течение 2 ч при 37°C. После инкубации планшеты промывали, блокировали в течение 1 ч и затем инкубировали в течение 1 ч с 3-кратными серийными разведениями образцов сыворотки в буферном растворе для блокировки в двух повторах. После промывки планшеты инкубировали в течение 1 ч в присутствии конъюгата Rabbit-Anti-Hamster IgG HRP (Invitrogen, номер по каталогу A18895) или антикроличьим IgG-HRP (Jackson ImmunoResearch) в буферном растворе для блокировки, снова промывали и проявляли с использованием ECL-субстрата. Считывание люминесценции проводили с использованием прибора BioTek Synergy Neo (образцы хомяков) или на планшетном ридере Envision Multimode (образцы кроликов). Титры антител хомяков представлены в виде конечного параметра Log10, титры кроликов представлены в виде относительной активности Log10 по сравнению с эталонным стандартом.

Статистический анализ

Статистические различия между уровнями доз в схемах иммунизации оценивали методом двухстороннего анализа для S-специфических связывающих антител, измеренных с использованием ИФА, титров нейтрализации, измеренных с использованием анализа нейтрализации вируса (VNA), вирусной нагрузки, измеренной с использованием $TCID_{50}$, гистопатологии и IHC. Сравнение уровней доз между группами Ad26.S, Ad26.dTM.PP и Ad26.COV2.S проводили с использованием t-критерия ANOVA и вакцины с дозой в качестве факторов для измерений без цензурирования с LLOD или LLOQ или z-критерия Tobit ANOVA для измерений, подвергнутых цензурированию не более 50%, или критерия Кокрана-Мантеля-Хензеля для измерений, подвергнутых цензурированию не менее 50%. Результаты корректировали для множественных сравнений 3-кратной коррекцией Бонферрони. Исследовательские сравнения по уровню дозы и по уровню дозы групп Ad26.S, Ad26.dTM.PP и Ad26.COV2.S с группами, иммунизированными нерелевантным антигеном, Ad26.Empty и Ad26.Irr, выполняли с использованием методов, описанных выше или U-критерия Манна-Уитни. Результаты не корректировали для множественных сравнений из-за исследовательского характера этого анализа.

Статистический анализ проводили с использованием SAS версии 9.4 (SAS Institute Inc., Кэри, Северная Каролина, США) и R версии 3.6.1 (05.07.2019). Статистические тесты проводили методом двухстороннего анализа при общем уровне значимости $\alpha = 0,05$.

Корреляционный анализ

Хомяков классифицировали как инфицированных или защищенных от SARS-CoV-2, что определяли по вирусной нагрузке в легких выше или ниже 102 $TCID_{50}$/г, соответственно. На основании данных о связывании и нейтрализации антител, объединенных для различных схем и уровней доз Ad26.COV2.S, строили модели логистической регрессии с поправкой Ферта, с результатом защиты в качестве зависимой переменной и данными ИФА, преобразованными wtVNA и Log10, перед инокуляцией в качестве независимой переменной.

Полученные результаты

Создание альтернативной модели заражения сирийского хомяка вирусом SARS-CoV-2

Чтобы оценить иммуногенность, эффективность и VAERD вакцины у хомяков, авторы настоящего изобретения разработали альтернативную модель заражения сирийских хомяков, основанную на штамме SARS-CoV-2 с преимущественной заменой D614G в шиповидном белке. Самцов животных (n = 12 на уровень дозы заражения) заражали вирусом SARS-CoV-2 BetaCoV/Munich/BavPat1/2020 (содержащим замену D614G во фрагменте S1) при уровнях доз 10^2, $10^{3,3}$, $10^{4,6}$ и $10^{5,9}$ 50% инфицирующей дозы культуры ткани ($TCID_{50}$), вводимой интраназальным методом. Ежедневно отбирали мазки из горла, а вскрытие проводили через 2, 3, 4 и 7 дней после заражения (dpi) (n = 3 на момент времени) для мониторинга вирусной нагрузки в мазках из горла, в тканях легких и носа, а также для изучения патологии дыхательных путей. Как указано на фиг. 126A и B, оценка вирусной нагрузки тканей легких и носа выявила высокие титры способного к репликации вируса, измеренные с использованием $TCID_{50}$, у всех зараженных животных при 2 dpi, независимо от размера инокулята. Наблюдаемая кинетика вирусной нагрузки в легких и носу после 2 dpi являлась сопоставимой для всех тестируемых количеств инокулята. У хомяков, зараженных в дозе $10^{3,3}$, $10^{4,6}$ и $10^{5,9}$ $TCID_{50}$, наблюдали самые высокие вирусные нагрузки в мазках из горла при одном dpi (фиг. 126C), после чего вирусные нагрузки снижались до уровня ниже предела обнаружения через максимум пять дней после заражения (dpi). Напротив, заражение самой низкой дозой SARS-CoV-2, равной 10^2 $TCID_{50}$, привела к увеличению инфекционной вирусной нагрузки с одного до двух dpi, что свидетельствует о репликации в легких, после чего вирусная нагрузка снизилась до уровня ниже предела обнаружения на 4-й день после инокуляции.

По данным гистологического анализа с использованием иммуногистохимии после заражения 10^2 $TCID_{50}$ наблюдалось обильное присутствие нуклеокапсидного белкового антигена SARS (SARS-CoV-2 NP) в зонах тяжелого воспаления, характеризующегося многоочаговой умеренной или тяжелой дегенерацией и некрозом эпителиальных клеток верхних и нижних дыхательных путей (данные не показаны). По сравнению с более высокими дозами заражения, доза 10^2 $TCID_{50}$ индуцировала сравнимую степень и тяжесть

воспаления и повреждения во всех дыхательных путях, как определено слепым методом полуколичественного подсчета (фиг. 126D и E), с предельно допустимыми показателями гистопатологии легких при более низких уровнях дозы. Объединенные результаты свидетельствуют о том, что инокулят с низкой дозой провоцировал сопоставимую вирусную нагрузку и патологию заболевания по сравнению с заражением более высокой дозой вируса. Для последующих экспериментов авторы настоящего изобретения выбрали контрольную дозу 10^2 $TCID_{50}$, связанную с заболеванием легкой и средней степени тяжести, на основании данных гистопатологии, чтобы в этой модели можно было обнаружить развитие более тяжелого заболевания и устранить теоретический риск VAERD. 4-дневный период наблюдения после заражения был выбран как наиболее оптимальный период времени для одновременной оценки вирусной нагрузки легочной ткани и гистопатологии.

Иммуногенность Ad26.COV2.A у сирийских хомяков

Иммуногенность и защитная эффективность вакцины-кандидата Ad26.COV2.S по настоящему изобретению оценивали в новой разработанной модели заражения, описанной выше. Для сравнения использовали два прототипа вакцины на основе Ad26, экспрессирующие связанный с мембраной полноразмерный шиповидный белок дикого типа (Ad26.S) или растворимый стабилизированный до слияния шиповидный белок с C-концевым фолдоном, заменяющим трансмембранный домен (Ad26.dTM. PP). Хомяков иммунизировали в дозе либо 10^9, либо 10^{10} вирусных частиц (вч) Ad26.COV2.S и двумя вакцинами-прототипами. Для каждого уровня дозы иммуногенность оценивали в различные моменты времени после однократной дозы и после введения второй гомологичной дозы на 4 неделе. Животных заражали через 4 недели после последней дозы вакцины (фиг. 127A). На 4-й неделе Ad26.COV2.S вызывал самые высокие титры нейтрализующих антител и частоту отвечающих животных при разных уровнях дозы (средний титр 10^9 вч 22,6, 10^{10} вч 38,6, 12/12 ответивших реципиентов) по сравнению с Ad26.S (средний титр 10^9 вч 8,5), 10^{10} вч 9,7, 8/12 ответивших реципиентов, $p<0,001$) и Ad26.dTM.PP (средний титр 10^9 вч 8,5, 10^{10} вч 16,0, 8/12 ответивших реципиентов, $p<0,001$) (фиг. 127B). Вторая доза, независимо от используемой вакцины, повышала титры нейтрализации (неделя 8, фиг. 127C). Вакцина Ad26.COV2.S оказалась наиболее иммуногенной также после введения двух доз со средним титром нейтрализации 128 после двух

доз по 10^9 вч и 219 после двух доз по 10^{10} вч по сравнению с 32 и 55, соответственно, для Ad26.S (p= 0,003) и 16 и 61 для A26.dTM.PP (p=0,002).

Связывание антител, измеренное методом ИФА, показало такие же различия между вакцинами Ad26.COV2.S и двумя вакцинами-прототипами (фиг. 128A), которые отражены в сопоставимых соотношениях титров нейтрализующих и связывающих антител (фиг. 128B и C). Однако вторая доза на 4-й неделе лишь временно увеличивала средние титры связывающих антител на 5-й неделе (фиг. 128A). Титры антител впоследствии снижались и на 8-й неделе оказались сопоставимыми с уровнями, наблюдаемыми до введения дозы 2 на 4-й неделе, или ниже.

Авторы настоящего изобретения подтвердили иммуногенность Ad26.COV2.S и двух вакцин-прототипов, а также преимущества введения второй дозы кроликам по двухдозовой схеме с использованием 8-недельного интервала, который также оценивали в ходе клинических исследований. Вакцины тестировали при уровне доз 5×10^9 и 5×10^{10} вч, из которых последняя представляет собой дозу для человека, используемую в ходе клинических испытаний фазы 3. Все протестированные вакцины вызывали титры связывающих и нейтрализующих антител уже через 2 недели после первой дозы Ad26.COV2.S, при этом еще раз наблюдали более высокие титры антител по сравнению как с Ad26.S, так и с Ad26.dTM.PP (рис. 129A и B, приложение). Вторая гомологичная доза на 8-й неделе значительно повышала титры связывающих и нейтрализующих антител на 10-й неделе (через 2 недели после второй дозы) по сравнению с уровнями дозы в период до введения второй дозы ($p<0,001$).

Защитная эффективность Ad26.COV2.S против заражения SARS-CoV-2 у сирийских хомяков

Затем авторы настоящего изобретения изучали защитную эффективность Ad26.COV2.S и двух прототипов вакцин, вводимых по 1- или 2-дозовым схемам сирийским хомякам с последующей интраназальным заражением 10^2 $TCID_{50}$ вируса SARS-CoV-2 D614G через 4 недели после последней дозы, т.е. на 4 неделе для схемы с 1 дозой и на 8 неделе для схемы с 2 дозами. После введения сухой порошкообразной ингаляционной дозы (dpi) животных умерщвляли, а легкие, носовые раковины и мазки из горла анализировали на вирусную нагрузку и патологические изменения. Для увеличения эффективности статистического

анализа и, поскольку авторы настоящего изобретения не наблюдали выраженной ответной реакции на вирусологические показанияони регистрировали показания вирусной нагрузки для сравнения с контрольной группой Ad26.Empty. Сравнение трех различных вакцин (Ad26.COV2.S, Ad26.S, Ad26.dTM.PP) проводили по уровням доз.

После однократной вакцинации и последующего заражения средняя вирусная нагрузка в легких во всех вакцинированных группах оказалась значительно ниже по сравнению с контрольной группой Ad26.Empty (средняя вирусная нагрузка $10^{7,3}$ $TCID_{50}$/г) (фиг. 130A). Вирус в легких был обнаружен у 11 из 12 животных, иммунизированных однократной дозой Ad26.S (средняя вирусная нагрузка 10^{9} вч $10^{5,6}$ $TCID_{50}$/г, 10^{10} вч 10^{5} $TCID_{50}$/г), и у 10 из 12 животных, иммунизированных однократной дозой A26.dTM.PP (средняя вирусная нагрузка 10^{9} вч $10^{5,3}$ $TCID_{50}$/г, 10^{10} вч $10^{5,7}$ $TCID_{50}$/г), при этом выраженного эффекта дозы вакцины не наблюдалось. Напротив, только у 3 из 12 животных, иммунизированных однократной дозой Ad26.COV2.S, вирус обнаруживался в легких (средний титр уровней объединенной дозы $10^{1,2}$ $TCID_{50}$/г). 9 из 12 хомяков, вакцинированных второй дозой Ad26.COV2.S, характеризовались неопределяемой вирусной нагрузкой для обоих уровней дозы вакцины, что предполагает отсутствие дополнительной ценности второй дозы. Вирусная нагрузка у зараженных после вакцинации животных также оказалась аналогичной вирусной нагрузке у животных, зараженных после одной вакцинации. Вторая доза 10^{9} вч Ad26.S или Ad26.dTM.PP также мало влияла на уровень инфекции легких после заражения на 8 неделе (5 из 6 животных характеризовались определяемой вирусной нагрузкой на вакцину), но вторая доза 10^{10} вч таких вакцин-прототипов ассоциировались с более низкой средней вирусной нагрузкой в легких по сравнению с однодозовой схемой (средний титр 10^{2} $TCID_{50}$/г и 10^{4} $TCID_{50}$/г, соответственно), что свидетельствует о преимуществе двухдозовой схемой (фиг. 130B).

Для определения влияния вакцин на вирусную нагрузку в верхних дыхательных путях вирусную нагрузку в носовых раковинах определяли после умерщвления после введения 4 dpi, а вирусную нагрузку в мазке из горла определяли ежедневно после заражения и анализировали как площадь под кривой (AUC) на одно животное до 4-го дня после заражения. У животных, которым вводили однократную дозу вакцины, ограниченное, но статистически

значимое снижение вирусной нагрузки на носовые раковины после заражения наблюдали для Ad26.dTM.PP, но не для Ad26.COV2.S и Ad26.S по сравнению с контрольной группой. После введения 2 доз вакцины все три вакцины вызывали значительное снижение вирусной нагрузки в носовых раковинах после заражения по сравнению с группой Ad26.Empty. Напротив, данные вирусной нагрузки мазка из горла свидетельствуют о том, что ни одна из вакцин не снижала вирусную нагрузку в горле после однократной иммунизации и последующего заражения SARS-CoV-2 (рис. 130 C и E), и только животные, иммунизированные двумя дозами Ad26. COV2.S, характеризовались значительно сниженной вирусной нагрузкой в горле по сравнению с контролем (рис. 130 E и F).

Наблюдаемые результаты защитной эффективности дополнительно подтверждали иммуногистохимическим (IHC) окрашиванием NP SARS-CoV-2 в ткани легких и носа, а также гистопатологией (рис. 131 и 132). Баллы IHC гистопатологии легких и носа в целом соответствовали данным о вирусной нагрузке, при этом наблюдали низкие средние баллы в легких иммунизированных групп по сравнению с группой Ad26.Emtpy (рис. 131) и отсутствие снижения степени вирусной инфекции и последующей патологии в тканях носа вакцинированных животных по сравнению с Ad26. контрольной группой Empty, независимо от схемы вакцинации (фиг. 132).

<u>У сирийских хомяков, иммунизированных недостаточно оптимальными уровнями доз A26.COV2.S, не развиваются признаки VAERD после заражения SARS-CoV-2 и заражения после вакцинации.</u>

На основании наблюдаемой иммуногенности и эффективности Ad26.COV2.S был выбран для дальнейшей оценки титрования дозы, чтобы учесть теоретический риск VAERD в условиях субоптимального иммунного ответа, допускающего заражение SARS-CoV-2 после вакцинации. Группы хомяков иммунизировали однократной дозой Ad26.COV.S в дозе 10^7, 10^8, 10^9 или 10^{10} вч (4 группы, n=8/группа). Контрольной группе вводили 10^{10} вч контрольной вакцины, кодирующей нерелевантный антиген (Ad26.Irr). Через 4 недели после иммунизации авторы изобретения наблюдали четкий дозозависимый ответ связывающих и нейтрализующих антител, как в количестве отвечающих животных, так и в титрах антител, при этом титры нейтрализующих антител не обнаруживались у 3 из 8 животных при самом низком уровне дозы

10^7 вч (рис. 133 и B). Для доз 10^9 и 10^{10} вч средние уровни связывающих антител (средний конечный титр $10^{3,7}$ и $10^{3,9}$, соответственно) и средний ответ нейтрализующих антител (средний титр нейтрализации 45 и 91, соответственно) соответствовали данным, полученным в предыдущем исследовании. После заражения 10^2 $TCID_{50}$ SARS-CoV-2 хомяки, которым вводили 10^9 и 10^{10} вч Ad26.COV2.S, характеризовались такой же частотой заражения легочной инфекцией после вакцинации, как и в сопоставимых группах в предыдущем исследовании (рис. 130A), при этом у 3 из 8 и 2 из 8 животных наблюдали определяемую вирусную нагрузку в легких в ходе исследования титрования дозы соответственно. Несмотря на увеличение числа животных, зараженных после вакцинации, при более низких дозах Ad26.COV2.S (6 из 8 животных, которым вводили 10^8 вч, и 8 из 8 животных, которым вводилих 10^7 вч), средние титры легочной вирусной нагрузки (средние значения $10^{4,8}$ $TCID_{50}$/г при 10^8 вч, средние значения 10^5 $TCID_{50}$/г при 10^7 вч) и IHC-окрашивание NP SARS-CoV-2 в этих группах (среднее значение в баллах 1) оказались ниже по сравнению с контрольной группой (средняя величина вирусной нагрузки в легких $10^{6,8}$ $TCID_{50}$/г и средний показатель IHC 2) (фиг. 133C и D). В соответствии с вирусной нагрузкой в легких и результатами окрашивания IHC, иммунизация в дозе 10^8, 10^9 и 10^{10} вч значительно уменьшала гистопатологию в нижних дыхательных путях по сравнению с ложноиммунизированными хомяками (фиг. 134A). Иммунизация в дозе 10^9 и 10^{10} вч привела к отсутствию каких-либо признаков гистопатологии нижних дыхательных путей у 4 из 8 и 3 из 8 хомяков, соответственно. Следует отметить, что, несмотря на обнаруживаемое заражение легочной инфекцией у всех хомяков после вакцинации, которым вводили дозу 10^7 вч, и у большинства хомяков, иммунизированных 10^8 вч, средние показатели гистопатологии нижних дыхательных путей оказались ниже по сравнению с группой с ложной иммунизацией. Оценка воспаления ткани носа (ринит) не показала существенных различий между вакцинированной и контрольной группами (фиг. 134B). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что наличие низких уровней нейтрализующих антител, вызванных субоптимальной дозой вакцины Ad26.COV2.S, не приводит к усилению заболевания легких у зараженных сирийских хомяков по сравнению с ложной вакциной.

Корреляция связывающих и нейтрализующих антител с защитой

Для определения предполагаемых коррелятов защиты, титры связывающих и нейтрализующих антител из разных схем и уровней доз регистрировали для Ad26.COV2.S (N=56) и сравнивали показатели защищенных и незащищенных животных (фиг. 135). Защиту от инфекции SARS-CoV-2 определяли как вирусную нагрузку в легких ниже 10^2 TCID/г на основании наблюдения, что лишь несколько животных с определяемой вирусной нагрузкой находятся ниже этого предела, что, вероятно, связано с варьированием количества образцов на животное (фиг. 129A и B и фиг. 133C). Защищенные животные, которым вводили Ad26.COV2.S, характеризовались значительно (в 2,3 раза) более высокими средними титрами связывающих антител по сравнению с незащищенными животными ($p<0,001$, t-критерий для двух образцов) (фиг. 135A). Аналогичные результаты получали для аналогичного анализа средние значения титров нейтрализующих антител, которые также были значительно (в 4 раза) повышены у животных, иммунизированных Ad26.COV2.S, с неопределяемой вирусной нагрузкой в легких по сравнению с незащищенными животными ($p<0,001$, t-критерий для двух образцов) (фиг. 135B).

Для получения более количественного представления о взаимосвязи между уровнями иммунного ответа и показателями защиты, авторы настоящего изобретения создали модели логистической регрессии с поправкой Ферта (рис. 135C). Хомяков классифицировали как инфицированных или защищенных от SARS-CoV-2, что определяли как вирусную нагрузку в легких выше или ниже 10^2 $TCID_{50}$/г, соответственно. Результаты анализа как связывающих, так и нейтрализующих антител свидетельствовали об устойчивой корреляции с вероятностью защиты. Титры связывающих антител достоверно коррелировали с вероятностью защиты ($p=0,0004$), при этом конечные титры выше $10^{3,6}$, по-видимому, были связаны с защитой от инфекции легких. Сопоставимый значительный наклон ($p = 0,0002$) наблюдали для титров нейтрализующих антител, где титры выше 32, по-видимому, были связаны с показателем защиты.

Выводы

В предыдущем исследовании (пример 21) с использованием прототипа раннего изолята SARS-CoV-2 было установлено, что иммунные ответы, вызванные однократной дозой Ad26.COV2.S, могут снизить вирусную нагрузку и защитить хомяков от тяжелой формы клинического заболевания. Однако во

время продолжающейся пандемии SARS-CoV-2 был выявлен вариант вируса с заменой D614G в шиповидном белке. Эта мутация была связана с повышенной приспособленностью вируса, повышенной инфекционностью и в настоящее время стала доминирующим вариантом во многих частях мира, хотя со временем она может быть заменена новыми вариантами, которые постоянно появляются. У сирийских хомяков было подтверждено, что вариант D614G связан с более высокими инфекционными титрами вируса в верхних дыхательных путях, но не в легких. В данном контексте описана разработка дополнительной модели заражения хомяков заболеванием легкой и средней степени тяжести с использованием штамма SARS-CoV-2, содержащего преобладающую замену D614G. Эту модель использовали для проверки защитной эффективности иммунных ответов, вызванных кандидатом на вакцину против COVID-19 Ad26.COV2.S и двумя вакцинами-прототипами на основе Ad26, которые кодируют разные варианты шиповидного белка SARS-CoV-2. По данным исследований авторов настоящего изобретения прогрессирование заболевания в этой модели заражения хомяков были установлены признаки умеренного течения заболевания у людей с явным гистопатологическим заболеванием легких, которое лишь незначительно обострялось при заражении более высокими дозами вируса. Пиковая вирусная нагрузка в легких не зависела от уровня дозы при интраназальной инокуляции, что свидетельствует об инфицировании большинства первично чувствительных клеток легких, что привело к пику виремии на 2-й день после инокуляции. В соответствии с предыдущими исследованиями авторов настоящего изобретения у животных NHP и хомяков вакцинация Ad26.COV2.S снижала репликацию вируса на 6 $\log_{10}$ ниже уровня, наблюдаемого у контрольных животных, при этом у многих животных, которым вводили более высокие дозы вакцины, наблюдалась неопределяемая репликация вируса. Ad26.COV2.S значительно превосходит две вакцины-прототипа как по иммуногенности, так и по защитной эффективности. Более ранние данные в сочетании с настоящим исследованием свидетельствуют о том, что иммунные ответы, вызванные Ad26.COV2.S, обеспечивают адекватную защиту от вариантов SARS-CoV-2 мутацией шиповидного белка D614G и без нее.

Авторы настоящего изобретения расширили предыдущие исследования при оценке второй гомологичной дозы Ad26.COV2.S и вакцин-прототипов,

которые только умеренно улучшили уровни связывающих антител, в то время как титры нейтрализующих антител оказались существенно повышены. Полученный результат противоречит наблюдениям на модели NHP, где вторая доза вакцины значительно повысила уровни как нейтрализующих, так и связывающих антител. Возможные объяснения включают ограниченную возможность к переносу уровней доз хомяков и на модель NHP, различное влияние ответов на вектор анти-Ad26, вызванных первой дозой, на иммуногенность второй гомологичной дозы на животных различных видов, а также способность более короткого интервала между иммунизациями уменьшать влияние второй дозы, как ранее наблюдалось на модели NHP. Кроме того, высокие уровни связывающих антител, вызванные однократной иммунизацией у хомяков, могут представлять уровни насыщения, в то время как нейтрализующие антитела могут все еще увеличиваться после второй дозы, что предположительно отражет расширенное созревание аффинности. Преимущество второй дозы гомологичной вакцины в отношении гуморального S-специфического иммунного ответа на SARS-CoV-2 также наблюдалось у кроликов, иммунизированных теми же вакцинами на основе Ad26, что подтверждает клинические данные авторов настоящего изобретения (Sadoff, le Gars, NEJM в печати). Планируется исследование предпочтительности двухдозовой схемы для повышения эффективности вакцины.

Важно отметить, что вторая доза Ad26.S или Ad26.dTM.PP увеличивала защиту от вирусной нагрузки в легких после заражения по сравнению с низкой защитой, которая обеспечивается при однократной вакцинации хомяков этими вакцинами-прототипами. Напротив, вторая доза Ad26.COV2.S не увеличивала и без того высокий уровень эффективности, установленный однократной дозой. Полученный результат был подтвержден корреляционным анализом авторов настоящего изобретения, в котором вероятность защиты увеличивалась с более высоким титром антител, а при достижении определенного титра антител вероятность защиты увеличивалась только умеренно. Такая обратная корреляция антител и защиты легких подтвердило предыдущее исследование на животных NHP авторов настоящего изобретения на этой модели сирийского хомяка SARS-CoV-2-D614G и не зависело от вакцины, уровня дозы или схемы вакцинации. Для корреляции S-специфического гуморального иммунитета с защитой у людей необходимо дальнейшее изучение, как только будут доступны данные об

эффективности и можно будет разрабатывать вакцины против COVID-19 следующего поколения и другие разрабатываемые вакцины.

Кроме защиты от COVID-19 иммунитет, вызванный вакциной, в идеале также защищает от бессимптомной инфекции, а также от передачи вируса за счет снижения вирусной нагрузки в верхних дыхательных путях. Как видно на других животных моделях SARS-CoV-2 и других респираторных вирусных инфекциях, верхние дыхательные пути труднее защитить от вирусной инфекции и выделения вируса в среду за счет родственной иммунизации.

В данной модели заражения хомяков авторы настоящего изобретения наблюдали высокие уровни репликативно-способного вируса в носовых раковинах, несмотря на использованную низкую дозу вирусного инокулята, что согласуется с наблюдением, что замена шиповидного белка D614G увеличивает инфекционность SARS-CoV-2 в верхних дыхательных путях зараженных хомяков. Поскольку доза заражения мала, маловероятно, что вирусная нагрузка в носовых раковинах, обнаруженная через 4 дня, связана с исходным инокулятом. Для снижения вирусной нагрузки в тканях носа потребовалось введение двух доз вакцины независимо от используемой вакцины. Две дозы Ad26.COV2.S оказались единственной схемой, в которой также снижались титры вируса в мазках из горла. Снижение виремии в верхних дыхательных путях оказалось ограниченным по сравнению с нижними дыхательными путями, в отличие от исследований на модели NHP авторов настоящего изобретения, в котором они наблюдали почти полное снижение назальной вирусной нагрузки. Полученный результат можно объяснить различием в восприимчивости носового эпителия к репликации вируса или потенциально разным составом иммунных клеток, присутствующих в дыхательных путях у хомяков и приматов, и различной индукцией местного иммунитета верхних дыхательных путей с использованием Ad26. Способность иммунитета, вызванного Ad26.COV2.S, защитить от бессимптомной инфекции и передачи SARS-CoV-2 планируется исследовать в ходе будущих исследований на животных и на основании данных об испытаниях на людях.

Предыдущие исследования вакцин-кандидатов против SARS-CoV и MERS свидетельствовали о том, что заболевание может усугубляться определенными иммунными реакциями, вызванными вакцинами. Однако ни о VAERD, ни об усилении заболевания, опосредованного антителами, не сообщалось после

вакцинации вакцинами-кандидатами против SARS-CoV-2 в доклинических моделях на животных или в ходе текущих клинических исследований, включая отчеты об исследованиях эффективности вакцин на основе иРНК и других аденовирусных векторов или цельных инактивированных вакцин фазы 3. Тем не менее, эффективность вакцины в ходе клинических исследований до настоящего момента была высокой, и вследствие теоретической возможности развития VAERD необходимо дальнейшее изучение, прежде всего в условиях индуцированного субоптимального иммунитета. Поэтому авторы настоящего изобретения оценивали способность Ad26.COV2.S вызывать предрасположенность к VAERD в условиях, когда уровни антител, индуцированных вакциной, являются недостаточными для предотвращения репликации вируса в легких, поскольку животным вводили только низкую дозу Ad26.COV2.S. Важно отметить, что даже в условиях недостаточного иммунитета, не предотвращающего репликацию вируса в легких, показатели гистопатологии нижних дыхательных путей иммунизированных животных не выявляли признаки VAERD по сравнению с контрольной группой. Наоборот, у большинства инфицированных животных после вакцинации по-прежнему наблюдалась сниженная гистопатология по сравнению с контрольными животными. Полученные результаты позволяют предположить минимальность теоретического риска развития предрасположения Ad26.COV2.S к VAERD.

Исследование авторов настоящего изобретения подтверждает, что вакцина-кандидат Ad26.COV2.S обладает высокой иммуногенностью и может защитить хомяков от заражения вариантом 614G вируса SARS-CoV-2. Превосходная эффективность Ad26.COV2.S и отсутствие данных о развитии к предрасположенности к развитию VAERD, подтверждают его непрерывную оценку в ходе текущих клинических испытаний фазы 3 по схемам однократной и двухдозовой вакцинации.

Пример 30

Иммуногенность вакцины Ad26.COV2.S против COVID-19 у людей

В рамках рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования фазы 1 Ad26.COV2.S (см. также примеры 23, 24 и 27) 25 участников были зарегистрированы в едином клиническом центре для тщательной оценки иммуногенности этой вакцины. В данном примере описана кинетика и величина гуморального и клеточного

иммунного ответа, вызванного однократным и двукратным введением Ad26.COV2.S.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Данное исследование проводили как часть (когорта 1b) многоцентрового, рандомизированного, двойного слепого, плацебо-контролируемого исследования фазы 1/2a для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности Ad26.COV2.S при внутримышечном введении (IM) в дозе $5x10^{10}$ или $1x10^{11}$ вч в виде однократной или двукратной вакцинации с интервалом в 56 дней у здоровых взрослых. В когорту 1a включали взрослых в возрасте 18–55 лет (n = 375) и основное внимание уделяли сбору первичных результатов безопасности и иммуногенности. Когорта 1b (указанная в данном контексте) также включала взрослых в возрасте 18–55 лет (n = 25), но включала два дополнительных визита и увеличение количества образцов сыворотки, плазмы и мононуклеарных клеток периферической крови для получения исследуемых конечных параметров. В группу 3 (n = 375) включали участников в возрасте > 65 лет и тестировали схемы, аналогичные схемам в когорте 1. Участников группы 1b регистрировали в одном месте в Медицинском центре Beth Israel Deaconess в Бостоне, Массачусетс. Протокол был одобрен Институциональным наблюдательным советом BIDMC и зарегистрирован на сайте ClinicalTrials.gov (NCT04436276).

Участники исследования

Возраст пригодных участников составлял 18–55 лет (включительно) и они характеризовались отрицательным результатом теста на инфекцию SARS-CoV-2 по результатам скрининга носоглоточной ПЦР и тестирования сывороточного иммуноглобулина. Пригодные участники характеризовались также индексом массы тела (ИМТ) ≤30,0 кг/м^2 и хорошим состоянием здоровья по клинической оценке исследователя, что подтверждалось историей болезни, физическим осмотром, клиническими лабораторными оценками и жизненно важными показателями, выполненными при скрининге, и не страдали от сопутствующих заболеваний, связанных с повышенным риском тяжелого течения COVID-19. Участники, способные к деторождению, должны были использовать высокоэффективные средства контрацепции, а также исключали участников, беременных или кормящих грудью. Участников исключали, если они в текущее время работали по профессии с высоким риском заражения SARS-CoV-2 или

считались, по усмотрению исследователя, подверженными повышенному риску заражения COVID-19 по любой другой причине. Все участники давали письменное информированное согласие и успешно сообщили о завершении оценки понимания перед началом процедур исследования. Полные критерии приемлемости описаны в протоколе исследования.

Рандомизация и маскирование

Рандомизацию выполняли с использованием интерактивной системы веб-ответов (IWRS) внутри блоков. Спонсор, клинический персонал, исследователи, участники и лабораторный персонал не были информированы о назначении. Спонсор и статистики были включены слепым методом в группы для промежуточного анализа, когда все участники завершили визит в день 29 или завершили испытания раньше. Фармацевт, несущий основную ответственность за получение и выдачу исследуемого продукта, был осведомлен о распределении по группам. Для сохранения слепого метода участникам (ему/ей) устанавливали устройство для шприцов.

Продукт исследования

Ad26.COV2.S представлял собой рекомбинантный, неспособный к репликации вектор Ad26, кодирующий полноразмерный и стабилизированный S-белок SARS-CoV-2, полученный из первого клинического изолята штамма Wuhan (Wuhan, 2019, последовательность полного генома NC_045512), как описано в данном контексте. Ad26.COV2.S поставляли в концентрации 1×10^{11} вч/мл в виде суспензии в одноразовых флаконах с экстрагируемым объемом 0,5 мл. Буферный раствор для препарата содержал 15 мМ цитрат, 5% (мас./мас.) гидроксипропил-β-циклодекстрин, 0,4% (мас./мас.) этанол, 0,03% (мас./мас.) полисорбат 80, 75 мМ NaCl, pH 6,2 и раствор плацебо в 0,9% NaCl. Для осуществления слепого метода всем участникам вводили одинаковый объем (1 мл). Исследуемую вакцину вводили внутримышечно (IM) в дельтовидную мышцу, предпочтительно в недоминирующую руку. Плацебо состояло из 1 мл 0,9% раствора NaCl.

Оценка безопасности

Сообщенные АЕ, собранные в дневнике, регистрировали для каждой вакцинации с момента вакцинации до 7 дней после вакцинации. Все другие несообщенные АЕ и особые зарегистрированные ситуации, как серьезные, так и несерьезные, были зарегистрированы для каждой вакцинации с момента

вакцинации до 28 дней после вакцинации (данные после второй вакцинации не приведены в данном контексте). Несообщенные AE с датой начала вне временных рамок, определенных выше (> 28 дней после предыдущей вакцинации в исследовании), которые продолжаются в день последующей вакцинации, были зарегистрированы как таковые. Все SAE и AE, которые приводили к прекращению участия в исследовании/вакцинации (независимо от причинно-следственной связи), регистрировали для всех участников с момента первой вакцинации до завершения последней процедуры участника, связанной с исследованием, которая может включать контактирование для последующего наблюдения за безопасностью. За всеми AE наблюдали до разрешения или до клинической стабилизации. Создавали внутренний комитет по обзору данных (DRC), состоящий из членов, которые не принимают непосредственного участия в проведении исследования, управлении данными или статистическом анализе, который будет контролировать данные, чтобы обеспечить постоянную безопасность участников, включенных в это исследование.

Объем выборки и статистический анализ

Формальную статистическую гипотезу безопасности или иммуногенности не проверяли. Количество участников для этого исследования выбирали таким образом, чтобы обеспечить предварительную оценку безопасности и иммуногенности. Реципиенты плацебо включали для проведения слепого метода и оценки безопасности, а также для предоставления дополнительных контрольных образцов для анализов иммуногенности. Полный набор для анализа (FAS) включал всех участников, у которых зарегистрировано хотя бы одно введение вакцины. Популяция иммуногенности согласно протоколу (PPI) включала всех рандомизированных и вакцинированных участников, для которых присутствовали данные об иммуногенности, за исключением участников с серьезными отклонениями от протокола, которые могут повлиять на результаты иммуногенности. Кроме того, образцы, полученные после пропущенных вакцинаций, или участники с естественной инфекцией, возникшей после скрининга (по возможности), были исключены из набора для анализа. Официальная статистическая проверка данных по безопасности не планировалась. Данные по безопасности были проанализированы описательно по вакцинированным группам. Формальную гипотезу об иммуногенности не проверяли. Описательную статистику рассчитывали для непрерывных

иммунологических параметров во все доступные моменты времени. Анализы иммуногенности проводили на популяции PPI. Анализ иммунологических данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.4.2 (программное обеспечение GraphPad). Сравнение данных между группами проводили с использованием двусторонних критериев Манна-Уитни. Корреляции оценивали с использованием двусторонних критериев ранговой корреляции Спирмена. Значение P менее 0,05 считали значимым.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

S- и RBD-специфические связывающие антитела оценивали в основном с использованием ИФА, как описано в статье (Chandrashekar и др., Science. т. 369, сс. 812-817 (2020), Yu и др., Science. т. 369, сс. 806-811 (2020)). Краткое описание метода: на 96-луночные планшеты наносили 1 мкг/мл S белка SARS-CoV-2 или 2 мкг/мл белка RBD SARS-CoV-2 в 1X DPBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации планшеты однократно промывали буферным раствором для промывки (0,05% Твин 20 в 1 x DPBS) и блокировали 350 мкл казеинового блокирующего раствора на лунку в течение 2–3 ч при комнатной температуре. После инкубации блокирующий раствор удаляли, а планшеты вытирали насухо. Серийные разведения инактивированной нагреванием сыворотки, разбавленной в казеиновом блокирующем растворе, добавляли в лунки и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед тремя дополнительными промывками и 1-часовой инкубацией с разведением 1:4000 конъюгата античеловеческого IgG HRP (Invitrogen) при комнатной температуре в темноте. Затем планшеты трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора SeraCare KPL TMB SureBlue Start, реакцию в планшете останавливали добавлением 100 мкл раствора SeraCare KPL TMB Stop на лунку. Поглощение при 450 нм со стандартом при 650 нм регистрировали с использованием ридера для считывания микропланшетов VersaMax. Для каждого образца конечный параметр титра ИФА рассчитывали в программном обеспечении Graphpad Prism с использованием четырехпараметрической логистической кривой, подобранной для расчета обратного разведения сыворотки, что приводит к получению скорректированного значения поглощения (450–650 нм) 0,2. Приведены ожидаемые результаты титров в форме Log_{10}. Анализ ИФА проводили и

квалифицировали для человеческой сыворотки в Центре вирусологии и исследований вакцин при Медицинском центре Beth Israel Deaconess.

Анализ нейтрализации псевдовирусов (psVNA)

Псевдовирусы SARS-CoV-2, экспрессирующие репортерный ген люциферазы, получали с использованием подхода, аналогичного описанному ранее (Chandrashekar и др., Science. т. 369, сс. 812-817 (2020), Yu и др., Science. т. 369, сс. 806-811 (2020)). Краткое описание метода: пакующий конструкт psPAX2 (AIDS Resource and Reagent Program), репортерную плазмиду люциферазы pLenti-CMV Puro-Luc (Addgene) и шиповидный белок, экспрессирующий pcDNA3.1-SARS-CoV-2 SΔCT, совместно трансфектировали в клетки HEK293T с липофактамином 2000 (ThermoFisher Scientific). Супернатанты, содержащие вирусы псевдотипа, собирали через 48 ч после трансфекции, вирусы псевдотипа очищали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для определения нейтрализующей активности антисыворотки вакцинированных животных клетки HEK293T-hACE2 высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур при плотности $1{,}75\times10^4$ клеток/лунка в течение ночи. Готовили трехкратные серийные разведения образцов сыворотки, инактивированной нагреванием, и смешивали с 50 мкл псевдовируса. Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч перед добавлением к клеткам HEK293T-hACE2. Через 48 ч клетки лизировали в системе Steady-Glo Luciferase Assay (Promega) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Титры нейтрализации SARS-CoV-2 определяли как разведение образца, при котором наблюдалось 50% снижение RLU по сравнению со средним значением для контрольных лунок с вирусом. Анализ psVNA разрабатывали и квалифицировали для человеческой сыворотки в Центре вирусологии и исследований вакцин при Медицинском центре Beth Israel Deaconess.

Анализ нейтрализации Ad26

Клетки карциномы легкого человека A549 высевали в 96-луночные планшеты за день до инфицирования при плотности 1×10^4 клеток на лунку. Репортерный вирус rAd26.Luc с делецией E1/E3, неспособный к репликации, смешивали с 3-кратными серийными разведениями термоинактивированной сыворотки человека, а затем наносили на клетки A549 при множественности заражения (MOI) 500. Через 24 ч после заражения активность люциферазы в

клетках измеряли с использованием системы реагентов Steady-Glo Luciferase Reagent System (Promega, Madison, WI). Титры нейтрализации определяли как максимальное разведение сыворотки, в котором наблюдалась нейтрализация 90% активности люциферазы. Анализ нейтрализации Ad26 разрабатывали для человеческой сыворотки в Центре вирусологии и исследований вакцин при Медицинском центре Beth Israel Deaconess.

Электрохемилюминесцентный анализ (ECLA)

Планшеты ECLA (MesoScale Discovery SARS-CoV-2 IgG Panel 2, K15369U-2) разрабатывали и получали с 9 пятнами антигена в каждой лунке. Включенными антигенами являлись SARS-CoV-2 S, SARS-CoV-1 S, hCoV-229E S, hCoV-NL63 S, hCoV-OC43 S и hCoV-HKU1 S. Планшеты блокировали 50 мкл раствора для блокировки Blocker A в течение по меньшей мере 30 мин при комнатной температуре при встряхивании со скоростью 700 об/мин на цифровом шейкере для микропланшетов. Во время блокировки сыворотку разбавляли 1:5000 в растворе Diluent 100. Затем планшеты промывали 3 раза 150 мкл буферного раствора для промывки из набора MSD, сушили промоканием, в планшеты добавляли 50 мкл разведенных образцов в двух повторах и встряхивали при 700 об/мин при комнатной температуре по меньшей мере 2 ч. Планшеты снова промывали 3 раза и в каждую лунку добавляли 50 мкл SULFO-меченого антитела для обнаружения IgG человека, разбавленного до 1x в растворе Diluent 100, и инкубировали при встряхивании при 700 об/мин при комнатной температуре в течение по меньшей мере 1 часа. Затем планшеты промывали 3 раза и в каждую лунку добавляли 150 мкл раствора MSD GOLD Read Buffer B, после чего планшеты сразу же считывали с использованием устройства MESO QuickPlex SQ 120. Титры MSD для каждого образца приведены в виде относительных световых единиц (RLU), которые рассчитывали как RLU образца минус RLU контроля для каждого пятна для каждого образца. Предел обнаружения определяли как 1000 RLU для каждого анализа.

IFN-γ иммуноферментный анализ пятен (ELISPOT)

На планшеты ELISPOT наносили мышиные моноклональные антитела против IFN-γ человека фирмы MabTech при концентрации 1 мкг/лунка в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали DPBS и блокировали средой R10 (RPMI с 10% инактивированной нагреванием FBS, содержащей 1% 100x пенициллина-

стрептомицина, 1M HEPES, 100 мМ пирувата натрия, 200 мМ L-глутамина и 0,1% 55 мМ 2-меркаптоэтанола) в течение 2-4 ч при 37°C. Фракции пептидов Spike 1 и Spike 2 содержали 15-членные пептиды, перекрывающиеся по 11 аминокислотам, которые охватывают последовательность белка и отражают N- и C-концевые половины белка, соответственно. Пептидные фракции Spike 1 и Spike 2 готовили в концентрации 2 мкг/лунка, и в планшет добавляли 200000 клеток/лунка. Пептиды и клетки инкубировали в течение 15-20 ч при 37°C. Все этапы после данной инкубации выполняли при комнатной температуре. Планшеты промывали буферным раствором ELISPOT и инкубировали в течение 2-4 ч с биотинилированным мышиным моноклональным антителом против IFN-γ человека фирмы MabTech (1 мкг/мл). Планшеты промывали второй раз и инкубировали в течение 2-3 ч с конъюгированными с щелочной фосфатазой моноклональными антителами против биотина фирмы Vector Laboratories (1,33 мкг/мл). После окончательной промывки добавляли раствор субстрата нитор-синий тетразолия хлорид/5-бром-4-хлор-3'-индолифосфат пара-толудиновой соли (хромаген NBT/BCIP) в течение 7 мин. Хромаген удаляли, планшеты промывали водой и сушили в темном месте в течение 24 ч. Планшеты сканировали и считывали с использованием анализатора Immunospot Analyzer фирмы Cellular Technologies Limited. Анализ IFN-γ ELISPOT разрабатывали и квалифицировали для человеческой сыворотки в Центре вирусологии и исследований вакцин при Медицинском центре Beth Israel Deaconess.

Анализ IL-4 ELISPOT

На планшеты ELISPOT наносили моноклональные антитела IL4-I фирмы MabTech в количестве 1,5 мкг/лунка в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 1x PBS и блокировали средой R10 (RPMI с 10% инактивированной нагреванием FBS, содержащей 1% 100x пенициллина-стрептомицина, 1M HEPES, 100 мМ пирувата натрия, 200 мМ L-глутамина и 0,1% 55 мМ 2-меркаптоэтанола) в течение 30 мин – 4 ч. Пептидные фракции Spike 1 и Spike 2 готовили в концентрации 2 мкг/лунка и добавляли 200000 клеток/лунка. Пептиды и клетки инкубировали в течение 18-48 ч при 37°C. Все этапы после данной инкубации проводили при комнатной температуре. Планшеты промывали 1x PBS и инкубировали в течение 2 ч с биотинилированными моноклональными антителами IL4-II фирмы MabTech (1 мкг/лунка). Планшеты промывали второй раз и инкубировали в течение 1 ч со стрептавидин-щелочной

фосфатазой фирмы MabTech (1:1000). После окончательной промывки добавляли раствор субстрата нитор-синий тетразолия хлорид/5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат пара-толудиновой соли (хромаген NBT/BCIP) в течение 12-15 мин. Хромаген удаляли, планшеты промывали водой и сушили в темном месте в течение 24 ч. Планшеты сканировали и считывали с использованием анализатора Immunospot Analyzer фирмы Cellular Technologies Limited. Анализ IL-4 ELISPOT разрабатывали и квалифицировали для человеческой сыворотки в Центре вирусологии и исследований вакцин при Медицинском центре Beth Israel Deaconess.

Анализ окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS)

10^6 PBMC на лунку повторно суспендировали в 100 мкл среды R10 с добавлением моноклональных антител против CD28, CD49d (1 мкг/мл). Каждый образец оценивали с имитацией плацебо (100 мкл R10 плюс 0,5% ДМСО, фоновый контроль), пептидными фракциями (2 мкг/мл) или 10 мкг/мл ацетата форболмиристата (PMA) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich) (100 мкл; положительный контроль) и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После инкубации в каждую лунку добавляли 0,25 мкл GolgiStop и 0,25 мкл GolgiPlug в 50 мкл R10 и инкубировали при 37°C в течение 8 ч, а затем выдерживали при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки дважды промывали DPBS, окрашивали красителем Aqua live/dead (Life Technologies) в течение 10 мин, а затем окрашивали предварительно определенными титрами mAb против CD279 (клон EH12.1, BB700, BD Pharmingen), CD4 (клон L200, BV711, BD), CD27 (клон M-T271, BUV563, BD Pharmingen), CD8 (клон SK1, BUV805, BD), CD45RA (клон 5H9, APC H7, BD) в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали 2% буферным раствором FBS/DPBS и инкубировали в течение 15 мин с 200 мкл раствора BD CytoFix/CytoPerm Fixation/Permeabilization. Клетки дважды промывали 1X Perm Wash буферным раствором (BD Perm/WashTM Buffer 10X в наборе CytoFix/CytoPerm Fixation/Permeabilization, разбавленным водой MilliQ и пропущенным через фильтр 0,22 мкм) и окрашивали внутриклеточно моноклональными антителами против Ki67 (клон B56, Alexa488, BD), IL21 (клон 3A3-N2.1, PE, BD Pharmingen), CD69 (клон TP1.55.3, ECD, Beckman Coulter), IL10 (клон JES3-9D7, PE CY7, Biolegend), IL13 (клон JES10-5A2 , BV421, BD Pharmingen), IL4 (клон MP4-25D2. BV605, Biolegend), TNF-α (клон Mab11, BV650, BD), IL17 (клон N49-653, BV750, BD), IFN-γ (клон B27; BUV395, BD),

IL2 (клон MQ1-17H12, BUV737, BD Pharmingen), IL6 (клон MQ2-13A5, APC, BD), CD3 (клон SP34.2, Alexa 700, BD), в течение 30 мин. Клетки дважды промывали 1X Perm Wash буферным раствором и фиксировали 250 мкл свежеприготовленного 1,5% формальдегида. Фиксированные клетки переносили в 96-луночный круглодонный планшет и анализировали в системе BD FACSymphony. Анализ ICS разрабатывали для человеческой сыворотки в Центре вирусологии и исследований вакцин при Медицинском центре Beth Israel Deaconess.

Полученные результаты

Содержание исследования

Двадцать восемь участников обследовали в период с 27 июля 2020 г. по 7 августа 2020 г. в Медицинском центре Beth Israel Deaconess в Бостоне, Массачусетс. Два участника не соответствовали требованиям из-за положительного диагностического теста на SARS-CoV-2 при скрининге, а один не соответствовал требованиям из-за индекса массы тела> 30 кг/м^2. Двадцать пять участников рандомизировали и им вводили по меньшей мере одну дозу вакцины или плацебо. Участников рандомизировали в одну из пяти экспериментальных групп (N=5/группа): (i) 5×10^{10} вч Ad26.COV2.S (низкая доза, LD) в день 1 и 57 (LD/LD), (ii) LD на 1-й день и плацебо на 57-й день в виде однократной вакцины (LD/PL), (iii) 1×10^{11} вч Ad26.COV2.S (высокая доза, HD) на 1-й и 57-й день (HD/HD), (iv) HD на 1-й день и плацебо на 57-й день в виде однократной вакцины (HD/PL), или (v) плацебо в день 1 и день 57 (PL/PL). Данные по безопасности этих 25 участников описаны отдельно (Sadoff и др., New Engl. J. Med., в печати).

Кинетика и величина ответов связывания и нейтрализации антител

К 8-му дню после иммунизации связывающие антитела наблюдали у 65% (13 из 20) реципиентов вакцины против полноразмерного шиповидного белка (S) (фиг. 136A, P = 0,0194, двусторонний критерий Манна-Уитни) и у 90% (18 из 20) реципиентов вакцины против рецептор-связывающего домена (RBD) (фиг. 136B, P = 0,0033, двусторонний критерий Манна-Уитни методом ИФА. Для вируснейтрализующих антител также наблюдали тенденцию на 8-й день у 25% (5 из 20) реципиентов вакцины (фиг. 136C) методом анализа нейтрализующих псевдовирус антител (psVNA) на основе люциферазы (5-7). Полученные данные

свидетельствуют о быстрой индукции ответов связывания и нейтрализации антител после вакцинации людей Ad26.COV2.S.

К 15 дню S-специфические и RBD-специфические связывающие антитела наблюдали у 100% (20 из 20) реципиентов вакцины (фиг. 137A), а нейтрализующие антитела наблюдали у 85% (17 из 20) реципиентов вакцины (фиг. 137B). Связывающие и нейтрализующие антитела продолжали увеличиваться в дни 29, 57 и 71. В дни 57 и 71 у 100% (20 из 20) реципиентов вакцины были обнаружены нейтрализующие антитела, а также S- и RBD-специфические связывающие антитела. В день 71 средние геометрические титры (GMT) S-специфических связывающих антител составляли 2432, 3249, 5729, 2852 и 20, GMT RBD-специфических связывающих антител составляли 1018, 2023, 3666, 2372 и 21, а GMT нейтрализующих антител составляли 242, 375, 449, 387 и 13 в группах LD/LD, LD/PL, HD/HD, HD/PL и PL/PL соответственно (фиг. 137A, B). В совокупности полученные данные свидетельствуют о быстрой кинетике и стабильной величине ответов связывающих и нейтрализующих антител после однократного и двухкратного введения Ad26.COV2.S. В группах с однократной инъекцией сохранение и усиление ответа антител в течение 71-го дня предполагает устойчивость этих ответов.

Вторая иммунизация в день 57 приводила к повышению титров связывающих антител в среднем в 2,56 раза (диапазон 1,58-3,04) и титров нейтрализующих антител в среднем в 4,62 раза (диапазон 3,56-5,68) в группах LD/LD и HD/HD в день 71 аналогично предыдущим результатам (см. пример 27). Тем не менее, общие GMT в группах двухкратной вакцинации оказались сопоставимыми с GMT в группах однократной вакцины в день 71, что возможно отражает небольшое количество участников в каждой группе и тот факт, что группы LD/LD и HD/HD перед вакцинацией содержали два человека с низким ответом на вакцинацию. В группе HD/HD наблюдали тенденцию к более высокому уровню связывающих и нейтрализующих антител по сравнению с группой LD/LD. Иммунологический ответ на повторную иммунизацию также проявлялся увеличением нейтрализующих антител, специфичных к вектору Ad26, в группах LD/LD и HD/HD в день 71 (фиг. 127B).

Титры S-специфических и RBD-специфических связывающих антител в день 29 строго коррелировали друг с другом ($P<0,0001$, $R=0,9838$, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена, фиг. 138), и оба коррелировали с

титрами нейтрализующих антител в день 29 (P<0,0001, R=0,8809 и P<0,0001, R=0,8604, соответственно, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена, фиг. 138). Полученные данные свидетельствуют о том, что антитела, вызванные вакциной, обычно связывают как S, так и RBD, и обладают надежной способностью нейтрализовать вирус.

Для оценки специфичности ответа антител на SARS-CoV-2 авторы настоящего изобретения использовали электрохемилюминесцентный анализ (ECLA, Meso Scale Discovery SARS-CoV-2 IgG Panel 2, K15369U-2). Авторы настоящего изобретения оценивали реактивность в отношении полноразмерных S-белков SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, CoV-229E, CoV-HKU1, CoV-NL63 и CoV-OC43. Вакцинация Ad26.COV2.S индуцировала S-специфические антитела против SARS-CoV-2 по данным анализа ECLA (фиг. 139A), которые были сопоставимы с результатами ИФА (фиг. 137A). Наблюдали также перекрестно реактивные антитела на S белок SARS-CoV-1 примерно в 10 раз меньшей величины по сравнению с SARS-CoV-2 (фиг. 139A). Высокие фоновые уровни антител наблюдали на исходном уровне для S белков коронавирусов, простуду CoV-229E, CoV-HKU1, CoV-NL63 и CoV-OC43, без явного увеличения этих ответов после вакцинации (фиг. 139B). Полученные данные свидетельствовали о том, что Ad26.CoV.S вызывал низкие уровни перекрестно-реактивных антител против SARS-CoV-1, но минимальные уровни или отсутствие антител против более отдаленно связанных с простудой CoV.

Клеточные иммунные реакции

Авторы настоящего изобретения оценивали S-специфические клеточные иммунные ответы с использованием анализов IFN-γ и IL-4 ELISPOT в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) всех участников, а также с использованием многопараметрических анализов окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS) у подгруппы участников с достаточным количеством PBMC. Ответы ELISPOT IFN-γ наблюдали у 65% (13 из 20) реципиентов вакцины в день 15 и у 84% (16 из 19) реципиентов вакцины в день 71 без явных различий в клеточных иммунных ответах между группами (фиг. 140A). Реакции IL-4 отсутствовали, что указывало на сильно смещенный TH1 клеточный иммунный ответ. Многопараметрические анализы ICS подтвердили индукцию T клеточных ответов CD27+ CD45RA-CD4+ и CD8+ центральной памяти у всех исследованных реципиентов вакцины, кроме одного (фиг. 140B).

Ответы ELISPOT IFN-γ коррелировали с титрами S-специфических связывающих антител, титрами RBD-специфических связывающих антител и титрами нейтрализующих антител в день 29 (P = 0,0045, R = 0,5492, P = 0,0056, R = 0,5378, и P = 0,0031, R=0,5676 соответственно, двусторонний критерий ранговой корреляции Спирмена, фиг. 141).

Обсуждение и выводы

Авторы настоящего изобретения приводят в данном контексте подробный иммунологический анализ 25 человек, которым вводили Ad26.COV2.S или плацебо по различным схемам в клиническом испытании фазы 1. В целом, иммуногенность сопоставима с 810 индивидуумами в исходном исследовании (см. пример 27 и статью Sadoff и др., New Engl. J. Med., в печати). Авторы настоящего изобретения дополнили предыдущие результаты при демонстрации быстрой индукции антител через одну неделю после вакцинации, при этом RBD-специфические связывающие антитела обнаруживались у 90% реципиентов вакцины в день 8. Полученные данные свидетельствуют о том, что Ad26.COV2.S индуцирует быстрый и комплексный гуморальный ответ с вероятной стабильностью, а также клеточными иммунными ответами после однократной иммунизации.

Основная гипотеза большинства текущих программ вакцинации против COVID-19 заключается в том, что антитела против S-белка SARS-CoV-2 обладают защитным действием. Поэтому большинство программ сосредоточено на стратегиях, которые индуцируют вирусспецифические нейтрализующие антитела, но возможно, что другие функции антител также могут способствовать защите. Связывающие, нейтрализующие и функциональные ненейтрализующие антитела коррелируют с защитной эффективностью после вакцинации ДНК и Ad26 у макак резус (Mercado и др., Nature, т. 586, сс. 583-588 (2020), Yu и др., Science, т. 369, сс. 806-811 (2020)). Недавно авторы настоящего изобретения показали, что адаптивный перенос очищенного IgG от выздоравливающих макак защищал макак, не подвергавшихся заражению SARS-CoV-2, дозозависимым образом (Chandrashekar и др., Science, т. 369, сс. 812-817 (2020), McMahan и др., Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques, Nature (2020)). Титры S-специфических связывающих антител 400, титры RBD-специфических связывающих антител, равные 100, и титры нейтрализующих антител, равные 50, представляли собой пороговые значения для защиты в этой доклинической

модели, но корреляты защиты от инфекции или заболевания COVID-19 у людей еще не определены. Тем не менее следует отметить, что титры антител, индуцированные Ad26.COV2.S у людей (фиг. 137), существенно превышали эти ранее определенные пороговые значения с использованием по существу тех же анализов. Ответ Т клеток также способствовала защите, особенно в условиях ослабевающего или пограничного ответа антител.

Быстрая, эффективная и стабильная индукция разнообразных функциональных ответов антител может представлять собой решающее значение для вакцины против COVID-19. Ad26.COV2.S характеризуется высокой иммуногенностью после однократной иммунизации и не требует холодовой цепи при температуре ниже нуля, что может обеспечить существенные логистические и практические преимущества для кампаний массовой вакцинации.

В день 8 после начальной иммунизации связывающие антитела быстро выявлялись у большинства реципиентов вакцины, а нейтрализующие антитела наблюдали у части лиц. Связывающие и нейтрализующие антитела выявляли у 100% реципиентов в день 57 после однократной иммунизации. Полученные данные свидетельствуют о том, что Ad26.COV2.S индуцирует ответы антител с быстрой кинетикой, а также клеточные иммунные ответы. В настоящее время проводятся двухфазные клинические испытания фазы 3 для определения эффективности вакцины Ad26.COV2.S у людей.

Пример 31

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 3 по оценке эффективности и безопасности Ad26.COV2.S для профилактики COVID-19, опосредованного SARS-CoV-2, у взрослых в возрасте 18 лет и старше (совокупность)

Данное исследование представляет собой продолжающееся рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое, основное исследование эффективности, безопасности и иммуногенности фазы 3, проводимое в Северной, Центральной и Южной Америке и Южной Африке у взрослых в возрасте от ≥18 до <60 лет (стадия 1) и ≥60 лет (стадия 2), страдающих или не страдающих от сопутствующих заболеваний, связанных с повышенным риском прогрессирования тяжелой формы COVID-19. У участников, проживающих или посещающих места с высоким риском заражения инфекцией SARS CoV 2, оценивали эффективность, безопасность и

иммуногенность однократной дозы Ad26.COV2.S. Удовлетворительное представление возраста и наличия/отсутствия сопутствующих заболеваний в исследуемой популяции достигали за счет стратификации при рандомизации. Также для обеспечения удовлетворительного представительства с точки зрения расы, этнической принадлежности и пола предпринимали специальные меры. Второстепенные цели включали демонстрацию эффективности однократной дозы Ad26.COV2.S 5×10^{10} вч для профилактики молекулярно подтвержденного, умеренной или тяжелой/критической формы COVID-19 с началом не менее 14 дней и не менее 28 дней после вакцинации, по сравнению с плацебо, у серонегативных взрослых по SARS-CoV-2. Другие основные ожидаемые результаты включали эффективность вакцины для профилактики тяжелого/критического течения COVID-19 (включая летальные исходы и медицинские вмешательства), эффективность для предотвращения всех симптоматических случаев COVID-19 (включая легкую, среднюю и тяжелую/критическую форму заболевания, как оценивали с поправкой на тяжесть заболевания с использованием взвешенного анализа BOD) и эффективность у взрослых ≥60 лет.

В данном примере описана эффективность Ad26.COV2.S, оцененная в данном исследовании фазы 3. При проведении данного крупного основного исследования эффективности в нескольких странах была показана эффективность вакцины при профилактике COVID-19 средней и тяжелой/критической формы у взрослого этнически и географически разнообразного населения.

Первоначальный запланированный объем выборки в 60 000 участников был рассчитан на оперативную дату отсечения до начала исследования на основе неопределенности эпидемиологической ситуации в сочетании с возможностью обеспечить высокую вероятность (приблизительно 90%) достижения времени подачи сигнала в течение 8 месяцев после исследования для вакцины с предполагаемой эффективностью вакцины на уровне 60%. Объем выборки был сокращен примерно до 40 000 участников после того, как стало очевидно, что заболеваемость COVID-19 значительно выше, чем первоначально предполагалось в начале исследования.

Идентификацию и молекулярное подтверждение инфекции SARS-CoV-2 и симптоматического COVID-19 выполняли на протяжении всего исследования,

как описано в протоколе клинического исследования. Для анализа случая идентификации использовали молекулярное подтверждение инфекции SARS-CoV-2 (с использованием анализа Abbott Real Time SARS-CoV-2 RT-PCR [Abbott 2020]), который проводили в центральной лаборатории (University of Washington [UW Virology laboratory]).

Термин «тяжелые/критические случаи COVID-19» означает случаи, оцененные клинически Комитетом по оценке клинической тяжести и признанные тяжелыми/критическими. Классификацию тяжести основывали на наибольшей степени тяжести за период наблюдения. Весь анализ, включая тяжелые/критические случаи, основан на экспертном решении, если не указано иное.

На протяжении всего исследования наблюдали за госпитализациями, связанными с COVID-19, и осложнениями, связанными с COVID-19 (такими как, без ограничения перечисленным, гипервоспалительный синдром, пневмония, неврологические или сосудистые осложнения, тяжелая пневмония, тяжелые неврологические или сосудистые события, острый респираторный дистресс-синдром, почечные осложнения, сепсис, септический шок, смерть (Who 2020).

Основная цель исследования COV3001 состояла в демонстрации эффективности Ad26.COV2.S в предотвращении молекулярно подтвержденного (определенного как положительный результат вирусной РНК SARS-CoV-2 в центральной лаборатории с использованием ПЦР или другого метода молекулярной диагностики) COVID-19 формы от умеренной до тяжелой/критической по сравнению с плацебо у взрослых, серонегативных по SARS-CoV-2.

Полный набор для анализа (FAS) включал всех рандомизированных участников, которым вводили хотя бы одну дозу вакцины.

Набор по протоколу (PP) включал подгруппу FAS, за исключением (i) субъектов с серьезными отклонениями от протокола, влияющими на эффективность, (ii) серопозитивных субъектов на исходном уровне (день 1), (iii) субъектов с ПЦР+ на исходном уровне, если такая информация имелась* (День 1) (*все случаи были проанализированы методом ПЦР в день 1).

Все анализы эффективности проводили с использованием набора PP (по протоколу), если не указано иное. Набор PP включал участников, которым вводили исследуемую вакцину и которые являлись серонегативными на момент

вакцинации и у которых отсутствовали другие серьезные отклонения от протокола, которые, как считается, могли повлиять на эффективность вакцины.

Первичный анализ дополняли анализом подгрупп по возрастной группе (от 18 до <60 лет, ≥60 лет) и наличию сопутствующих заболеваний (да/нет) с использованием описательной сводки, включающей (нескорректированные) 95% ДИ для описания VE в каждой субпопуляции с использованием тех же методов.

В ходе первичного анализа были протестированы следующие вторичные конечные параметры:

- VE по отношению ко всем симптоматическим случаям COVID-19 с началом по меньшей мере через 28 и по меньшей мере через 14 дней после вакцинации, оцененные с использованием конечного параметра (уровень заболеваемости (BOD). Анализ BOD позволяет осуществить оценку VE с поправкой на тяжесть в сравнении с предотвращением симптоматического COVID-19. Более высокие значения присваивали тяжелым инфекциям (тяжелым случаям присваивали 2 балла, а нетяжелым - 1), и, таким образом, конечный параметр BOD обеспечивал более высокую статистическую мощность для дифференциации вакцин от плацебо с повышенной защитой от тяжелых инфекций.

- VE по отношению к тяжелому/критическому течению COVID-19 с началом по меньшей мере через 28 и/или по меньшей мере через 14 дней после вакцинации.

Следующие конечные параметры также были проанализированы с описанием (включая 95% ДИ):

- VE по отношению к COVID-19, требующему медицинского вмешательства, с началом по меньшей мере через 28 и по меньшей мере через 14 дней после вакцинации (должны были быть доступны 23 случая с началом с 29-го и 15-го дня соответственно). COVID-19, требующий медицинского вмешательства (например, комбинированный конечный параметр госпитализации, госпитализация в отделение интенсивной терапии, искусственная вентиляция легких и ECMO, связанные с объективными измерениями, такими как снижение оксигенации, результаты рентгенографии или КТ), определяли на основе данных об использовании медицинских ресурсов, собранных с использованием формы COVID-19 с медицинским обслуживанием.

- VE по отношению ко всем инфекциям SARS-CoV-2 с началом с 29-го дня (> 15000 участников должны были иметь доступный образец на 71-й день).

- VE по отношению к бессимптомным/или невыявленным случаям с началом с 29-го дня (все участники должны были наблюдаться не менее 6 месяцев).

Другие описанные вторичные ожидаемые результаты включали VE по отношению к молекулярно подтвержденному COVID-19 легкой формы и по отношению к COVID-19 в соответствии с согласованным определением случая COVID-19, утвержденным FDA США, анализом подгрупп по возрасту, наличию/отсутствию сопутствующих заболеваний, полу, региону, стране, расе, этнической принадлежности, ВИЧ-статусу и вирусной нагрузке после заражения. Для оценки возможных временных эффектов VE использовали кумулятивные графики заболеваемости с течением времени с использованием методов Каплана-Мейера.

В связи с высокой заболеваемостью COVID-19 в ходе исследования не все случаи были подтверждены центральной лабораторией (UoW) во время проведения первичного анализа. Было зарегистрировано большое количество случаев с симптомами, соответствующими определению случая COVID-19, и как минимум 1 положительным результатом ПЦР из другого источника (местного или центрального). Поэтому первичный анализ дополняли анализом чувствительности, включая случаи хотя бы с одним положительным результатом ПЦР, независимо от источника этого теста. Хотя анализы не являются косвенными, использовали тот же α-уровень, что и для соответствующих косвенных анализов.

Информация об участниках

Всего было рандомизировано 43783 участника (21895 в группе Ad26.COV2.S с дозой $5x10^{10}$ и 21888 в группе плацебо), которым вводили исследуемую вакцину, и 39321 участник (19630 в группе Ad26.COV2.S $5x10^{10}$ и 19691 в группе плацебо), которых включили в набор PP. Данные, представленные в этом разделе, относятся к набору PP.

Ни один из участников набора PP не завершил исследование и 130 (0,3%, (41 (0,2%) участник в группе Ad26.COV2.S $5x10^{10}$ и 89 (0,5%) участников) в группе плацебо) досрочно прекратили исследование, в основном из-за отзыва согласия (30 (0,2%) участников и 62 (0,3%) участников, соответственно). На

момент первичного анализа средний период наблюдения после вакцинации составил 58 дней и 21491 участник группы PP наблюдался не менее 2 месяцев.

Участники исследования, которые получили право на получение разрешенной/лицензированной вакцины против COVID-19, могли запросить открытый доступ к протоколу. До конечной даты 22 января 2021 года 2257 (5,2%) участников получили открытый доступ к разрешенной/лицензированной вакцины против COVID-19 в ходе этого исследования.

Между группой Ad26.COV2.S и группой плацебо не наблюдалось существенных различий в демографических и исходных характеристиках. Рандомизацию стратифицировали по месту проживания, возрасту и наличию/отсутствию сопутствующих заболеваний, и предпринимали усилия для обеспечения удовлетворительной репрезентативности с точки зрения расы, этнической принадлежности и пола:

Основные выводы по демографии исследуемой популяции:

Распределение по возрасту >=60 (33,5%), >=65 (19,6%), >=75 (3,5%), >=80 (1%)

Пол: 45% женщин, 55% мужчин.

Регион: 44% США, 41% Центральная и Южная Америка и 15% Южная Африка.

Раса: 19,5% чернокожих или афроамериканцев (в США 13%).

Исследование включало сопутствующие заболевания (всего 41%, ожирение (28,5%), сахарный диабет 2 типа (7,3%), гипертония (10,3%), ВИЧ (2,8%), а также других участников с ослабленным иммунитетом.

В наборе PP большинство участников происходило из Северной Америки (46,7%), Центральной и Южной Америки (40,6%), остальные участники происходили из Южной Африки (12,7%). В целом 62,1% участников представляло собой белокожее население, а 17,2% - чернокожее население или афроамериканцев, 8,3% представляло собой американских индейцев/коренных жителей Аляски и 3,5% представляло собой выходцев из Азии, 45,1% участников представляло собой испанцев или латиноамериканцев.

В наборе PP 44,5% участников являлись женщинами и 55,5% - мужчинами. Средний возраст составил 53,0 года (диапазон: от 18 до 100 лет). Был достигнут предполагаемый целевой показатель включения в испытания как минимум приблизительно 30% участников в возрасте ≥60 лет и приблизительно

20% участников в возрасте ≥18 до <40 лет, при этом в исследовании участвовало 34,6% участников в возрасте ≥60 лет и 22,2% участников ≥18 до <40 лет. Всего 20,4% и 3,7% участников характеризовались возрастом ≥65 и ≥75 лет, соответственно. Средний индекс массы тела (BMI) составил 26,90 кг/м^2 (диапазон: 2,3, 82,6 кг/м^2).

В полной аналитической выборке (FAS, т. е. все рандомизированные участники с зарегистрированным введением исследуемой вакцины, независимо от возникновения отклонений от протокола и серологического статуса при включении) 9,6% участников являлись серопозитивными по отношению к SARS-CoV-2 на исходном уровне. Таких участников исключали из набора PP.

В целом в наборе PP 39,9% участников страдали от одного или нескольких сопутствующих заболеваний, связанных с повышенным риском прогрессирования тяжелой формы COVID-19 на исходном уровне. Наиболее частые сопутствующие заболевания включали ожирение (27,5%), артериальную гипертензию (10,3%), сахарный диабет 2 типа (7,2%), серьезные сердечные заболевания (2,4%) и астму (1,3%). Другие сопутствующие заболевания присутствовали у <1% участников. ВИЧ-инфекция была зарегистрирована на исходном уровне у 2,5% участников.

Анализ эффективности

Краткое описание анализов эффективности, основанное на количестве случаев COVID-19, произошедших не менее чем через 14 дней и не менее чем через 28 дней после вакцинации, представлено в табл. 1 и табл. 2, соответственно.

В разделах, приведенных ниже, эффективность вакцины описана для подтвержденных случаев COVID-19 у серонегативных участников, если не указано иное. VE не приведены, если для конечного параметра наблюдали <6 случаев,.

В описании, таблицах и рисунках показан ложноположительный контролируемый 95% доверительный интервал (ДИ) (далее именуемый «скорректированный ДИ») при оценке статистической гипотезы (первичные конечные параметры, VE по отношению к любой полностью симптоматической инфекции [BOD] и VE по отношению к тяжелому/критическому COVID-19 и VE по отношению к COVID-19, требующему медицинского вмешательства), в

противном случае приведено краткое описание данных с использованием 95% ДИ.

Для участников с молекулярно подтвержденным COVID-19 время последующего наблюдения определяли как время между вакцинацией и временем возникновения случая. Для всех субъектов без подтвержденного COVID-19 время наблюдения определяли как время с момента вакцинации до последнего доступного измерения (для субъектов, продолжающих участие в исследовании) или прекращения/завершения исследования. Следует отметить, что при анализе последующего наблюдения для всех анализов, за исключением анализа чувствительности, включающего подтвержденные и неподтвержденные случаи, неподтвержденные случаи учитывали как «отсутствие случаев», в таких анализах последующее наблюдение за неподтвержденными случаями определяли как время между вакцинацией и временем положительного ПЦР-теста из любого источника.

Было отмечено, что испытание проводили в разгар пандемии COVID-19 в 8 странах и трех регионах, когда распространение болезни ускорилось во всем мире, что привело к увеличению подверженности людей вирусу, и в то время, когда встречались вновь возникающие штаммы коронавируса, некоторые из которых являлись более заразными (см. фиг. 145).

Таблица 1

TEFSUM01_A: Краткое описание эффективности вакцины по отношению к COVID-19 с началом по меньшей мере через 14 дней после вакцинации, набор PP (исследование VAC31518COV3001)							
	Ad26 5e10 vp		Плацебо		VE	95% ДИ	Скорр. 95% ДИ
	Количество случаев	(N)/людей в год	Количество случаев	(N)/людей в год			
Набор анализов: набор PP		(19630)		(19691)			
Набор риска[a]		(19514)		(19544)			
Первичные конечные параметры							
COVID-19 средней или тяжелой/критической формы Возраст 18-59 лет Возраст >= 60 лет	116 95 21	3116,57 2106,82 1009,75	348 260 88	3096,12 2094,97 1001,15	66,9% 63,7% 76,3%	(53,87, 71,58) (61,58, 86,04)	(59,03, 73,40)
Вторичные конечные параметры							
Любой симптоматический COVID-19 формы: Легкой Средней Тяжелой/критической	117 1 102 14	3116,46 3116,46 3116,57 3125,05	351 3 288 60	3095,22 3095,92 3096,12 3122,03	66,9% 64,8% 76,7%	(59,07, 73,37) (55,75, 72,21)	(54,56, 89,09)
Все симптоматические	117	3116,46	351	3095,92	68,1%		(60,26,

COVID-19 (BOD)[b] Возраст 18-59 лет Возраст >= 60 лет Требующий медицинского вмешательства	95 22 2	2106,82 1009,64 3125,92	260 91 8	2094,97 1000,95 3126,10	65,8% 74,5% 75,0%	(56,22, 73,10) (57,91, 84,33) (-25,28, 97,41)	74,32)
Дополнительные конечные параметры							
Первичный конечный параметр, включая неподтвержденные случаи Случаи COVID-19, признанные US FDA	173 114	3113,88 3116,60	509 345	3089,06 3096,30	66,3% 67,2%	 (59,32, 73,67)	(59,86, 71,79)
Скорректированный ДИ реализует контроль ошибок первого рода для многократного тестирования и представляется при выполнении предварительно заданных условий тестирования. Если для конечного параметра наблюдалось менее 6 случаев, то VE не приведено. [a]В группу риска входят все субъекты из набора по протоколу (PP), за исключением субъектов, у которых наблюдали положительный результат ПЦР-теста в период с 1 по 14 день. [b]BOD: Уровень заболеваемости представляет собой взвешенную версию эффективности вакцины легкой, средней и тяжелой/критической степени тяжести. NE означает недоступен.							

Таблица 2

TEFSUM01_C: Краткое описание эффективности вакцины по отношению к COVID-19 с началом по меньшей мере через 28 дней после вакцинации, набор PP (исследование VAC31518COV3001)							
	Ad26 5e10 vp		Плацебо		VE	95% ДИ	Скорр. 95% ДИ
	Количество случаев	(N)/людей в год	Количество случаев	(N)/людей в год			
Набор анализов: набор PP		(19630)		(19691)			
Набор риска[a]		(19306)		(19178)			
Первичные конечные параметры							
COVID-19 средней или тяжелой/критической формы Возраст 18-59 лет Возраст >= 60 лет	66 52 14	3102,00 2097,60 1004,39	193 152 41	3070,65 2077,01 993,64	66,1% 66,1% 66,2%	 (53,30, 75,77) (36,74, 82,99)	(55,01, 74,87)
Вторичные конечные параметры							
Все инфекции SARS-CoV 2 Любой симптоматический COVID-19 формы: Легкой Средней Тяжелой/критической Асимптотические инфекции SARS-CoV 2	71 66 0 61 5 5	3101,59 3102,00 3102,00 3102,00 3106,15 3101,59	214 195 2 159 34 19	3096,58 3070,53 3070,53 3070,65 3082,58 3069,58	67,2% 66,5% 62,0% 85,4% 74,0%	(56,86, 75,26) (55,50, 75,05) (48,68, 72,21) (27,89, 92,40)	(54,15, 96,90)
Все симптоматические COVID-19 (BOD)[b] Возраст 18-59 лет Возраст >= 60 лет Требующий медицинского	66 52 14 0	3102,00 2097,60 1004,39 3106,43	195 152 43 5	3070,53 2077,01 993,52 3084,42	69,0% 69,3% 67,9%%	 (57,42, 77,68) (38,17, 82,77)	(56,68, 77,64)

вмешательства							
Дополнительные конечные параметры							
Первичный конечный параметр, включая неподтвержденные случаи	113	3100,26	324	3065,86	65,5%		(57,15, 72,41)
Случаи COVID-19, признанные US FDA	65	3102,02	193	3070,58	66,7%	(55,63, 75,23)	
Скорректированный ДИ реализует контроль ошибок первого рода для многократного тестирования и представляется при выполнении предварительно заданных условий тестирования. Если для первичного конечного параметра наблюдалось менее 6 случаев, то VE не приведено. [a]В группу риска входят все субъекты из набора по протоколу (PP), за исключением субъектов, у которых наблюдали положительный результат ПЦР-теста в период с 1 по 14 день. [b]BOD: Уровень заболеваемости представляет собой взвешенную версию эффективности вакцины легкой, средней и тяжелой/критической степени тяжести. NE означает недоступен.							

Полученные результаты

В ходе исследования получены высококачественные данные во многих регионах (Северная и Южная Америка, Африка) в то время, когда заболеваемость SARS-CoV-2 являлась очень высокой и появлялись новые линии вируса.

Исследование включало достижение сопутствующих целей:

Однократная доза вакцины Ad26.COV2.S оказалась эффективной при профилактике COVID-19 от умеренной до тяжелой/критической формы с VE 67% и 66% после 14-го дня и после 28-го дня после вакцинации.

В США однократная доза вакцины Ad26.COV2.S оказалась эффективной при профилактике COVID-19 от умеренной до тяжелой/критической формы с VE 77% и 72% после 14-го дня и после 28-го дня после вакцинации.

Эффективность стала очевидной в день 14 и возросла в течение дня 56, особенно в отношении тяжелого заболевания. Данный вывод находился в соответствии с доступными результатами иммуногенности: титры нейтрализующих и связывающих антител обнаруживались с дня 14 и далее, которые продолжали увеличиваться до дня 56 без признаков снижения до дня 84.

Для умеренных случаев COVID-19 в группе вакцинирования наблюдали меньшее количество симптомов по сравнению с умеренными случаями COVID-19 в группе плацебо.

Результаты соответствовали данным при использовании только случаев ПЦР+, подтвержденных центральной лабораторией, или при использовании всех случаев ПЦР+ независимо от подтверждения центральной лабораторией.

Эффективность вакцины увеличивалась с увеличением степени тяжести:

Высокая эффективность вакцины (в целом 85% после 28-го дня) была отмечена по отношению к COVID-19 тяжелой/критической формы, при этом эффективность наблюдалась уже в день 7 (77% в день 14).

Такая высокая эффективность вакцины соответствовала данным, полученным во всех странах и регионах, включая Южную Африку, где почти все случаи были связаны с новым штаммом SARS-CoV-2 (B.1.351) (на основе частично доступных данных секвенирования: 45/48 с B.1.351).

Для участников с эпизодом COVID-19, требующим медицинского вмешательства, такого как госпитализация, ICU, ECMO или искусственная вентиляция легких, было зарегистрировано 2 случая в вакцинированной группе по сравнению с 8 случаями в группе плацебо после 14-го дня и ни одного случая по сравнению с 5 случаями после 28-го дня. Изучение потенциального предоставления неполной отчетности продолжается.

Все подтвержденные смерти от COVID-19 (5) произошли в группе плацебо.

Совместными первичными конечными параметрами являлись подтвержденные случаи COVID-19 средней и тяжелой/критической формы у серонегативных участников с началом не менее чем через 28 дней и не менее чем через 14 дней после вакцинации Ad26.COV2.S по сравнению с плацебо. Для успешного заключения по первичному конечному параметру необходимо VE > 30% с точечной оценкой ≥ 50% и благоприятное разделение между группой Ad26.COV2.S и группой плацебо для тяжелых случаев по крайней мере с 5 случаями в группе плацебо. На момент первичного анализа в наборе PP наблюдалось 259 случаев COVID-19 средней и тяжелой/критической формы, которые произошли не менее чем через 28 дней, и 464 случая, которые произошли не менее чем через 14 дней после вакцинации. Предварительно указанные критерии (см. выше) для успешного первичного анализа соответствовали для обоих первичных конечных параметров, и, следовательно, эффективность Ad26.COV2.S против COVID-19 средней и тяжелой/критической формы была установлена через 14 дней после вакцинации.

VE (с поправкой на 95% ДИ) по отношению к COVID-19 формы от умеренной до тяжелой/критической, развившемуся не менее чем через 28 дней после вакцинации, составила 66,1% (55,01, 74,80) и 66,9% (59,03, 73,40) при

оценке не менее чем через 14 дней после вакцинации. Распределение случаев, произошедших по крайней мере через 28 дней после вакцинации, составило 66 и 193 в группе Ad26.COV2.S и группе плацебо, соответственно. Для случаев, произошедших по крайней мере через 14 дней после вакцинации, наблюдалось 116 и 348 случаев, соответственно. Распределение тяжелых/критических случаев, возникших не менее чем через 28 дней и не менее чем через 14 дней после вакцинации, составило 5 и 34, и 14 и 60, соответственно.

В дополнительных анализах оценивали VE по отношению к умеренной и тяжелой/критической форме COVID-19 по возрастной категории (от 18 до <60 лет, ≥ 60 лет). VE (ДИ) у участников ≥60 лет оказалась как минимум одинаково высокой по сравнению со взрослыми участниками моложе 60 лет: 66,2% (36,74, 82,99) и 76,3% (61,58, 86,04) с началом не менее 28 дней и не менее 14 дней после вакцинации соответственно у участников в возрасте ≥60 лет и 66,1% (53,30, 75,77) и 63,7% (53,87, 71,58), соответственно, у участников моложе 60 лет. Дополнительные анализы подгрупп по исходному серостатусу SARS-CoV-2, а также демографическим и исходным характеристикам описаны ниже.

Раннее развитие защиты от подтвержденного COVID-19 умеренной или тяжелой/критической формы показано на фиг. 142 и фиг. 143, на которых приведена кумулятивная заболеваемость для первого случая подтвержденного умеренного или тяжелого/критического COVID-19 с началом по крайней мере через 1 день после вакцинации. Кривые кумулятивного распределения начинали расходиться между группой Ad26.COV2.S и группой плацебо примерно через 14 дней после вакцинации, и VE продолжает увеличиваться до 56-го дня без признаков снижения до 85-го дня, что согласуется с выводами, полученными в исследовании фазы 1, в котором ответ нейтрализующих антител наблюдали с 15-го дня и далее, с увеличением GMT и доли ответивших в % до 57-го дня.

Эффективность по отношению к тяжелой форме заболевания увеличивалась со временем, и у вакцинированных участников не было зарегистрировано ни одного случая после дня 49.

Из 259 и 464 случаев от средней до тяжелой/критической формы COVID-19, произошедших в течение не менее 28 дней и не менее 14 дней после вакцинации, соответственно, 39 и 74 являлись тяжелыми/критическими, а 220 и 390 — средней степени тяжести. Кроме того, до даты окончания анализа было

зарегистрировано 2 и 4 легких случая COVID-19 с началом не менее чем через 28 и 14 дней после вакцинации соответственно.

Эффективность вакцины против тяжелой/критической формы COVID-19

Эффективность вакцины против тяжелой/критической формы COVID-19 тестировали статистическим методом по отношению к нулевой гипотезе о VE<0%. Предварительно заданный критерий успеха достигался на основе случаев с началом заболевания не менее чем через 28 дней, а также на основе случаев с началом заболевания не менее чем через 14 дней после вакцинации (скорректированный 95% ДИ >0), и, следовательно, устанавливали эффективность по отношению к тяжелой/критической форме COVID -19 через 14 дней после вакцинации. VE (ДИ) по отношению к тяжелой/критической форме COVID-19, возникшей как минимум через 28 дней и 14 дней после вакцинации, составила 85,4% (54,15, 96,90) и 76,7% (54,56, 89,09), соответственно.

Кумулятивная заболеваемость для первого случая COVID-19 тяжелой/критической формы с началом по меньшей мере через 1 день после вакцинации показана на фиг. 144 и свидетельствует о раннем начале защиты от COVID-19 тяжелой/критической формы. Кумулятивные кривые распределения начинают расходиться между Ad26.COV2.S и группой плацебо примерно через 7 дней после вакцинации, а VE увеличивается до 56-го дня.

Все подтвержденные случаи COVID-19 в группе совокупность, потребовавшие медицинского вмешательства (госпитализация, госпитализация в ICU, искусственная вентиляция легких, ECMO) или приведшие к первичной смерти по крайней мере через 28 дней после вакцинации, произошли у участников, которым вводили плацебо.

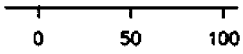
Эффективность вакцины против COVID-19 средней и легкой формы тяжести

VE (ДИ) по отношению к COVID-19 средней формы тяжести, возникшему как минимум через 28 дней и как минимум через 14 дней после вакцинации, составила 62,0% (48,68, 72,21) и 64,8% (55,75, 72,21), соответственно. Для легких случаев COVID-19 (<6 случаев) наблюдалось благоприятное разделение между группой Ad26.COV2.S и группой плацебо: 0 и 2 случая, соответственно, произошли по крайней мере через 28 дней после вакцинации, и 1 и 3 случая, соответственно, произошли не ранее чем через 14 дней после вакцинации.

Таблица 3

Краткая информация об эффективности вакцины по отношению к COVID-19 умеренной формы с началом заболевания не менее чем через 14 дней после вакцинации, согласно протоколу, установленному по количеству умеренных симптомов.

		Ad26 5e10 vp		Плацебо		
	Форест-диаграмма	Число случаев	PY	Число случаев	PY	VE% (95%ДИ)
Набор анализа: PP		(19630)		(19691)		
Набор рисков[a]		(19514)		(19544)		
Случаи средней тяжести		102 (19514)	3116,57	288 (19544)	3096,12	64,8% (55,75, 72,21)
<= 3 симптома		17 (19514)	3116,57	35 (19544)	3096,12	51,7% (11,53, 74,65)
4-6 симптомов		42 (19514)	3116,57	77 (19544)	3096,12	45,8% (20,08, 63,71)
7-9 симптомов		35 (19514)	3116,57	142 (19544)	3096,12	75,5% (64,34, 83,59)
>= 10 симптомов		8 (19514)	3116,57	34 (19544)	3096,12	76,6% (48,55, 90,65)

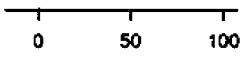


VE% (95% ДИ)

Таблица 3

Краткая информация об эффективности вакцины по отношению к COVID-19 умеренной формы с началом заболевания не менее чем через 14 дней после вакцинации, согласно протоколу, установленному по количеству умеренных симптомов.

		Ad26 5e10 vp		Плацебо		
	Форест-диаграмма	Число случаев	PY	Число случаев	PY	VE% (95%ДИ)
Набор анализа: PP		(19630)		(19691)		
Набор рисков[a]		(19306)		(19178)		
Случаи средней тяжести		61 (19306)	3102,00	159 (19178)	3070,65	62,0% (48,68, 72,21)
<= 3 симптома		9 (19306)	3102,00	17 (19178)	3070,65	47,6% (-24,30, 79,42)
4-6 симптомов		26 (19306)	3102,00	49 (19178)	3070,65	47,5% (13,82, 68,67)
7-9 симптомов		22 (19306)	3102,00	74 (19178)	3070,65	70,6% (52,09, 82,60)
>= 10 симптомов		4 (19306)	3102,00	19 (19178)	3070,65	79,2% (37,29, 94,84)



VE% (95% ДИ)

Таблица 4

Краткая информация об эффективности вакцины по отношению к COVID-19 умеренной формы с началом заболевания не менее чем через 28 дней после вакцинации, согласно протоколу (Study VAC31518COV3001), установленному по количеству умеренных симптомов.

В группе вакцинации для умеренных случаев COVID-19 наблюдали меньшее количество симптомов по сравнению с умеренными случаями COVID-19 в группе плацебо, что свидетельствовало о том, что в случае инфекций после вакцинации (в категории «умеренное заболевание») у людей, которые были вакцинированы, наблюдалось значительно меньшее количество симптомов по сравнению с людьми, получавшими плацебо.

Эффективность вакцины по отношению к любому симптоматическому COVID-19

С учетом всех симптоматических случаев COVID-19, независимо от тяжести, было зарегистрировано 285 и 468 симптоматических случаев COVID-19 с началом не менее чем через 28 дней после вакцинации и не менее чем через 14 дней после вакцинации. VE по отношению ко всем симптоматическим COVID-19 оценивали с использованием конечного параметра BOD, который оценивает VE с поправкой на тяжесть по отношению к предотвращению симптоматического COVID-19. Более высокое значение присваивали тяжелым инфекциям (тяжелые случаи получали 2 балла, а нетяжелые - 1), и, таким образом, конечный параметр BOD обеспечивал более высокую статистическую мощность для дифференциации вакцин плацебо с повышенной защитой от тяжелых инфекций. VE по отношению ко всем симптоматическим COVID-19, возникшим как минимум через 28 и как минимум через 14 дней после вакцинации, оцененная по конечному параметру BOD, составила 69,0% (56,68, 77,64) и 68,1% (60,26, 74,32), соответственно. Поскольку нижняя граница скорректированного 95% ДИ > 0 для обоих конечных параметров, то соблюдали заранее заданные критерии успеха, и, следовательно, эффективность Ad26.COV2.S по отношению ко всем симптоматическим COVID-19 устанавливали через 14 дней после вакцинации.

Поскольку VE по отношению к тяжелому заболеванию превышала VE по отношению к умеренному и легкому заболеваниям, VE по отношению ко всем симптоматическим COVID-19 с одинаковым весом всех степеней тяжести оказалась незначительно ниже по сравнению с VE с поправкой на тяжесть: 66,5% (55,50, 75,05) и 66,9% (59,07, 73,37) на основании случаев, произошедших не менее чем через 28 дней и не менее чем через 14 дней после вакцинации, соответственно.

VE по отношению к COVID-19 в соответствии с согласованным определением FDA США соответствовала наблюдаемому VE по отношению ко всем симптоматическим COVID-19: 66,7% (55,63, 75,23) и 67,2% (59,32, 73,67) как минимум через 28 дней и как минимум через 14 дней после вакцинации, соответственно.

Все инфекции SARS-CoV-2, включая бессимптомные или невыявленные случаи

Влияние Ad26.COV2.S на развитие подтвержденных бессимптомных или невыявленных инфекций SARS-CoV-2 оценивали с использованием ИФА и/или анализа иммуноглобулина SARS-CoV-2, который зависит от белка N SARS-CoV-2. Серологическую конверсию оценивали между днем 1 (до вакцинации) и днем 71, через 6 месяцев и 1 год после вакцинации. Кроме того, серологическую конверсию оценивали между днем 1 (до вакцинации) и днем 29 после вакцинации. На момент проведения промежуточного анализа были доступны ограниченные данные в дни 71 и 29. Эффективность вакцины (ДИ) по отношению к бессимптомной инфекции COVID-19, возникшей не менее чем через 28 дней после вакцинации, составила 74,0% (27,89, 92,40) (см. табл. 5).

Краткое описание эффективности вакцины по отношению к бессимптомным/неопределенным инфекциям SARS-CoV-2 в день 29 (исследование VAC31518COV3001)

	Ad26 5e10 vp		Плацебо			
	Число случаев	(N)/человек-годы	Число случаев	(N)/человек-годы	VE	95% CI
Набор анализа: набор по протоколу (PP)		(19630)		(19691)		
Набор рисков		(19630)		(19178)		
Бессимптомные инфекции SARS-CoV-2 (день > 29)[b]	5	3101,59	19	3069,58	74,0%	(27,89, 92,40)
Бессимптомные инфекции SARS-CoV-2	0	3101,59	12	3068,54	100,0%	(64,39, 100,00)

	Ad26 5e10 vp		Плацебо			
	Число случаев	(N)/человек-годы	Число случаев	(N)/человек-годы	VE	95% CI
без предварительных симптомов (день > 29)[b,d]						
Набор серологических рисков[a]		(486)		(479)		
Сероконвертированный SARS-CoV-2 (день > 29)[c]	2	132,46	16	128,88	87,8%	(48,27, 98,64)
Сероконвертированный SARS-CoV-2 без предварительных симптомов (день > 29)[c,d]	0	132,08	12	128,22	100,0%	(65,06, 100,00)

[a]Серологический набор: результаты участников с белком, отличным от белка S, доступны в день 71

[b]Участника считали перенесшим бессимптомный или необнаруженный COVID-19, если он не соответствовал критериям подозрения на COVID-19 на основании признаков и симптомов, обнаруженных с использованием алгоритма, описанного в SAP, и характеризовался положительным результатом ОТ-ПЦР или молекулярного теста на SAR-CoV-2, или положительным серологическим тестом (не S-белок)

[c]Участника считали серологически конвертированным при появлении у него положительного серологического теста (не на S-белок) и без положительного результата ОТ-ПЦР на SARS-CoV-2 до появления положительного серологического результата, независимо от наличия предыдущих симптомов

[d]Участника считали без предшествующих симптомов, если симптомы COVID-19 не проявлялись до положительного результата ПЦР или серологического теста в любой момент времени в ходе исследования

Эффективность вакцины (ДИ) Ad26.COV2.S при профилактике всех инфекций SARS-CoV-2 (комбинированных симптоматических и бессимптомных инфекций, подтвержденных серологическим и/или молекулярным способом) с началом не менее чем через 28 дней после вакцинации составила 67,2% (56,86, 75,26) (см. табл. 2 выше).

Анализы подгрупп

Анализ эффективности по отношению к молекулярно подтвержденной умеренной или тяжелой/критической формы COVID-19 с началом по меньшей мере через 28 дней и по меньшей мере через 14 дней после вакцинации

проводили по демографическим и исходным характеристикам, включая возраст (18-59 лет и ≥60 лет), наличие/отсутствие сопутствующих заболеваний (включая астму, рак, цереброваскулярные заболевания, муковисцидоз, хроническую болезнь почек, ХОБЛ, серьезные сердечные состояния, гипертонию, заболевания печени, неврологические состояния, ожирение, легочный фиброз, серповидноклеточную анемию, диабет 1 или 2 типа или талассемию), возраст и сопутствующие заболевания, пол (мужской/женский), страну происхождения (Аргентина, Бразилия, Чили, Колумбия, Мексика, Перу, США или Южная Африка), расу (американский индеец/Аляска, азиатская, черная или афроамериканская, коренной гаваец/другое, белая, смешанная), этническую принадлежность (испаноязычная/латиноамериканская, неиспаноязычная/латиноамериканская), регион (Латинская Америка, Северная Америка и Южная Африка) и ВИЧ-статус. Предварительные результаты представлены ниже.

Эффективность вакцины (VE) по отношению к умеренной/тяжелой форме заболевания и тяжелой форме заболевания в подгруппах

Вакцина оказалась эффективной во всех возрастных группах с оцененной эффективностью вакцины по отношению к умеренной/тяжелой формы заболевания: не менее 64% после 14-го дня и не менее 66% после 28-го дня.

Вакцина оказалась эффективной среди участников с сопутствующими заболеваниями и без них, при этом оцененная эффективность вакцины по отношению к умеренной/тяжелой форме заболевания составляла по меньшей мере 63% после 14-го дня и по меньшей мере 49% после 28-го дня в группе с сопутствующими заболеваниями. Дополнительный анализ, включающий все ПЦР+, независимо от подтверждения центральной лабораторией, свидетельствовал об эффективности по меньшей мере 64% после 14-го дня и по меньшей мере 59% после 28-го дня. Для понимания наблюдаемых возможных различий между подгруппами с сопутствующими заболеваниями и без них необходимы более полные данные обследования.

Эффективность вакцины оказалась одинаковой для чернокожих/афроамериканцев по сравнению с белыми и для латиноамериканцев по сравнению с неиспаноязычными.

Эффективность вакцины по отношению к тяжелой форме заболевания отчетливо наблюдалась на 14-й день, а к 28-му дню составляла примерно 85%

или более в странах, по которым получено достаточно данных (Южная Африка, Колумбия).

Уровень защиты от умеренной и тяжелой формы инфекции COVID-19 составил 72% в США, 66% в Латинской Америке и 57% в Южной Африке через 28 дней после вакцинации.

Эффективность вакцины по отношению к различным штаммам вируса

За время исследования в странах, которые были включены в исследование, были выявлены различные мутирующие варианты. Например, в Южной Африке подавляющее большинство штаммов, вызывающих инфекции COVID-19, относились к варианту 501Y.V2 (вариант RSA), в частности штаммы (45/48 секвенированных), 94% из которых относились к штамму линии B.1.351 (501Y .V2) SARS-CoV-2.

Эффективность вакцины по отношению к первому случаю молекулярно подтвержденного умеренной или тяжелой/критической формы COVID-19 с началом по меньшей мере через 28 дней после вакцинации составила 67,0 (-8,87-92,24) по отношению к варианту B1.351 (несущего мутацию 501Y) и по отношению к варианту, несущему мутацию E484K.

Гуморальная иммуногенность после однократного введения дозы Ad26.COV2.S $5x10^{10}$ вч до 29-го дня

Вследствие возрастания количества вариантов вируса SARS-CoV-2 с мутациями в S белке вируса в областях, которые являются известными мишенями для нейтрализующих антител, оценивали иммуногенность Ad26.COV2.S против вставки вакцины с использованием S-ИФА в день 1 и день 29 после вакцинации с использованием образцов из двух случайно выбранных областей в Бразилии с высокой частотой инфицирования, а также других случайных областей в Бразилии, Южной Африке и США.

В целом не наблюдалось различий в уровнях связывания антител, индуцированных Ad26.COV2.S, между участниками из Бразилии, Южной Африки и США. Концентрации связывающих антител для бразильских участников (GMC в день 29) варьировались от 317 (95% ДИ 227, 444) в бразильской области BR10003 до 473 (95% ДИ 268; 836) в бразильской области BR10004. Концентрации связывающих антител для участников из Южной Африки и США оказались близкими с GMC в день 29 - 388 (95% ДИ 297, 506) и 412 (95% ДИ 306, 554), соответственно.

Частота ответа на лечение оказалась одинаковой по областям из всех 3 стран на уровне >93% для групп с активной вакциной, что представляет собой среднее геометрическое увеличение от исходного уровня более чем в 6 раз до 9,3 раза.

GMR (по сравнению с участниками из США) составлял от 0,77 (95% ДИ 0,49, 1,20) до 1,15 (95% ДИ 0,64, 2,07) для областей в Бразилии и 0,94 (95% ДИ 0,63, 1,42) для областей в Южной Африке.

Аналогичные GMC наблюдали в разных странах по сравнению с данными COV1001.

Таким образом, по данным этого предварительного анализа установлено:

Однократная доза Ad26.COV2.S защищала от COVID-19 взрослых в возрасте ≥18 лет, включая взрослых в возрасте ≥60 лет. На основании первичного анализа эффективности этого базового исследования, включающего 19630 участников, которым вводили Ad26.COV2.S, и 19691 участника, которым вводили плацебо, эффективность вакцины (с учетом 95% ДИ) для дополнительных конечных параметров против молекулярно подтвержденного COVID-19 от умеренной до тяжелой/критической формы у участников, которые являлись серонегативными на момент вакцинации, составила 66,9% (59,03, 73,40) при рассмотрении случаев в течение по меньшей мере 14 дней после вакцинации и 66,1% (55,01, 74,80) при рассмотрении случаев в течение по меньшей мере 28 дней после вакцинации.

VE по отношению к тяжелой/критической форме COVID-19, который развивался по меньшей мере через 28 дней и 14 дней после однократной дозы Ad26.COV2.S, составила 85,4% (54,15, 96,90) и 76,7% (54,56, 89,09), соответственно, с эффективностью более 90% в 18–59 лет после 28-го дня. Этот результат оказался одинаковым во всех странах и регионах (Северная и Южная Америка, Южная Африка), включая Южную Африку, где почти все случаи инфицирования были вызваны новым вариантом SARS-CoV-2 (501Y.V2).

Эффективность начинали оценивать в день 14, при этом эффективность повышалась к дню 56, особенно в отношении тяжелого заболевания. Полученный вывод согласовался с иммунологическими данными о титрах нейтрализующих и связывающих антител, обнаруженных с дня 14 и далее, которые продолжали увеличиваться до 56-го дня без признаков снижения до 85-го дня.

Эффективность вакцины по отношению ко всем симптоматическим заболеваниям соответствовала первичному конечному параметру. Эффективность вакцины по отношению ко всем симптоматическим COVID-19, оцененная с использованием взвешенного анализа с поправкой на тяжесть (BOD), включая VE по отношению к умеренной, средней и тяжелой/критической форме Ad26.COV2.S, развивавшегося по меньшей мере через 28 дней и по меньшей мере через 14 дней после однократной дозы, составила 69,0% и 68,1%, соответственно. Эффективность по отношению к тяжелой/критической форме COVID-19 (85,4% и 76,7%) оказалась выше эффективности по отношению к COVID-19 умеренной степени тяжести (62,0% и 64,8%), для случаев, по крайней мере, через 28 дней и по крайней мере через 14 дней после вакцинации, соответственно. Не-взвешенный анализ соответствовал с полученными результатами.

Эффективность вакцины в целевой популяции для вакцинации против COVID-19, например, пожилых людей и (пожилых) взрослых с сопутствующими заболеваниями, соответствовала эффективности, наблюдаемой в общей популяции. В целом описательный анализ подгрупп не выявил различий в эффективности вакцины Ad26.COV2.S в зависимости от возрастных групп, пола, расы/этнической принадлежности, географического положения, сопутствующих заболеваний, возраста в сочетании с сопутствующими заболеваниями во время вакцинации.

Предварительные данные свидетельствули об эффекте вакцины по отношению к бессимптомной инфекции, о чем свидетельствуют результаты ПЦР+ по бессимптомным состояниям и серологическая конверсия. Эффективность вакцины (CI) против бессимптомной инфекции COVID-19, развивавшейся по меньшей мере через 28 дней после вакцинации, составила 74,0% (27,89, 92,40).

Кроме того, профиль безопасности и реактогенности Ad26.COV2.S соответствовал профилям других вакцин на основе Ad26. Несмотря на то, что частота лихорадки в исследованиях фазы 1 и фазы 2 Ad26.COV2.S превышала наблюдаемую ранее, особенно у молодых взрослых, этот вывод не был воспроизведен в более крупном исследовании фазы 3 Ad26.COV2.S. Реактогенность Ad26.COV2.S оказалась непостоянной и исчезала в течение 1-2

дней. После вакцинации можно использовать жаропонижающие для облегчения симптомов по мере необходимости.

Последовательности

>COR200007_SEQ ID NO: 205
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFF
SNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLL
IVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLM
DLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINIT
RFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDP
LSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWN
RKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPG
QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEI
YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKST
NLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPC
SFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGC
LIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYS
NNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRAL
TGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKV
TLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSG
WTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASA
LGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQS
LQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVF
LHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTF
VSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQ
KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTS
CCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

>COR200008_SEQ ID NO: 206
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFF
SNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLL
IVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLM
DLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINIT
RFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDP
LSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWN
RKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPG
QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEI
YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKST
NLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPC
SFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGC
LIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYS
NNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRAL
TGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKV
TLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSG
WTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASA
LGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQS
LQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVF
LHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTF
VSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQ

KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTS
CCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGV

>COR200009_SEQ ID NO: 207
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSAQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHS
TQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTT
LDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTF
EYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLV
DLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTIT
DAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNAT
RFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG
DEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKP
FERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPA
TVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQT
LEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
NVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSL
GAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSF
IEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSA
LLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQ
DSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQID
RLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFP
QSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEP
QIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISG
INASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMV
TIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

>COR200010_SEQ ID NO: 208
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSAQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHS
TQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTT
LDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTF
EYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLV
DLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTIT
DAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNAT
RFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG
DEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKP
FERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPA
TVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQT
LEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
NVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQSIIAYTMSL
GAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSF
IEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSA
LLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQ
DSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQID
RLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFP
QSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEP
QIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISG
INASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMV
TIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

>COR200011_SEQ ID NO: 209
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSAQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHS
TQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTT
LDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTF
EYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLV
DLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTIT
DAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNAT
RFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG
DEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKP
FERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPA
TVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQT
LEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
NVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPSRAGSVASQSIIAYTMSL
GAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSF
IEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSA
LLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQ
DSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQID
RLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFP
QSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEP
QIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISG
INASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMV
TIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGV

>COR200018_SEQ ID NO: 210
MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASQEIHARFRRFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAY
TNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFN
DGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYH
KNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYS
KHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAA
YYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPT
ESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGV
SPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNL
DSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPT
NGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKF
LPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCT
EVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQ
TNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSV
DCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIK
DFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQK
FNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQ
NVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA
ISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSE
CVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFP
REGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFK
EELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQ
YIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKG
VKLHYT

*Жирным и подчеркнуто: теоретическая сигнальная пептидная последовательность.

>COR200007_SEQ ID NO: 211
ATGTTCGTGTTTCTGGTACTGCTCCCCCTCGTCTCCAGTCAATGCGTGAACCTGACCAC
AAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCG
ACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTC
AGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATT
CGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCA
ACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTG
ATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGA
CCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCC
GGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATG
GACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACAT
CGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGC
CTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACC
CGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAG
CGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTC
TGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCT
CTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGAC
CAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATC
TGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAAC
CGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTT
CAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAA
ACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGA
CAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGT
GATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGT
ACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATC
TATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACT
GCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGG
TGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACC
AATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGT
GCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCG
ATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGC
AGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGT
GCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGA
CACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGT
CTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGG
CATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCA
GCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCC
AACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCC
TGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCG
AGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTG
ACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCA
GATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGC
CCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTG
ACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGC
CAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGA
CCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGC
TGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCG
GTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCA
ACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCC
CTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAA

GCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGAC
TGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCC
CTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAA
TCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTT
GCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTT
CTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTG
CCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATT
GGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTC
GTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCT
GCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAA
GCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAG
AAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCT
GCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAGTACATCAAGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCT
TTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGC
TGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGA
CGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAACTGCACTACACA

>COR200008_SEQ ID NO: 212
ATGTTCGTGTTTCTGGTACTGCTCCCCCTCGTCTCCAGTCAATGCGTGAACCTGACCAC
AAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCG
ACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTC
AGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATT
CGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCA
ACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTG
ATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGA
CCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCC
GGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATG
GACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACAT
CGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGC
CTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACC
CGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAG
CGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTC
TGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCT
CTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGAC
CAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATC
TGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAAC
CGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTT
CAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAA
ACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGA
CAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGT
GATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGT
ACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATC
TATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACT
GCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGG
TGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACC
AATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGT
GCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCG
ATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGC
AGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGT
GCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGA
CACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGT

CTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGG
CATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACAGCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCA
GCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCC
AACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCC
TGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCG
AGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTG
ACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCA
GATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGC
CCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTG
ACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGC
CAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGA
CCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGC
TGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGATCCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCG
GTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCA
ACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCC
CTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAA
GCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGAC
TGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCC
CTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAA
TCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTT
GCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTT
CTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTG
CCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATT
GGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTC
GTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCT
GCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAA
GCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAG
AAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCT
GCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAGTACATCAAGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCT
TTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGC
TGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGA
CGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTG

>COR200009_SEQ ID NO: 213
ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGT
GTCTGCTCAATGCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACA
GCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCT
ACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGT
GTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGG
TGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACA
CTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAA
AGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACA
ACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTT
GAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAA
CCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACA
CCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTG
GATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAG
CTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATG
TGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACC
GACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTT
CACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCA

TCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACC
AGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTA
CTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTA
CCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGA
GATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAA
GCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCA
AAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCC
TTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGT
GGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCG
TGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCC
ACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAA
CTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCAT
TCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACA
CTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGG
CACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGC
CCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGC
AATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTA
CGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACA
GCCCCAGACGGGCCAGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTG
GGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCAC
CATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCA
CCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGC
TTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACAC
CCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCG
GCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTC
ATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTA
TGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACG
GACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCC
CTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGAT
CCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGC
TGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAG
GACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAA
TGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCT
CTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACAAGGTGGAAGCCGAGGTGCAGATCGAC
AGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAG
AGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGC
TGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCT
CAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAA
GAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAG
GCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCC
CAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCAT
TGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAAC
TGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGA
ATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAA
GAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAGTACATCA
AGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTC
ACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTG
TGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAAC
TGCACTACACA

>COR200010_SEQ ID NO: 214

ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGT
GTCTGCTCAATGCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACA
GCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCT
ACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGT
GTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGG
TGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACA
CTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAA
AGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACA
ACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTT
GAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAA
CCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACA
CCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTG
GATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAG
CTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATG
TGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACC
GACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTT
CACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCA
TCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACC
AGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTA
CTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTA
CCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGA
GATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAA
GCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCA
AAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCC
TTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGT
GGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCG
TGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCC
ACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAA
CTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCAT
TCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACA
CTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGG
CACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGC
CCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGC
AATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTA
CGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACA
GCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTG
GGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCAC
CATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCA
CCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGC
TTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACAC
CCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCG
GCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTC
ATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTA
TGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACG
GACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCC
CTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGAT
CCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGC
TGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAG
GACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAA
TGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCT
CTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGAC

AGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAG
AGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGC
TGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCT
CAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAA
GAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAG
GCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCC
CAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCAT
TGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAAC
TGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGA
ATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAA
GAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAGTACATCA
AGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTC
ACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTG
TGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTGAAAC
TGCACTACACA

>COR200011_SEQ ID NO: 215
ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGT
GTCTGCTCAATGCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTACACCAACA
GCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCTGCACTCT
ACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCATCCACGT
GTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAACGACGGGG
TGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGGCACCACA
CTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGGTCATCAA
AGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCACAAGAACA
ACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTGCACCTTT
GAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACTTCAAGAA
CCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGCAAGCACA
CCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACCCCTGGTG
GATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGCACAGAAG
CTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCTTACTATG
TGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCACCATCACC
GACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGAAGTCCTT
CACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACCGAATCCA
TCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAATGCCACC
AGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGGCCGACTA
CTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTGTCCCCTA
CCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGATCCGGGGA
GATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACAACTACAA
GCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACTCCA
AAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTGAAGCCC
TTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTAACGGCGT
GGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACAAATGGCG
TGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGCCCCTGCC
ACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGAACTTCAA
CTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTCCTGCCAT
TCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCCCCAGACA
CTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCACCCCTGG
CACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACCGAAGTGC
CCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCACCGGCAGC
AATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACAATAGCTA

CGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACAGACAAACA
GCCCCAGCAGAGCCGGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAATGTCTCTG
GGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCACCAACTTCAC
CATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTGGACTGCA
CCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTACGGCAGC
TTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACAAGAACAC
CCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAGGACTTCG
GCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCGGAGCTTC
ATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCAAGCAGTA
TGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAGTTTAACG
GACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACACATCTGCC
CTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTCTGCAGAT
CCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAGAATGTGC
TGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAAGATCCAG
GACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCAACCAGAA
TGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCCATCAGCT
CTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACCCTCCTGAGGCCGAGGTGCAGATCGAC
AGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGCTGATCAG
AGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAGTGTGTGC
TGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCT
CAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTCAAGAGAA
GAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCTAGAGAAG
GCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTACGAGCCC
CAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGATCGGCAT
TGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAAGAGGAAC
TGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATATCAGCGGA
ATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGGTGGCCAA
GAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAGTACATCA
AGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGTGATGGTC
ACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTTGTAGCTG
TGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGCGTG

>COR200018_SEQ ID NO: 216
ATGGACGCTATGAAGAGGGGCCTGTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGCGGAGCTGTGTTTGT
GTCTGCTAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTTCGGAGATTCGTGTTTCTGGTGCTGCTGC
CTCTGGTGTCCAGCCAATGCGTGAACCTGACCACAAGAACCCAGCTGCCTCCAGCCTAC
ACCAACAGCTTTACCAGAGGCGTGTACTACCCCGACAAGGTGTTCAGATCCAGCGTGCT
GCACTCTACCCAGGACCTGTTCCTGCCTTTCTTCAGCAACGTGACCTGGTTCCACGCCA
TCCACGTGTCCGGCACCAATGGCACCAAGAGATTCGACAACCCCGTGCTGCCCTTCAAC
GACGGGGTGTACTTTGCCAGCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGCTGGATCTTCGG
CACCACACTGGACAGCAAGACCCAGAGCCTGCTGATCGTGAACAACGCCACCAACGTGG
TCATCAAAGTGTGCGAGTTCCAGTTCTGCAACGACCCCTTCCTGGGCGTCTACTATCAC
AAGAACAACAAGAGCTGGATGGAAAGCGAGTTCCGGGTGTACAGCAGCGCCAACAACTG
CACCTTTGAATACGTGTCCCAGCCTTTCCTGATGGACCTGGAAGGCAAGCAGGGCAACT
TCAAGAACCTGCGCGAGTTCGTGTTCAAGAACATCGACGGCTACTTCAAGATCTACAGC
AAGCACACCCCTATCAACCTCGTGCGGGATCTGCCTCAGGGCTTCTCTGCTCTGGAACC
CCTGGTGGATCTGCCCATCGGCATCAACATCACCCGGTTTCAGACACTGCTGGCCCTGC
ACAGAAGCTACCTGACACCTGGCGATAGCAGCAGCGGATGGACAGCTGGTGCCGCCGCT
TACTATGTGGGCTACCTGCAGCCTAGAACCTTTCTGCTGAAGTACAACGAGAACGGCAC
CATCACCGACGCCGTGGATTGTGCTCTGGATCCTCTGAGCGAGACAAAGTGCACCCTGA

AGTCCTTCACCGTGGAAAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCCGGGTGCAGCCCACC
GAATCCATCGTGCGGTTCCCCAATATCACCAATCTGTGCCCCTTCGGCGAGGTGTTCAA
TGCCACCAGATTCGCCTCTGTGTACGCCTGGAACCGGAAGCGGATCAGCAATTGCGTGG
CCGACTACTCCGTGCTGTACAACTCCGCCAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGCGTG
TCCCCTACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCACAAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGAT
CCGGGGAGATGAAGTGCGGCAGATTGCCCCTGGACAGACTGGCAAGATCGCCGACTACA
ACTACAAGCTGCCCGACGACTTCACCGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTG
GACTCCAAAGTCGGCGGCAACTACAATTACCTGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCT
GAAGCCCTTCGAGCGGGACATCTCCACCGAGATCTATCAGGCCGGCAGCACCCCTTGTA
ACGGCGTGGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGCAGTCCTACGGCTTTCAGCCCACA
AATGGCGTGGGCTATCAGCCCTACAGAGTGGTGGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCATGC
CCCTGCCACAGTGTGCGGCCCTAAGAAAAGCACCAATCTCGTGAAGAACAAATGCGTGA
ACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGCTGACAGAGAGCAACAAGAAGTTC
CTGCCATTCCAGCAGTTTGGCCGGGATATCGCCGATACCACAGACGCCGTTAGAGATCC
CCAGACACTGGAAATCCTGGACATCACCCCTTGCAGCTTCGGCGGAGTGTCTGTGATCA
CCCCTGGCACCAACACCAGCAATCAGGTGGCAGTGCTGTACCAGGACGTGAACTGTACC
GAAGTGCCCGTGGCCATTCACGCCGATCAGCTGACACCTACATGGCGGGTGTACTCCAC
CGGCAGCAATGTGTTTCAGACCAGAGCCGGCTGTCTGATCGGAGCCGAGCACGTGAACA
ATAGCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGCGCTGGCATCTGTGCCAGCTACCAGACACAG
ACAAACAGCCCCAGACGGGCCAGATCTGTGGCCAGCCAGAGCATCATTGCCTACACAAT
GTCTCTGGGCGCCGAGAACAGCGTGGCCTACTCCAACAACTCTATCGCTATCCCCACCA
ACTTCACCATCAGCGTGACCACAGAGATCCTGCCTGTGTCCATGACCAAGACCAGCGTG
GACTGCACCATGTACATCTGCGGCGATTCCACCGAGTGCTCCAACCTGCTGCTGCAGTA
CGGCAGCTTCTGCACCCAGCTGAATAGAGCCCTGACAGGGATCGCCGTGGAACAGGACA
AGAACACCCAAGAGGTGTTCGCCCAAGTGAAGCAGATCTACAAGACCCCTCCTATCAAG
GACTTCGGCGGCTTCAATTTCAGCCAGATTCTGCCCGATCCTAGCAAGCCCAGCAAGCG
GAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAAGTGACACTGGCCGACGCCGGCTTCATCA
AGCAGTATGGCGATTGTCTGGGCGACATTGCCGCCAGGGATCTGATTTGCGCCCAGAAG
TTTAACGGACTGACAGTGCTGCCTCCTCTGCTGACCGATGAGATGATCGCCCAGTACAC
ATCTGCCCTGCTGGCCGGCACAATCACAAGCGGCTGGACATTTGGAGCTGGCGCCGCTC
TGCAGATCCCCTTTGCTATGCAGATGGCCTACCGGTTCAACGGCATCGGAGTGACCCAG
AATGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCTGATCGCCAACCAGTTCAACAGCGCCATCGGCAA
GATCCAGGACAGCCTGAGCAGCACAGCAAGCGCCCTGGGAAAGCTGCAGGACGTGGTCA
ACCAGAATGCCCAGGCACTGAACACCCTGGTCAAGCAGCTGTCCTCCAACTTCGGCGCC
ATCAGCTCTGTGCTGAACGATATCCTGAGCAGACTGGACAAGGTGGAAGCCGAGGTGCA
GATCGACAGACTGATCACCGGAAGGCTGCAGTCCCTGCAGACCTACGTTACCCAGCAGC
TGATCAGAGCCGCCGAGATTAGAGCCTCTGCCAATCTGGCCGCCACCAAGATGTCTGAG
TGTGTGCTGGGCCAGAGCAAGAGAGTGGACTTTTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAG
CTTCCCTCAGTCTGCCCCTCACGGCGTGGTGTTTCTGCACGTGACATATGTGCCCGCTC
AAGAGAAGAATTTCACCACCGCTCCAGCCATCTGCCACGACGGCAAAGCCCACTTTCCT
AGAGAAGGCGTGTTCGTGTCCAACGGCACCCATTGGTTCGTGACACAGCGGAACTTCTA
CGAGCCCCAGATCATCACCACCGACAACACCTTCGTGTCTGGCAACTGCGACGTCGTGA
TCGGCATTGTGAACAATACCGTGTACGACCCTCTGCAGCCCGAGCTGGACAGCTTCAAA
GAGGAACTGGACAAGTACTTTAAGAACCACACAAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGATAT
CAGCGGAATCAATGCCAGCGTCGTGAACATCCAGAAAGAGATCGACCGGCTGAACGAGG
TGGCCAAGAATCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAAGAACTGGGAAAATACGAGCAG
TACATCAAGTGGCCTTGGTACATCTGGCTGGGCTTTATCGCCGGACTGATTGCCATCGT
GATGGTCACAATCATGCTGTGTTGCATGACCAGCTGCTGTAGCTGCCTGAAGGGCTGTT
GTAGCTGTGGCAGCTGCTGCAAGTTCGACGAGGACGATTCTGAGCCCGTGCTGAAGGGC
GTGAAACTGCACTACACA

>pShuttle_E1.CMVdel134TO; SEQ ID NO: 217

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGACGTCATT
GTCGATGCTCTTCAGTCCGGTGTTTATGTCACAGATCAGCTGAGCGATCGC**GTTGACAT**
TGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATA
TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG
ACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT
GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA
TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA
GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACG
CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAG
TGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTC
AGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGA
TCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCTTGGTACCGGTGAATTCGCTAGC
GTTAACGGATCCTCTAGACGAGATCCGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAA
ATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTT
GTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCGATCGCAGGTAGGTTTGA
GTAGTGGGCGTGGCTAAGGAAGAGCATCATTGTCACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA
GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTG
ACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA
AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCT
CACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAC
GAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA
CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACT
AGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGT
TGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCA
AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC
AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAAGCCCAA
TCTGAATAATGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAA
ATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTT
TCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTAT
CGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAA
AATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCA
AAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCA
AAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAA
TACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGA
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGG
AATGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGAT
AAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCT
CATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCA
TCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGC
CCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTT
CCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTT
ATTGTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
GGGCCAGAGCTGCA

Note: Жирным: CMVdel134 промотор

>ID_6598_ pAd26.dE1.dE3.5orf6; SEQ ID NO: 218

CATCATCAATAATATACCCCACAAAGTAAACAAAAGTTAATATGCAAATGAGCTTTTGA
ATTTTAACGGTTTTGGGGCGGAGCCAACGCTGATTGGACGAGAAACGGTGATGCAAATG
ACGTCACGACGCACGGCTAACGGTCGCCGCGGAGGCGTGGCCTAGCCCGGAAGCAAGTC
GCGGGGCTGATGACGTATAAAAAAGCGGACTTTAGACCCGGAAACGGCCGATTTTCCCG
CGGCCACGCCCGGATATGAGGTAATTCTGGGCGGATGCAAGTGAAATTAGGTCATTTTG
GCGCGAAAACTGAATGAGGAAGTGAAAAGCGAAAAATACCGGTCCCTCCCAGGGCGGAA
TATTTACCGAGGGCCGAGAGACTTTGACCGATTACGTGGGGGTTTCGATTGCGGTGTTT
TTTTCGCGAATTTCCGCGTCCGTGTCAAAGTCCGGTGTTTATGTCACAGATCAGCTGAg
cgatcgcAGGTAGGTTTGAGTAGTGGGCGTGGCTAAGGTGACTATAAAGGCGGGTGTCT
TACGAGGGTCTTTTTGCTTTTCTGCAGACATCATGAACGGGACTGGCGGGGCCTTCGAA
GGGGGGCTTTTTAGCCCTTATTTGACAACCCGCCTGCCGGGATGGGCCGGAGTTCGTCA
GAATGTGATGGGATCGACGGTGGATGGGCGCCCAGTGCTTCCAGCAAATTCCTCGACCA
TGACCTACGCGACCGTGGGGAACTCGTCGCTCGACAGCACCGCCGCAGCCGCGGCAGCC
GCAGCCGCCATGACAGCGACGAGACTGGCCTCGAGCTACATGCCCAGCAGCGGTAGTAG
CCCCTCTGTGCCCAGTTCCATCATCGCCGAGGAGAAACTGCTGGCCCTGCTGGCCGAGC
TGGAAGCCCTGAGCCGCCAGCTGGCCGCCCTGACCCAGCAGGTGTCCGAGCTCCGCGAA
CAGCAGCAGCAGCAAAATAAATGATTCAATAAACACAGATTCTGATTCAAACAGCAAAG
CATCTTTATTATTTATTTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGTCCACCTCTCCCGATCATT
GAGAGTGCGGTGGATTTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGATTGGATGTTGAGGTACA
TGGGCATGAGCCCGTCCCGTGGGTGGAGGTAGCACCACTGCATGGCCTCGTGCTCTGGG
GTCGTGTTGTAGATGATCCAGTCATAGCAGGGGCGCTGGGCGTGGTGCTGGATGATGTC
CTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGGAGCCCCTTGGTGTAGGTGTTGGCAAAACGGT
TGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGATGTGCAGTTTGGCCTGGATCTTGAGG
TTGGCGATGTTGCCACCCAGATCCCGCCGGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACCAGAAC
GGTGTAGCCCGTGCACTTGGGGAACTTGTCATGCAACTTGGAAGGGAATGCGTGGAAGA
ATTTGGAGACGCCCTTGTGCCCGCCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCA
ATGGGCCCGTGGGCTGCGGCTTTGGCAAAGACGTTTCTGGGGTCAGAGACATCGTAATT
ATGCTCCTGGGTGAGATCATCATAAGACATTTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCAG
ATTGGGGGACGATGGTTCCCTCGGGCCCCGGGGCGAAGTTCCCCTCGCAGATCTGCATC
TCCCAGGCTTTCATCTCGGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATGAAAAAAAC
GGTTTCCGGGGCGGGGGTGATGAGCTGCGAGGAGAGCAGGTTTCTCAACAGCTGGGACT
TGCCGCACCCGGTCGGGCCGTAGATGACCCCGATGACGGGTTGCAGGTGGTAGTTCAAG
GACATGCAGCTGCCGTCGTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTGAGCTTGTCTCTGAC
TTGGAGGTTTTCCCGGACGAGCTCGCCGAGGAGGCGGTCCCCGCCCAGCGAGAGAAGCT
CTTGCAGGGAAGCAAAGTTTTTCAGGGGCTTGAGCCCGTCGGCCATGGGCATCTTGGCG
AGGGTCTGCGAGAGGAGCTCCAGGCGGTCCCAGAGCTCGGTGACGTGCTCTACGGCATC
TCGATCCAGCAGACTTCCTCGTTTCGGGGGTTGGGACGACTGCGACTGTAGGGCACGAG
ACGATGGGCGTCCAGCGCGGCCAGCGTCATGTCCTTCCAGGGTCTCAGGGTCCGCGTGA
GGGTGGTCTCCGTCACGGTGAAGGGGTGGGCCGCGGGCTGGGCGCTTGCAAGGGTGCGC
TTGAGACTCATCCTGCTGGTGCTGAAACGGGCACGGTCTTCGCCCTGCGCGTCGGCGAG
ATAGCAGTTGACCATGAGCTCGTAGTTGAGGGCCTCGGCGGCGTGGCCCTTGGCGCGGA
GCTTGCCCTTGGAAGAGCGCCCGCAGGCGGGACAGAGGAGGGATTGCAGGGCGTAGAGC
TTGGGCGCGAGAAAGACGGACTCGGGGGCGAAGGCGTCCGCTCCGCAGTGGGCGCAGAC
GGTCTCGCACTCGACTAGCCAGGTGAGCTCGGGCTGCTCGGGGTCAAAAACCAGTTTTC
CCCCGTTCTTTTTGATGCGCTTCTTACCTCGCGTCTCCATGAGTCTGTGTCCGCGCTCG
GTGACAAACAGGCTGTCTGTGTCCCCGTAGACGGACTTGATGGGCCTGTCCTGCAGGGG
CGTCCCGCGGTCCTCCTCGTAGAGAAACTCAGACCACTCTGAGACGAAGGCGCGCGTCC

ACGCCAAGACAAAGGAGGCCACGTGCGAGGGGTAGCGGTCGTTGTCCACCAGGGGGTCC
ACCTTTTCCACGGTATGCAGGCACATGTCCCCCTCCTCCGCATCCAAGAAGGTGATTGG
CTTGTAGGTGTAGGCCACGTGACCTGGGGTTCCCGACGGGGGGGTATAAAAGGGGGCGG
GTCTGTGCTCGTCCTCACTCTCTTCCGCGTCGCTGTCCACGAGCGCCAGCTGTTGGGGT
AGGTATTCCCTCTCAAGAGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAGTTTCTAGAAA
CGAGGAGGATTTGATGTGGGCCTGCCCTGCCGCGATGCTTTTTAGGAGACTTTCATCCA
TCTGGTCAGAAAAGACTATTTTTTTATTGTCAAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCATAGAGG
GCGTTTGAGAGAAGCTTGGCGATGGATCTCATGGTCTGATTTTTGTCACGGTCGGCGCG
CTCCTTGGCCGCGATGTTGAGCTGGACATATTCGCGCGCGACACACTTCCATTCGGGGA
AGACGGTGGTGCGCTCGTCGGGCACGATCCTGACGCGCCAGCCGCGGTTATGCAGGGTG
ACCAGGTCCACGCTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCGTTGGTCCAGCAGAGTCT
GCCGCCCTTGCGCGAGCAGAACGGGGGCAGCACATCAAGCAGATGCTCGTCAGGGGGGT
CCGCATCGATGGTGAAGATGCCCGGACAGAGTTCCTTGTCAAAATAATCGATTTTTGAG
GATGCATCGTCCAAGGCCATCTGCCACTCGCGGGCGGCCAGCGCTCGCTCGTAGGGGTT
GAGGGGCGGACCCCAAGGCATGGGATGCGTGAGGGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGT
CATAGACATAGATGGGCTCCGAGAGGATGCCGATGTAGGTGGGATAGCAGCGCCCCCCG
CGGATGCTTGCGCGCACGTAGTCATACAACTCGTGCGAGGGGGCCAAGAAGGCGGGGCC
GAGATTGGTGCGCTGGGGCTGCTCGGCGCGGAAGACGATCTGGCGAAAGATGGCGTGCG
AGTTGGAGGAGATGGTGGGCCGTTGGAAGATGTTAAAGTGGGCGTGAGGCAGGCGGACC
GAGTCGCGGATGAAGTGCGCGTAGGAGTCTTGCAGCTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGAC
GAGGACGTCCATGGCGCAGTAGTCCAGCGTTTCGCGGATGATGTCATAACTCGCCTCTC
CTTTCTTCTCCCACAGCTCGCGGTTGAGGGCGTATTCCTCGTCATCCTTCCAGTACTCC
CGGAGCGGGAATCCTCGATCGTCCGCACGGTAAGAGCCCAGCATGTAGAAATGGTTCAC
GGCCTTGTAGGGACAGCAGCCCTTCTCCACGGGGAGGGCGTAAGCTTGAGCGGCCTTGC
GGAGCGAGGTGTGCGTCAGGGCAAAGGTGTCCCTGACCATGACTTTCAAGAACTGGTAC
TTGAAGTCCGAGTCGTCGCAGCCGCCGTGCTCCCAGAGCTCGAAATCGGTGCGCTTCTT
CGAGAGGGGGTTAGGCAGAGCGAAAGTGACGTCATTGAAGAGAATCTTGCCTGCCCGCG
GCATGAAATTGCGGGTGATGCGGAAAGGGCCCGGGACGGAGGCTCGGTTGTTGATGACC
TGGGCGGCGAGGACGATCTCGTCAAAGCCGTTGATGTTGTGCCCGACGATGTAGAGTTC
CATGAATCGCGGGCGGCCTTTGATGTGCGGCAGCTTTTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGGT
CCTCGGGGCATTGCAGGCCGTGCTGCTCGAGCGCCCACTCCTGGAGATGTGGGTTGGCT
TGCATGAAGGAAGCCCAGAGCTCGCGGGCCATGAGGGTCTGGAGCTCGTCGCGAAAGAG
GCGGAACTGCTGGCCCACGGCCATCTTTTCTGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGAGGGGGT
CCCGCTCCCAGCGATCCCAGCGTAAACGCACGGCGAGATCGCGAGCGAGGGCGACCAGC
TCTGGGTCCCCGGAGAATTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGA
CCCCATCCAGGTGTAGGTTTCTACATCGTAGGTGACAAAGAGCCGCTCCGTGCGAGGAT
GAGAGCCGATTGGGAAGAACTGGATTTCCTGCCACCAGTTGGACGAGTGGCTGTTGATG
TGATGAAAGTAGAAATCCCGCCGGCGAACCGAGCACTCGTGCTGATGCTTGTAAAAGCG
TCCGCAGTACTCGCAGCGCTGCACGGGCTGTACCTCATCCACGAGATACACAGCGCGTC
CCTTGAGGAGGAACTTCAGGAGTGGCGGCCCTGGCTGGTGGTTTTCATGTTCGCCTGCG
TGGGACTCACCCTGGGGCTCCTCGAGGACGGAGAGGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGCCA
GGTCCAGATCTCGGCGCGGCGGGGGCGGAGAGCGAAGACGAGGGCGCGCAGTTGGGAGC
TGTCCATGGTGTCGCGGAGATCCAGGTCCGGGGGCAGGGTTCTGAGGTTGACCTCGTAG
AGGCGGGTGAGGGCGTGCTTGAGATGCAGATGGTACTTGATTTCTACGGGTGAGTTGGT
GGTCGTGTCCACGCATTGCATGAGCCCGTAGCTGCGCGGGGCCACGACCGTGCCGCGGT
GCGCTTTTAGAAGCGGTGTCGCGGACGCGCTCCCGGCGGCAGCGGCGGTTCCGGCCCCG
CGGGCAGGGGCGGCAGAGGCACGTCGGCGTGGCGCTCGGGCAGGTCCCGGTGCTGCGCC
CTGAGAGCGCTGGCGTGCGCGACGACGCGGCGGTTGACATCCTGGATCTGCCGCCTCTG
CGTGAAGACCACGGGCCCCGTGACTTTGAACCTGAAAGACAGTTCAACAGAATCAATCT
CTGCGTCATTGACGGCGGCCTGACGCAGGATCTCTTGCACGTCGCCCGAGTTGTCCTGG
TAGGCGATCTCGGACATGAACTGTTCGATCTCCTCCTCCTGGAGATCGCCGCGGCCCGC

GCGCTCCACGGTGGCGGCGAGGTCATTGGAGATGCGACCCATGAGCTGCGAGAAGGCGC
CCAGGCCGCTCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGTCCCCGTCGGCGTCGCGCGCG
CGCATGACCACCTGCGCGAGGTTGAGCTCCACGTGCCGCGCAAAGACGGCGTAGTTGCG
CAGGCGCTGGAAGAGGTAGTTGAGGGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAGTACA
TGATCCAGCGGCGCAGGGGCATCTCGCTGATGTCGCCGATGGCTTCCAGCCTTTCCATG
GCCTCGTAGAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAAACTGGGCGTTGCGGGCCGAGACCGTGAG
CTCGTCTTCCAGGAGCCGGATGAGTTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAAT
CCCCGGGGGCCTCCTCCTCTTCCTCTTCTTCCATGACGACCTCTTCTTCTATTTCTTCC
TCTGGGGGCGGTGGTGGTGGCGGGGGCCGACGACGACGGCGACGCACCGGGAGACGGTC
GACGAAGCGCTCGATCATCTCCCCGCGGCGGCGACGCATGGTTTCGGTGACGGCGCGAC
CCCGTTCGCGAGGACGCAGCGTGAAGACGCCGCCGGTCATCTCCCGGTAATGGGGCGGG
TCCCCATTGGGCAGCGATAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCGGTGTAGGGGA
CGTGAGCGCGTCGAGATCGACCGGATCGGAGAATCTTTCGAGGAAAGCGTCTAGCCAAT
CGCAGTCGCAAGGTAAGCTCAAACACGTAGCAGCCCTGCGGACGCTGTTAGAATTGCGG
TTGCTGATGATGTAATTGAAGTAGGCGTTTTTGAGGCGGCGGATGGTGGCGAGGAGGAC
CAGGTCCTTGGGTCCAGCTTGCTGGATGCGGAGCCGCTCGGCCATGCCCCAGGCCTGGC
CCTGACACCGGCTCAGGTTCTTGTAGTAGTCATGCATGAGCCTCTCAATGTCATCACTG
GCTGAGGCGGAGTCTTCCATGCGGGTGACCCCGACGCCCCTGAGCGGCTGCACGAGCGC
CAGGTCGGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCCTGTTGCACGCGGGTGAGGGTGTCCT
GGAAGTCGTCCATGTCGACGAAGCGGTGATAGGCCCCGGTGTTGATGGTGTAGGTGCAG
TTGGCCATGAGCGACCAGTTGACGGTCTGCAGGCCTGGCTGCACGACCTCGGAGTACCT
GAGCCGCGAGAAGGCGCGCGAGTCGAAGACGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACGAGGTACT
GGTATCCGACTAGGAAGTGCGGCGGCGGCTGGCGGTAGAGCGGCCAGCGCTGGGTGGCC
GGCGCGCCCGGGGCCAGGTCCTCGAGCATGAGGCGGTGGTAGCCGTAGAGGTAGCGGGA
CATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCC
AGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAATAGTCCATGGTCGGCACGGTCTGGCCGGTGAGACGC
GCGCAGTCATTGACGCTCTAGAGGCAAAAACGAAAGCGGTTGAGCGGGCTCTTCCTCCG
TAGCCTGGCGGAACGCAAACGGGTTAGGCCGCGTGTGTACCCCGGTTCGAGTCCCCTCG
AATCAGGCTGGAGCCGCGACTAACGTGGTATTGGCACTCCCGTCTCGACCCGAGCCCGA
TAGCCGCCAGGATACGGCGGAGAGCCCTTTTTGCCGGCCGAGTGGGGTCGCTAGACTTG
AAAGCGACCGAAAACCCtGCCGGGTAGTGGCTCGCGCCCGTAGTCTGGAGAAGCATCGC
CAGGGTTGAGTCGCGGCAGAACCCGGTTCGAGGACGGCCGCGGCGAGCGGGACTTGGTC
ACCCCGCCGATATAAAGACCCACAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGGAGCGAGCCCC
CTTTTTTCTTTTTGCCAGATGCATCCCGTCCTGCGCCAAATGCGTCCCACCCCCCCGGC
GACCACCGCGACCGCGGCCGTAGCAGGCGCCGGCGCTAGCCAGCCACCACAGACAGAGA
TGGACTTGGAAGAGGGCGAAGGGCTGGCAAGACTGGGGGCGCCGTCCCCGGAGCGACAT
CCCCGCGTGCAGCTGCAGAAGGACGTGCGCCCGGCGTACGTGCCTACGCAGAACCTGTT
CAGGGACCGCAGCGGGGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGACTGCCGGTTTCGGGCGGGCA
GGGAGCTGCGCGAGGGCCTGGACCGCCAGCGCGTGCTGCGCGACGAGGATTTCGAGCCG
AACGAGCAGACGGGGATCAGCCCCGCACGCGCGCACGTGGCGGCAGCCAACCTGGTGAC
GGCCTACGAGCAGACGGTGAAGCAGGAGCGCAACTTCCAAAAGAGTTTCAACAACCACG
TGCGCACCCTGATCGCGCGCGAGGAGGTGGCCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTG
GCGGAGGCCATCGTGCAGAACCCGGACAGCAAGCCTCTGACGGCGCAGCTGTTCCTGGT
GGTGCAGCACAGCAGGGACAACGAGGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAACATCGCCGAGC
CCGAGGGTCGCTGGCTGCTGGAGCTGATTAACATCTTGCAGAGCATCGTAGTGCAGGAG
CGCAGCCTGAGCCTGGCCGAGAAGGTGGCGGCGATCAACTACTCGGTGCTGAGCCTGGG
CAAGTTTTACGCGCGCAAGATTTACAAGACGCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGA
AGATAGACAGCTTTTACATGCGCATGGCGCTCAAGGTGCTGACGCTGAGCGACGACCTg
GGCGTGTACCGCAACGACCGCATCCACAAGGCCGTGAGCACGAGCCGGCGGCGCGAGCT
GAGCGACCGCGAGCTGATGCTGAGTCTGCGCCGGGCGCTGGTAGGGGGCGCCGCCGGCG
GCGAGGAGTCCTACTTCGACATGGGTGCGGACCTGCATTGGCAGCCGAGCCGGCGCGCC

TTGGAGGCCGCCTACGGTTCAGAGGACTTGGATGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAGGATGC
ACCCGCTGCGGGGTACTGACGCCTCCGTGATGTGTTTTTAGATGTCCCAGCAAGCCCCG
GACCCCGCCATAAGGGCGGCGCTGCAAAGCCAGCCGTCCGGTCTAGCATCGGACGACTG
GGAGGCCGCGATGCAACGCATCATGGCCCTGACGACCCGCAACCCCGAGTCCTTTAGAC
AACAGCCGCAGGCCAACAGACTCTCGGCCATTCTGGAGGCGGTGGTCCCCTCTCGGACC
AACCCCACGCACGAGAAGGTGCTGGCGATCGTGAACGCGCTGGCGGAGAACAAGGCCAT
CCGTCCCGACGAGGCCGGGCTGGTGTACAACGCCCTGCTGGAGCGCGTGGGCCGCTACA
ACAGCACGAACGTGCAGTCCAACCTGGATCGGCTGGTGACGGACGTGCGCGAGGCCGTG
GCGCAGCGCGAGCGGTTCAAGAACGAGGGCCTGGGCTCGCTGGTGGCGCTGAACGCCTT
CCTGGCgACGCAGCCGGCGAACGTGCCGCGCGGGCAGGACGATTACACCAACTTTATCA
GCGCGCTGCGGCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACCAGTCTGGCCCG
GACTACTTTTTCCAGACGAGCCGGCAGGGCTTGCAGACGGTGAACCTGAGCCAGGCTTT
CAAGAATCTGCGCGGGCTGTGGGGCGTGCAGGCGCCCGTGGGCGACCGGTCAACGGTGA
GCAGCTTGCTGACGCCCAACTCGCGGCTGCTGCTGCTGCTGATCGCGCCCTTCACCGAC
AGCGGCAGCGTGAACCGCAACTCGTACCTGGGCCATCTGCTGACGCTGTACCGCGAGGC
CATAGGCCAGGCGCAGGTGGACGAGCAGACCTTCCAGGAGATCACTAGCGTGAGCCGCG
CGCTGGGGCAGAACGACACCGACAGTCTGAGGGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAAT
AGACAGCAGAAGATCCCGGCGCAGTACGCACTGTCGGCCGAGGAGGAAAGGATTCTGAG
ATATGTGCAGCAGAGCGTAGGGCTGTTCCTGATGCAGGAGGGTGCCACCCCCAGCGCCG
CGCTGGACATGACCGCGCGCAACATGGAACCTAGCATGTACGCCGCCAACCGGCCGTTC
ATCAATAAGCTGATGGACTACTTGCACCGCGCGGCGGCCATGAACACGGACTACTTTAC
CAACGCCATCCTGAACCCGCACTGGCTCCCGCCGCCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACG
ACATGCCCGACCCCAACGACGGGTTCCTGTGGGACGACGTGGACAGCGCGGTGTTCTCG
CCGACCTTTCAAAAGCGCCAGGAGGCGCCGCCGAGCGAGGGCGCGGTGGGGAGGAGCCC
CTTTCCTAGCTTAGGGAGTTTGCATAGCTTGCCGGGCTCGGTGAACAGCGGCAGGGTGA
GCCGGCCGCGCTTGCTGGGCGAGGACGAGTACCTGAACGACTCGCTGCTGCAGCCGCCG
CGGGCCAAGAACGCCATGGCCAATAACGGGATAGAGAGTCTGGTGGACAAACTGAACCG
CTGGAAGACCTACGCTCAGGACCATAGGGACGCGCCCGCGCCGCGGCGACAGCGCCACG
ACCGGCAGCGGGGCCTGGTGTGGGACGACGAGGACTCGGCCGACGATAGCAGCGTGTTG
GACTTGGGCGGGAGCGGTGGGGTCAACCCGTTCGCGCATCTGCAGCCCAAACTGGGGCG
ACGGATGTTTTGAATGAAATAAAACTCACCAAGGCCATAGCGTGCGTTCTCTTCCTTGT
TAGAGATGAGGCGCGCGGTGGTGTCTTCCTCTCCTCCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATG
GCGCAGGCGACCCTGGAGGTTCCGTTTGTGCCTCCGCGGTATATGGCTCCTACGGAGGG
CAGAAACAGCATTCGTTACTCGGAGCTGGCTCCGCAGTACGACACCACTCGCGTGTACT
TGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCTTCCCTGAACTACCAAAACGACCACAGCAAC
TTCCTGACCACGGTGGTGCAGAACAACGATTTCACCCCCGCCGAGGCCAGCACGCAGAC
GATAAATTTTGACGAGCGGTCGCGGTGGGGCGGTGATCTGAAGACCATTCTGCACACTA
ACATGCCCAATGTGAACGAGTACATGTTCACCAGCAAGTTTAAGGCGCGGGTGATGGTG
TCTAGGAAGCATCCAGAGGGGGTAGTTGAAACAGATTTGAGTCAGGATAAGCTTGAATA
TGAGTGGTTTGAGTTTACCCTGCCCGAGGGAAACTTTTCCGAGACCATGACCATAGACC
TGATGAACAACGCCATCTTGGAAAACTACTTGCAAGTGGGGCGGCAGAATGGCGTGCTG
GAGAGCGATATCGGAGTCAAGTTTGACAGCAGAAATTTCAAGCTGGGCTGGGACCCGGT
GACCAAGCTGGTGATGCCAGGGGTCTACACCTACGAGGCCTTCCACCCGGACGTGGTGC
TGCTGCCGGGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTGAGCAACCTCCTGGGCATT
CGCAAGAAGCAACCTTTCCAAGAGGGCTTCAGAATCATGTATGAGGATCTAGAAGGTGG
CAACATCCCCGCCCTCCTTGATGTGCCCAAGTACTTGGAAAGCAAGAAGAAAGTTGAAG
ACGAAACTAAAAATGCAGCTGCGGCCACAGCCGATACAACCACTAGGGGTGATACATTT
GCAACTCCAGCGCAAGAGACAGCAGCTGATAAGAAGGTAGAAGTCTTGCCCATTGAAAA
GGATGAGAGTGGTAGAAGTTACAACCTGATCCAGGGGACCCACGACACGCTGTACCGCA
GTTGGTACCTGTCCTATACCTACGGGGACCCCGAGAAGGGGGTGCAGTCGTGGACGCTG
CTCACCACCCCGGACGTTACCTGCGGCGCGGAGCAAGTCTACTGGTCACTGCCGGACCT

CATGCAAGACCCCGTCACCTTCCGCTCCACCCAGCAAGTCAGCAACTACCCCGTGGTCG
GCGCCGAGCTCATGCCCTTCCGCGCCAAGAGCTTTTACAACGACCTCGCCGTCTACTCC
CAGCTCATCCGCAGCTACACCTCCCTCACCCACGTCTTCAACCGCTTCCCCGACAACCA
GATCCTCTGCCGCCCGCCCGCGCCCACCATCACCACCGTCAGTGAAAACGTGCCTGCTC
TCACAGATCACGGGACGCTACCGCTGCGCAGCAGTATCCGCGGAGTCCAGCGAGTGACC
GTCACTGACGCCCGTCGCCGCACCTGTCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGC
GCCGCGCGTGCTTTCCAGTCGCACCTTCTAAAAAAATGTCTATTCTCATCTCGCCCAGC
AATAACACCGGCTGGGGTCTTACTAGACCCAGCACCATGTACGGAGGAGCCAAGAAGCG
CTCCCAGCAGCACCCCGTCCGCGTCCGCGGCCACTTCCGCGCTCCCTGGGGCGCaTACA
AGCGCGGGCGGACTTCCACCGCCGCCGTGCGCACCACCGTCGACGACGTCATCGACTCG
GTGGTCGCCGACGCGCGCAACTAtACcCCCGCCCCCTCCACCGTGGACGCGGTCATCGA
CAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCGACTATGCCAGACGCAAGAGCCGGCGGCGACGGATCG
CCAGGCGCCACCGGAGCACGCCCGCCATGCGCGCCGCCCGGGCTCTGCTGCGCCGCGCC
AGACGCACGGGCCGCCGGGCCATGATGCGAGCCGCGCGCCGCGCTGCCACTGCACCCAC
CCCCGCAGGCAGGACTCGCAGACGAGCGGCCGCCGCCGCCGCTGCGGCCATCTCTAGCA
TGACCAGACCCAGGCGCGGAAACGTGTACTGGGTGCGCGACTCCGTCACGGGCGTGCGC
GTGCCCGTGCGCACCCGTCCTCCTCGTCCCTGATCTAATGCTTGTGTCCTCCCCCGCAA
GCGACGATGTCAAAGCGCAAAATCAAGGAGGAGATGCTCCAGGTCGTCGCCCCGGAGAT
TTACGGACCACCCCAGGCGGACCAGAAACCCCGCAAAATCAAGCGGGTTAAAAAAAAGG
ATGAGGTGGACGAGGGGGCAGTAGAGTTTGTGCGCGAGTTCGCTCCGCGGCGGCGCGTA
AATTGGAAGGGGCGCAGGGTGCAGCGCGTGTTGCGGCCCGGCACGGCGGTGGTGTTCAC
GCCCGGCGAGCGGTCCTCGGTCAGGAGCAAGCGTAGCTATGACGAGGTGTACGGCGACG
ACGACATCCTGGACCAGGCGGCGGAGCGGGCGGGCGAGTTCGCCTACGGGAAGCGGTCG
CGCGAAGAGGAGCTGATCTCGCTGCCGCTGGACGAAAGCAACCCCACGCCGAGCCTGAA
GCCCGTGACCCTGCAGCAGGTGCTGCCCCAGGCGGTGCTGCTGCCGAGCCGCGGGGTCA
AGCGCGAGGGCGAGAGCATGTACCCGACCATGCAGATCATGGTGCCCAAGCGCCGGCGC
GTGGAGGACGTGCTGGACACCGTGAAAATGGATGTGGAGCCCGAGGTCAAGGTGCGCCC
CATCAAGCAGGTGGCGCCGGGCCTGGGCGTGCAAACCGTGGACATTCAGATCCCCACCG
ACATGGATGTCGACAAAAAACCCTCGACCAGCATCGAGGTGCAAACCGACCCCTGGCTC
CCAGCCTCCACCGCTACCGTCTCCACTTCTACCGCCGCCACGGCTACCGAGCCTCCCAG
GAGGCGAAGATGGGGCGCCGCCAGCCGGCTGATGCCCAACTACGTGTTGCATCCTTCCA
TCATCCCGACGCCGGGCTACCGCGGCACCCGGTACTACGCCAGCCGCCGGCGCCCAGCC
AGCAAACGCCGCCGCCGCACCGCCACCCGCCGCCGTCTGGCCCCCGCCCGCGTGCGCCG
CGTGACCACGCGCCGGGGCCGCTCGCTCGTTCTGCCCACCGTGCGCTACCACCCCAGCA
TCCTTTAATcCGTGTGCTGTGATACTGTTGCAGAGAGATGGCTCTCACTTGCCGCCTGC
GCATCCCCGTCCCGAATTACCGAGGAAGATCCCGCCGCAGGAGAGGCATGGCAGGCAGC
GGCCTGAACCGCCGCCGGCGGCGGGCCATGCGCAGGCGCCTGAGTGGCGGCTTTCTGCC
CGCGCTCATCCCCATAATCGCCGCGGCCATtGGCACGATCCCGGGCATAGCTTCCGTTG
CGCTGCAGGCGTCGCAGCGCCGTTGATGTGCGAATAAAGCCTCTTTAGACTCTGACACA
CCTGGTCCTGTATATTTTTAGAATGGAAGACATCAATTTTGCGTCCCTGGCTCCGCGGC
ACGGCACGCGGCCGTTCATGGGCACCTGGAACGAGATCGGCACCAGCCAGCTGAACGGG
GGCGCCTTCAATTGGAGCAGTGTCTGGAGCGGGCTTAAAAATTTCGGCTCGACGCTCCG
GACCTATGGGAACAAGGCCTGGAATAGTAGCACGGGGCAGTTGTTGAGGGAAAAGCTCA
AAGACCAgAACTTCCAGCAGAAGGTGGTGGACGGGCTGGCCTCGGGCATTAACGGGGTG
GTGGACATCGCGAACCAGGCCGTGCAGCGCGAGATAAACAGCCGCCTGGACCCGCGACC
GCCCACGGTGGTGGAGATGGAAGATGCAACTCTTCCGCCGCCCAAgGGCGAgAAGCGGC
CGCGGCCCGACGCGGAGGAGACGATCCTGCAGGTGGACGAGCCGCCCTCGTACGAGGAG
GCCGTCAAGGCCGGCATGCCCACCACGCGCATCATCGCGCCGCTGGCCACGGGTGTAAT
GAAACCCGCCACCCTTGACCTGCCTCCACCACCCGCGCCCGCTCCACCGAAGGCAACTC
CGGTTGTGCAGGCCCCCCCGGTGGCGACCGCCGTGCGCCGCGTCCCCGCCCGCCGCCAG
GCCCAGAACTGGCAGAGCACGCTGCACAGTATCGTGGGCCTGGGAGTGAAAAGTCTGAA

GCGCCGCCGATGCTATTGAGAGAGAGGAAAGAGGACACTAAAGGGAGAGCTTAACTTGT
ATGTGCCTTACCGCCAGAGAACGCGCGAAGATGGCCACCCCCTCGATGATGCCGCAGTG
GGCGTACATGCACATCGCCGGGCAGGACGCCTCGGAGTACCTGAGCCCGGGTCTGGTGC
AGTTTGCCCGCGCCACCGACACGTACTTCAGCCTGGGCAACAAGTTTAGGAACCCCACG
GTGGCCCCGACCCACGATGTGACCACGGACCGGTCCCAGCGTCTGACGCTGCGCTTCGT
GCCCGTGGATCGCGAGGACACCACGTACTCGTACAAGGCGCGCTTCACTCTGGCCGTGG
GCGACAACCGGGTGCTAGACATGGCCAGCACTTACTTTGACATCCGCGGCGTCCTGGAC
CGCGGTCCCAGCTTCAAACCCTACTCGGGCACGGCCTACAACAGCCTGGCTCCCAAGGG
TGCCCCCAATCCCAGTCAGTGGGAAACAAAAGAAAAGCAAGGAACTACTGGAGGAGTGC
AGCAAGAAAAAGATGTCACAAAAACATTTGGTGTGGCTGCCACCGGCGGAATTAATATA
ACAAACCAGGGTCTGTTACTAGGAACTGACGAAACCGCTGAGAATGGCAAAAAAGACAT
TTATGCAGACAAGACTTTCCAGCCAGAACCTCAAGTTGGAGAAGAAAACTGGCAGGAAA
ATGAAGCCTTCTATGGAGGAAGGGCTCTTAAAAAGGACACTAAAATGAAACCATGCTAT
GGATCTTTTGCTAGACCTACTAATGAGAAAGGAGGTCAGGCAAAGTTCAAACCAGTTAA
TGAAGGAGAACAACCTAAAGATCTGGATATAGATTTTGCTTACTTTGACGTCCCTGGCG
GAAGTCCTCCAGCAGGTGGTAGTGGGGAAGAATACAAAGCAGATATAATTTTGTACACT
GAAAATGTTAATCTTGAAACACCAGACACTCATGTGGTTTACAAGCCAGGAACTTCAGA
TAACAGTTCAGAAATCAATCTGGTTCAGCAGTCCATGCCAAACAGACCCAACTACATTG
GCTTTAGGGACAACTTTGTAGGTCTCATGTATTACAACAGCACCGGAAATATGGGTGTG
CTGGCTGGTCAGGCTTCTCAGTTGAACGCTGTGGTCGACTTGCAAGACAGAAACACCGA
GTTATCTTACCAGCTATTGCTAGATTCTCTGGGTGACAGAACCAGATACTTTAGCATGT
GGAACTCTGCGGTGGACAGTTACGATCCAGATGTCAGGATCATTGAAAATCACGGTGTG
GAAGATGAACTTCCAAACTATTGCTTCCCATTGAATGGCACTGGAACCAATTCCACTTA
TCAAGGTGTAAAGATTACAAATGGTAATGATGGTGCTGAAGAAAGTGAGTGGGAGAAAG
ACGATGCAATTTCTAGACAAAACCAAATCTGCAAGGGCAATGTCTACGCCATGGAGATC
AACCTGCAGGCCAACCTGTGGAAGAGTTTTCTGTACTCGAACGTGGCCCTGTACCTGCC
CGACTCCTACAAGTACACGCCGGCCAACGTCAAGCTGCCCGCCAACACCAACACCTACG
AGTACATGAACGGCCGCGTGGTAGCCCCcTCgCTGGTGGACGCCTACATCAACATCGGC
GCCCGCTGGTCGTTGGACCCCATGGACAACGTCAACCCCTTCAACCACCACCGCAATGC
GGGCCTGCGCTACCGCTCCATGCTGCTGGGCAACGGCCGCTACGTGCCCTTCCACATCC
AAGTGCCCCAAAAGTTCTTTGCCATCAAGAACCTGCTCCTGCTCCCGGGCTCCTACACC
TACGAGTGGAACTTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGTTCCCTCGGCAACGA
CCTGCGCGTCGACGGCGCCTCCGTCCGCTTCGACAGCGTCAACCTATACGCCACTTTCT
TCCCCATGGCGCACAACACCGCTTCAACCTTGGAAGCCATGCTGCGCAACGACACCAAC
GACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCCGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAA
GGCCACCAACGTGCCCATCTCCATCCCATCGCGCAACTGGGCCGCCTTCCGCGGCTGGA
GTTTCACCCGGCTCAAGACCAAGGAAACTCCTTCCCTCGGCTCGGGTTTCGACCCCTAC
TTTGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGGACCTTCTACCTCAACCACACCTT
CAAGAAGGTCTCCATCATGTTCGACTCCTCGGTCAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTGC
TCACGCCGAACGAGTTCGAGATCAAGCGCAGCGTCGACGGGGAGGGCTACAACGTGGCC
CAATGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTCGTCCAGATGCTCTCCCACTACAACATCGG
CTACCAGGGCTTCCACGTGCCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCA
ACTTCCAGCCCATGAGCAGGCAGGTGGTCGATGAGATCAACTACAAGGACTACAAGGCC
GTCACCCTGCCCTTCCAGCACAATAACTCGGGCTTCACCGGCTACCTCGCACCCACCAT
GCGCCAGGGGCAGCCCTACCCCGCCAACTTCCCCTACCCGCTCATCGGTCAGACAGCCG
TGCCCTCCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCcTTC
TCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCCCTCACCGACCTGGGTCAGAACATGCTCTACGC
CAACTCGGCCCACGCGCTCGACATGACCTTCGAGGTGGACCCCATGGATGAGCCCACCC
TCCTCTATCTTCTCTTCGAAGTTTTCGACGTGGTCAGAGTACACCAGCCGCACCGCGGC
GTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACGCCCTTCTCCGCCGGCAACGCCACCACCTAAGC
ATGAGCGGCTCCAGCGAACGAGAGCTCGCGGCCATCGTGCGCGACCTGGGCTGCGGGCC

CTACTTTTTGGGCACCCACGACAAGCGCTTCCCGGGCTTTCTCGCCGGCGACAAGCTGG
CCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCCGCGAGACCGGAGGCGTGCACTGGCTCGCCTTC
GGCTGGAACCCGCGCTCGCGCACCTGCTACATGTTCGACCCCTTTGGGTTCTCGGACCG
CCGGCTCAAGCAGATTTACAGCTTCGAGTACGAGGCCATGCTGCGCCGCAGCGCCCTGG
CCTCCTCGCCCGACCGCTGTCTCAGCCTCGAGCAGTCCACTCAGACCGTGCAGGGGCCC
GACTCCGCCGCCTGCGGACTCTTCTGTTGCATGTTCTTGCATGCCTTCGTGCACTGGCC
CGACCGACCCATGGACGGAAACCCCACCATGAACTTGCTGACGGGGGTGCCCAACGGCA
TGCTACAATCGCCACAGGTGCTGCCCACCCTCAGGCGCAACCAGGAGGAACTCTACCGC
TTCCTCGCGCGCCACTCCCCTTACTTTCGCTCCCACCGCGCCGCCATCGAACACGCCAC
CGCTTTTGACAAAATGAAACAACTGCGTGTATCTCAATAAACAGCACTTTTATTTTACA
TGCACTGGAGTATATGCAAGTTATTTAAAAGTCGAAGGGGTTCTCGCGCTCGTCGTTGT
GCGCCGCGCTGGGGAGGGCCACGTTGCGGTACTGGTACTTGGGCTGCCACTTGAACTCG
GGGATCACCAGTTTGGGCACTGGGGTCTCGGGGAAGGTCTCGCTCCACATGCGCCGGCT
CATCTGCAGGGCGCCCAGCATGTCCGGGGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGGCCGG
TGCTCTGCGCGCGCGAGTTGCGGTACACGGGGTTGCAGCACTGGAACACCATCAGACTG
GGGTACTTCACACTAGCCAGCACGCTCTTGTCGCTGATCTGATCCTTGTCCAGATCCTC
GGCGTTGCTCAGGCCGAACGGGGTCATCTTGCACAGCTGGCGTCCCAGGAAGGGCACGC
TCTGAGGCTTGTGGTTACACTCGCAGTGCACGGGCATCAGCATCATCCCCGCGCCGCGC
TGCATATTCGGGTAGAGGGCCTTGACAAAGGCCGCGATCTGCTTGAAAGCTTGCTGGGC
CTTGGCCCCCTCGCTGAAAAACAGGCCGCAGCTCTTCCCGCTGAACTGGTTATTCCCAC
ACCCGGCATCCTGCACGCAGCAGCGCGCGTCATGGCTGGTCAGTTGCACCACGCTCCGT
CCCCAGCGGTTCTGGGTCACCTTAGCCTTGCTGGGCTGCTCCTTCAACGCGCGCTGCCC
GTTCTCGCTGGTCACATCCATCTCCACCACGTGGTCCTTGTGGATCATCATCGTCCCGT
GCAGACACTTGAGCTGGCCTTCCACCTCGGTGCAGCCGTGATCCCACAGGGCGCAACCG
GTGCACTCCCAGTTCTTGTGCGCAATCCCGCTGTGGCTGAAGATGTAACCTTGCAACAT
GCGGCCCATGATGGTGCTAAATGCTTTCTGGGTGGTGAAGGTCAGTTGCATCCCGCGGG
CCTCCTCGTTCATCCAGGTCTGGCACATCTTCTGGAAGATCTCGGTCTGCTCGGGCATG
AGCTTGTAAGCATCGCGCAGGCCGCTGTCGACGCGGTAGCGTTCCATCAGCACGTTCAT
GGTATCCATGCCCTTCTCCCAGGACGAGACCAGAGGCAGACTCAGAGGGTTGCGTACGT
TCAGGACACCGGGGGTCGCGGGCTCGACGATGCGTTTTCCGTCCTTGCCTTCCTTCAAT
AGAACCGGCGGCTGGCTGAATCCCACTCCCACGATCACGGCATCTTCCTGGGGCATCTC
TTCGTCGGGGTCTACCTTGGTCACATGCTTGGTCTTTCTGGCTTGCTTCTTTTTTGGAG
GGCTGTCCACGGGGAGCACGTCCTCCTCGGAAGACCCGGAGCCCACCCGCTGATACTTT
CGGCGCTTGGTGGGCAGAGGAGGTGGCGGCGAGGGGCTCCTCTCCTGCTCCGGCGGATA
GCGCGCCGACCCGTGGCCCCGGGGCGGAGTGGCCTCTCGGCCCATGAACCGGCGCACGT
CCTGACTGCCGCCGGCCATTGTTTCCTAGGGGAAGATGGAGGAGCAGCCGCGTAAGCAG
GAGCAGGAGGAGGACTTAACCACCCACGAGCAACCCAAAATCGAGCAGGACCTGGGCTT
CGAAGAGCCGGCTCGTCTAGAACCCCCACAGGATGAACAGGAGCACGAGCAAGACGCAG
GCCAGGAGGAGACCGACGCTGGGCTCGAGCATGGCTACCTGGGAGGAGAGGAGGATGTG
CTGCTGAAACACCTGCAGCGCCAGTCCCTCATCCTCCGGGACGCCCTGGCCGACCGGAG
CGAAACCCCCCTCAGCGTCGAGGAGCTGTGTCGGGCCTACGAGCTCAACCTCTTCTCGC
CGCGCGTACCCCCCAAACGCCAGCCCAACGGCACCTGCGAGCCCAACCCGCGTCTCAAC
TTCTATCCCGTCTTTGCGGTCCCCGAAGCCCTCGCCACCTATCACATCTTTTTCAAGAA
CCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCAGCGCCGACGCGCTCCTCGCTt
TGGGGCCCGGCGCGCGCATACCTGATATCGCTTCCCTGGAAGAGGTGCCCAAGATCTTC
GAAGGGCTCGGTCGGGACGAGACGCGCGCGGCGAACGCTCTGAAAGAAACAGCAGAGGA
AGAGGGTCACACTAGCGCCCTGGTAGAGTTGGAAGGCGACAACGCCAGGCTGGCCGTGC
TCAAGCGCAGCGTCGAGCTtACCCACTTCGCCTACCCCGCCGTCAACCTCCCGCCCAAG
GTCATGCGTCGCATCATGGATCAGCTCATCATGCCCCACATCGAGGCCCTCGATGAAAG
TCAGGAGCAGCGCCCCGAGGACGCCCGGCCCGTGGTCAGCGACGAGATGCTCGCGCGCT
GGCTCGGGACCCgCGACCCCCAGGCTTTGGAACAGCGGCGCAAaCTCATGCTGGCCGTG

GTCCTGGTcACCCTtGAGCTcGAATGCATGCGCCGCTTTtTTCAGCGACCCCGAGACCCT
GCGCAAGGTCGAGGAGACCCTGCACTACACTTTCAGgCACGGTTTCGTCAGGCAGGCCT
GCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCCTGCCTGGGGATCCTGCACGAG
AACCGCCTGGGcCAGACCGTGCTCCACTCTACCCTGAAGGGCGAGGCGCGGCGGGACTA
TGTCCGCGACTGCGTCTTTCTcTTTCTcTGCCACACATGGCAAGCgGCCATGGGCGTGT
GGCAgCAGTGTCTCGAGGACGAgAACCTaAAGGAGCTGGACAAGCTTCTTGCTAGAAAc
CTTAAAAAGCTGTGGACGGGCTTCGACGAGCGCACCGTCGCCTCGGACCTGGCCGAGAT
CGTcTTCCCCGAGCGCCTGAGaCAGACGCTGAAAGGCGGGCTGCCCGACTTCATGAGCC
AGAGCATGTTGCAAAACTACCGCACTTTCATTCTtGAGCGATCaGGcATcCTGCCCGCC
ACCTGCAACGCcTTCCCCTCCGACTTTGTaCCGCTGAGCTACCGCGAGTGTCCCCCGCC
GCTGTGGAGCCACTGCTACCTCTTGCAGCTGGCCAACTACATCGCCTACCACTCGGACG
TGATCGAGGACGTGAGCGGCGAGGGGCTGCTCGAGTGCCACTGtCGCTGCAACCTGTGC
TCCCCGCAtCGCTCCCTGGTCTGCAACCCCCAGCTcCTgAGCGAGACCCAGGTCATCGG
TACCTTcGAGCTGCAAGGTCCGCAGGAGTCCACCGCTCCGCTGAAACTCACGCCGGGGT
TGTGGACTTCCGCGTACCTGCGCAAATTTGTACCCGAaGACTACCACGCCCAtGAGATA
AAGTTCTTTtGAGGACCAATCGCGTCCGCAGCACGCGGATCTCACGGCCTGCGTCATCAC
CCAGGGCGCgATCCTCGCCCAATTGCACGCCATCCAAAAATCCCGCCAAGAGTTTCTTC
TGAAAAAGGGTAGAGGGGTCTACCTGGACCCCCAGACGGGCGAgGTGCTCAACCCGGGT
CTCCCCCAGCATGCCGAGGAAGAAGCAGGAGCCGCTAGTGGAGGAGATGGAAGAAGAAT
GGGACAGCCAGGCAGAGGAGGACGAATGGGAGGAGGAGACAGAGGAGGAAGAATTGGAA
GAGGTGGAAGAGGAGCAGGCAACAGAGCAGCCCGTCGCCGCACCATCCGCGCCGGCAGC
CCCGCCGGTCACGGATACAACCTCCGCTCCGGtCAAGCCTCCTCGTAGATGGGATCaAG
TGAAGGGTGACGGTAAGCACGAGCGGCAGGGCTACCGATCATGGAGGGCCCACAAAGCC
GCGATCATCGCCTGCTTGCAAGACTGCGGGGGGAACATCGCTTTCGCCCGCCGCTACCT
GCTCTTCCACCGCGGGGTgAACATCCCCCGCAACGTGTTGCATTACTACCGTCACCTTC
ACAGCTAAGAAAAAGCAAGTcAAAGGAGTCGCCGGAGGAGGAGgagGaggCCTGAGGAT
CGCGGCGAACGAGCCCTTGACCACCAGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTCCCCACTCTTT
ATGCCATTTTTCAGCAGAGTCGAGGTCAGCAGCAAGAGCTCAAAGTAAAAAACCGGTCT
CTGCGCTCGCTCACCCGCAGTTGCTTGTACCACAAAAACGAAGATCAGCTGCAGCGCAC
TCTCGAAGACGCCGAGGCTCTGTTCCACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGACTAAG
GCGCGCCCACCCGGAAAAAAGGCGGGAATTACCTCATCGCCACCATGAGCAAGGAGATT
CCCACCCCTTACATGTGGAGCTATCAGCCCCAAATGGGCCTGGCCGCGGGCGCCTCCCA
GGACTACTCCACCCGCATGAACTGGCTCAGTGCCGGCCCCTCGATGATCTCACGGGTCA
ACGGGGTCCGCAGTCATCGAAACCAGATATTGTTGGAGCAGGCGGCGGTCACCTCCACG
CCCAGGGCAAAGCTCAACCCGCGTAATTGGCCCTCCACCCTGGTGTATCAGGAAATCCC
CGGGCCGACTACCGTACTACTTCCGCGTGACGCACTGGCCGAAGTCCGCATGACTAACT
CAGGTGTCCAGCTGGCCGGCGGCGCTTCCCGGTGCCCGCTCCGCCCACAATCGGGTATA
AAAACCCTGGTGATCCGAGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGTTGGTGAGCTCTTC
GATCGGTCTGCGACCGGACGGAGTGTTCCAACTAGCCGGAGCCGGGAGATCCTCCTTCA
CTCCCAACCAGGCCTACCTGACCTTGCAGAGCAGCTCTTCGGAGCCTCGCTCCGGAGGC
ATCGGAACCCTCCAGTTTGTGGAGGAGTTTGTGCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTC
GGGATCGCCAGGCCTCTACCCGGACGAGTTCATACCGAACTTCGACGCAGTGAGAGAAG
CGGTGGACGGCTACGACTGAATGTCCCATGGTGACTCGGCTGAGCTCGCTCGGTTGAGG
CATCTGGACCACTGCCGCCGCCTGCGCTGCTTCGCCCGGGAGAGCTGCGGACTCATCTA
CTTTGAGTTTCCCGAGGAGCACCCCAACGGCCCTGCACACGGAGTGCGGATCACCGTAG
AGGGCACCACCGAGTCTCACCTGGTCAGGTTCTTCACCCAGCAACCCTTCCTGGTCGAG
CGGGACCGGGGCGCCACCACCTACACCGTCTACTGCATCTGTCCAACCCCGAAGTTGCA
TGAGAATTTTTGTTGTACTCTTTGTGGTGAGTTTAATAAAAGCTAAACTCTTGCAATAC
TCTGGACCTTGTCGTCGTCAACTCAACGAGACCGTCTACCTCACCAACCAGACTGAGGT
AAAACTCACCTGCAGACCACACAAGACCTATATCATCTGGTTCTTCGAGAACACCTCAT
TTGCAGTCTCCAACACTCACTGCActagtCCATGAACTGATGTTGATTAAAAGCCCAAA

AACCAATCAGCCCCTTCCCCCATTTCCCCATCCCCCAATTACTCATAAAAAATAAATCA
TTGGAATTAATCATTCAATAAAGATCACTTACTTGAAATCTGAAAGTATGTCTCTGGTG
TAGTTGTTCAGCAGCACCTCGGTACCCTCCTCCCAGCTCTGGTACTCCAGTCCCCGGCG
GGCGGCGAACTTCCTCCACACCTTGAAAGGGATGTCAAATTCCTGGTCCACAATTTTCA
TTGTCTTCCCTCTCAGATGGCAAAGAGGCTCCGGGTGGAAGATGACTTCAACCCCGTCT
ACCCCTATGGCTACGCGCGGAATCAGAATATCCCCTTCCTCACTCCCCCCTTTGTCTCC
TCCGATGGATTCAAAAACTTCCCCCCTGGGGTCCTGTCACTTAAACTGGCTGATCCAAT
CACCATCAACAATGGGGATGTCTCACTTAAGGTGGGAGGGGGACTTGCTGTAGAGCAAC
AGACTGGTAACCTAAGCGTAAACCCTGATGCACCCTTGCAAGTTGCAAGTGATAAGCTA
CAGCTTGCTCTGGCTCCTCCATTCGAGGTCAGAGATGGAAAGCTTGCTTTAAAGGCAGG
TAATGGATTAAAAGTACTAGATAATTCCATTACTGGATTGACTGGATTATTGAATACAC
TTGTGGTATTAACTGGAAGGGGAATAGGAACGGAGGAATTAAAAAATGACGATGGTGTA
ACAAACAAAGGAGTCGGCTTGCGTGTAAGACTTGGAGATGACGGCGGGCTGACATTTGA
TAAAAAGGGTGATTTAGTAGCCTGGAATAAAAAAGATGACAGGCGCACCCTGTGGACAA
CCCCTGACACATCTCCAAATTGCAAAATGAGTACAGAAAAGGATTCTAAACTTACGTTG
ACACTTACAAAGTGTGGAAGTCAGGTTCTGGGAAATGTATCTTTACTTGCAGTTACAGG
TGAATATCATCAAATGACTGCTACTACAAAGAAGGATGTAAAAATATCTTTACTATTTG
ATGAGAATGGAATTCTATTACCATCTTCGTCCCTTAGCAAAGATTATTGGAATTACAGA
AGTGATGATTCTATTGTATCTCAAAAATATAATAATGCAGTTCCATTCATGCCAAACCT
GACAGCTTATCCAAAACCAAGCGCTCAAAATGCAAAAAACTATTCAAGAACTAAAATCA
TAAGTAATGTCTACTTAGGTGCTCTTACCTACCAACCTGTAATTATCACTATTGCATTT
AATCAGGAAACTGAAAATGGATGTGCTTATTCTATAACATTTACCTTCACTTGGCAAAA
AGACTATTCTGCCCAACAGTTTGATGTTACATCTTTTACCTTCTCATATCTTACCCAAG
AGAACAAAGACAAAGACTAATAAAATGTTTTGAACTGAATTTATGAATCTTTATTTATT
TTTACACCAGCACGGGTAGTCAGTTTCCCACCACCAGCCCATTTcacagtgtaaacAGT
CCTTTCTCCCCGGCTGGCCTTAAAAAGCATCATATCATGGGTAACAGACATATTCTTAG
GTGTTATATTCCACACGGTTTCCTGTCGAGCCAAACGCTCATCAGTGATATTAATAAAC
TCCCCGGGCAGCTCACTTAAGTTCATGTCGCTGTCCAGCTGCTGAGCCACAGGCTGCTG
TCCAACTTGCGGTTGCTTAACGGGCGGCGAAGGAGAAGTCCACGCCTACATGGGGGTAG
AGTCATAATCGTGCATCAGGATAGGGCGGTGGTGCTGCAGCAGCGCGCGAATAAACTGC
TGCCGCCGCCGCTCCGTCCTGCAGGAATACAACATGGCAGTGGTCTCCTCAGCGATGAT
TCGCACCGCCCGCAGCATAAGGCGCCTTGTCCTCCGGGCACAGCAGCGCACCCTGATCT
CACTTAAATCAGCACAGTAACTGCAGCACAGCACCACAATATTGTTCAAAATCCCACAG
TGCAAGGCGCTGTATCCAAAGCTCATGGCGGGGACCACAGAACCCACGTGGCCATCATA
CCACAAGCGCAGGTAGATTAAGTGGCGACCCCTCATAAACACGCTGGACATAAACATTA
CCTCTTTTGGCATGTTGTAATTCACCACCTCCCGGTACCATATAAACCTCTGATTAAAC
ATGGCGCCATCCACCACCATCCTAAACCAGCTGGCCAAAACCTGCCCGCCGGCTATACA
CTGCAGGGAACCGGGACTGGAACAATGACAGTGGAGAGCCCAGGACTCGTAACCATGGA
TCATCATGCTCGTCATGATATCAATGTTGGCACAACACAGGCACACGTGCATACACTTC
CTCAGGATTACAAGCTCCTCCCGCGTTAGAACCATATCCCAGGGAACAACCCATTCCTG
AATCAGCGTAAATCCCACACTGCAGGGAAGACCTCGCACGTAACTCACGTTGTGCATTG
TCAAAGTGTTACATTCGGGCAGCAGCGGATGATCCTCCAGTATGGTAGCGCGGGTTTCT
GTCTCAAAAGGAGGTAGACGATCCCTACTGTACGGAGTGCGCCGAGACAACCGAGATCG
TGTTGGTCGTAGTGTCATGCCAAATGGAACGCCGGACGTAGTCATTGAAATGGATTCTC
TTGCGTACCTTGTCGTACTTCTGCCAGCAGAAAGTGGCTCGGGAACAGCAGATACCTTT
CCTCCTGCTGTCCTTCCGCTGCTGACGCTCAGTCATCCAACTGAAGTACAGCCATTCCC
GCAGGTTCTCCAGCAGCTCCTGTGCATCTGATGAAACAAAAGTCCCGTCGATGCGGATT
CCCCTTAAAACATCAGCCAGGACATTGTAGGCCATCCCAATCCAGTTAATGCATCCTGA
TCTATCATGAAGAGGAGGTGGGGGAAGAACTGGAAGAACCATTTTTATTCCAAGCGGTC
TCGAAGGACGATAAAGTGCAAGTCACGCAGGTGACAGCGTTCCCCGCCGCTGTGCTGGT
GGAAACAGACAGCCAGGTCAAAACCCACTCTATTTTCAAGGTGCTCGACTGTGGCTTCG

AGCAGTGGCTCTACGCGTACATCCAGCATAAGAATCACATTAAAGGCTGGACCTCCATC
GATTTCATCAATCATCAGGTTACACTCATTCACCATCCCCAGGTAATTCTCATTTTTCC
AGCCTTGGATTATTTCTACAAATTGTTGGTGTAAGTCCACTCCGCACATGTGGAAAAGT
TCCCACAGCGCCCCCTCCACTTTCATAATCAGGCAGACCTTCATATTAGAAACAGATCC
TGCTGCTCCACCACCTGCAGCGTGTTCAAAACAACAAGATTCAATGAGGTTCTGCCCTC
TGCCCTCAGCTCACGTCTCAGCGTCAGCTGCAAAAAGTCACTCAAGTCCTCAGCCACTA
CAGCTGACAATTCAGAGCCAGGGCTAAGCGTGGGACTGGCAAGCGTGAGTGAGTACTTT
AATGCTCCAAAGCTAGCACCCAAAAACTGCATGCTGGAATAAGCTCTCTTTGTGTCACC
GGTGATGCCTTCCAATAGGTGAGTGATAAAGCGAGGTAGTTTTTCTTTAATCATTTGAG
TAATAGAAAAGTCCTCTAAATAAGTCACTAGGACCCCAGGAACCACAATGTGGTAGCTG
ACAGCGTGTCGCTCAAGCATGGTTAGTAGAGATGAGAGTCTGAAAAACAGAAAGCATGC
ACTAAACCAGAGTTGCCAGTCTCACTGAAGGAAAAATCACTCTCTCCAGCAGCAAAGTG
CCCACTGGGTGGCCCTCTCGGACATACAAAAATCGATCCGTGTGGTTAAAGAGCAGCAC
AGTTAGCTCCTGTCTTCTCCCAGCAAAGATCACATCGGACTGGGTTAGTATGCCCCTGG
AATGGTAGTCATTCAAGGCCATAAATCTGCCTTGGTAGCCATTAGGAATCAGCACGCTC
ACTCTCAAGTGAACCAAAACCACCCCATGCGGAGGAATGTGGAAAGATTCTGGGCAAAA
AAAGGTATATCTATTGCTAGTCCCTTCCTGGACGGGAGCAATCCCTCCAGGGCTATCTA
TGAAAGCATACAGAGATTCAGCCATAGCTCAGCCCGCTTACCAGTAGACAGAGAGCACA
GCAGTACAAGCGCCAACAGCAGCGACTGACTACCCACTGACCCAGCTCCCTATTTAAAG
GCACCTTACACTGACGTAATGACCAAAGGTCTAAAAACCCCGCCAAAAAAACACACACG
CCCTGGGTGTTTTTCGCGAAAACACTTCCGCGTTCTCACTTCCTCGTATCGATTTCGTG
ACTCAACTTCCGGGTTCCCACGTTACGTCACTTCTGCCCTTACATGTAACTCAGCCGTA
GGGCGCCATCTTGCCCACGTCCAAAATGGCTTCCATGTCCGGCCACGCCTCCGCGGCGA
CCGTTAGCCGTGCGTCGTGACGTCATTTGCATCACCGTTTCTCGTCCAATCAGCGTTGG
CTCCGCCCCAAAACCGTTAAAATTCAAAAGCTCATTTGCATATTAACTTTTGTTTACTT
TGTGGGGTATATTATTGATGATGatttaaatatTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTG
CGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTT
ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGAC
GAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGC
TTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCA
CGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
ACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACC
CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG
AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGG
GTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGT
ATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC
AGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTA
CGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGC
TCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
TGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG
TAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTG
GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCG
AGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCG
TTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAT

TCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAA
GTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG
GGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
TGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAA
CAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC
ATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGG
ATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCC
GAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAT
AGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTgatttaaat

> CMVdel134 включая 2x TO; SEQ ID NO: 219
GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
GCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCA
GTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATG
GCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA
TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGG
CGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGG
GAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCC
CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTC
CCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGT
GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACC
GGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую щитовидный S белок 2019-NCOV, включающий следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а. стабилизирующие мутации пролина в положениях аминокислот 986 и 987 и

б. мутации в участке расщепления фурином (SEQ ID NO: 90).

2. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, включающей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 211.

3. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует щитовидный S белок 2019-NCOV, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205.

4. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

5. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 4, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 99% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

6. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, включающей нуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

7. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 4 или п. 5, включающей нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении последовательности SEQ ID NO: 143 или комплементарной с ней последовательности.

8. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 6, включающей нуклеотидную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в отношении последовательности SEQ ID NO: 148 или комплементарной с ней последовательности.

9. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-8, кодирующая щитовидный S белок 2019-NCOV, включающий следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в) делеция сигнальной последовательности.

10. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где нуклеиновая кислота, которая кодирует щитовидный S белок 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), предпочтительно немедленно раннему промотеру CMV.

11. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где нуклеиновая кислота, которая кодирует щитовидный S белок 2019-NCOV, оперативно присоединена к промотеру цитомегаловируса (CMV), включающему по меньшей мере один мотив оператора тетрациклина (TetO).

12. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 11, где CMV промотер, включающий по меньшей мере один мотив TetO, включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 219.

13. Изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV, включающий следующие модификации полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

а. стабилизирующие мутации пролина в положениях аминокислот 986 и 987 и

б. мутации в участке расщепления фурином (SEQ ID NO: 90).

14. Изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по п. 13, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205.

15. Изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по п. 13, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

16. Изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по п. 13 или п. 15, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 99% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

17. Изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по п. 13, включающий аминокислотную последовательность с идентичностью последовательности по меньшей мере на 85% в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

18. Изолированный щитовидный S белок 2019-NCOV по п. 13, включающий следующую дополнительную модификацию полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29:

в. делеция сигнальной последовательности.

19. Изолированный вектор, включающий одну или более молекул нуклеиновой кислоты по любому из вариантов 1-12.

20. Вектор по п. 19, где вектор является репликационно дефективным.

21. Вектор по п. 19 или п. 20, где вектором является аденовирус серотипа 26.

22. Композиция, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-12, белок по любому из пунктов 13-18 или вектор по любому из пунктов 19-21.

23. Композиция по п. 22, дополнительно включающая фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

24. Композиция по п. 22 или п. 23 для применения в качестве вакцины.

25. Композиция по любому из пунктов 22-24 для применения при активной иммунизации для профилактики заболевания коронавирусом 2019 (COVID-19) взрослых возрастом 18 лет или старше.

26. Способ активной иммунизации против COVID-19 для профилактики заболевания коронавирусом 2019 (COVID-19), вызванного тяжелой формой острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2) у индивидуумов возрастом 18 лет и старше, включающий введение субъекту композиции по любому из пунктов 22-25.

27. Способ по п. 26, включающий введение композиции по любому из пунктов 22-25 по схеме введения в одной дозе.

28. Способ по п. 26, включающий введение композиции по любому из пунктов 22-25 по схеме введения в двух дозах, где дозы вводят через 1, 2 или 3 месяца.

29. Способ по любому из пунктов 26-28, где композицию вводят в дозе $5x10^{10}$ вч.

30. Способ изготовления иммуногенной композиции для предотвращения заболевания коронавирусом 2019 (COVID-19), вызванного тяжелой формой острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2) у индивидуумов возрастом 18 лет и старше, причем способ включает следующие стадии:

(а) смешивание по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-12, белка по любому из пунктов 13-18, вектора по любомк из пунктов 19-21, композиции по любому из пунктов 22-25 с фармацевтически приемлемым носителем, эксципиентом или разбавителем, при этом получают иммуногенную композицию, и

(б) помещение иммуногенной композиции в контейнер.

31. Набор, включающий:

(а) первый контейнер, включающий по меньшей мере один из следующих компонентов: молекула нуклеиновой кислоты по любому из пунктов 1-12, белок по любому из пунктов 13-18, вектор по любому из пунктов 16-21, композиция по любому из пунктов 22-25,

(б) инструкции по применению и не обязательно

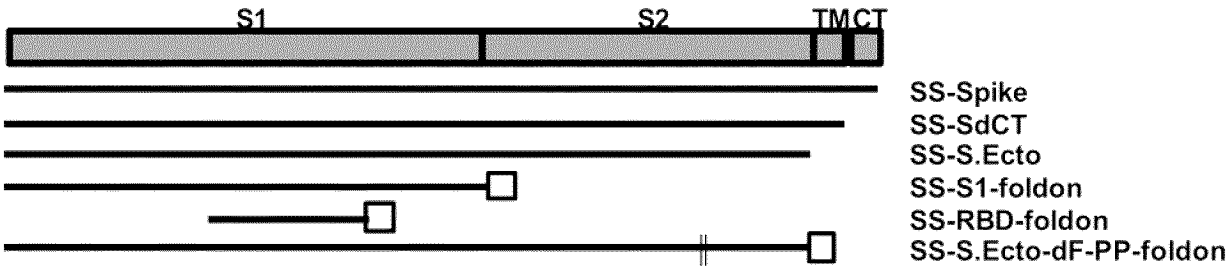
(в) второй контейнер, включающий фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

32. Способ получения вакцины против COVID-19 для профилактики заболевания коронавирусом COVID-19, вызванного тяжелой формой острого респираторного синдрома коронавируса 2 (SARS-CoV-2) у индивидуумов возрастом 18 лет и старше, включающий обеспечение рекомбинантным аденовирусом человека серотипа 26, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагмент, размножение указанного рекомбинантного аденовируса в культуре клеток-хозяина, выделение и очистку рекомбинантного аденовируса и включение рекомбинантного аденовируса в состав фармацевтически приемлемой композиции.

33. Изолированная рекомбинантная нуклеиновая кислота, которая формирует геном рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26, который

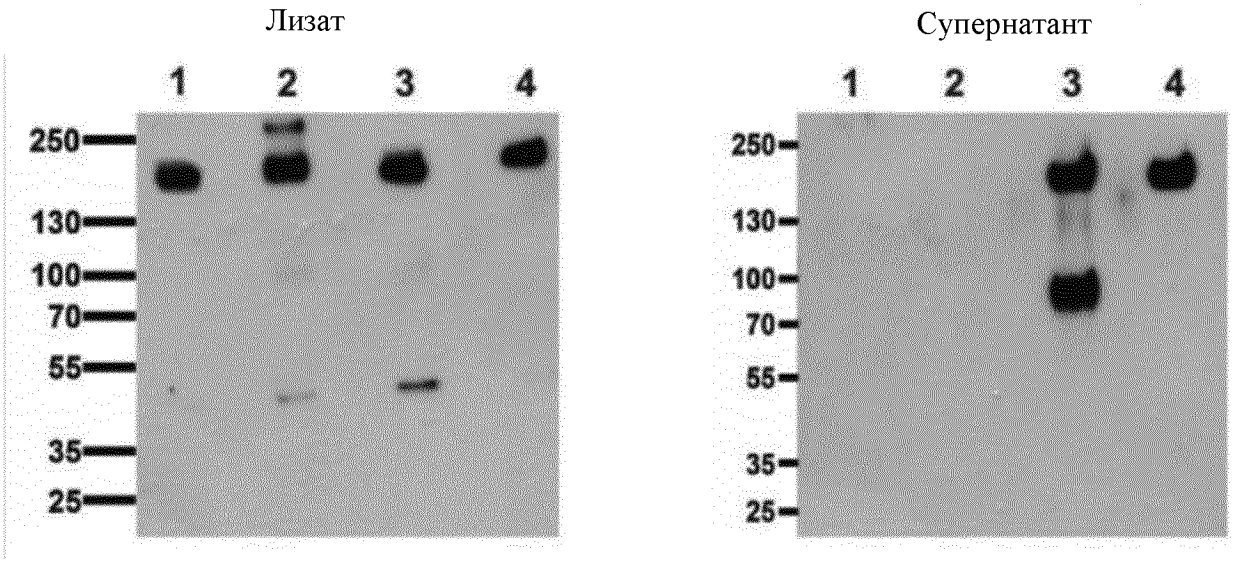
включает нуклеиновую кислоту, кодирующую S белок SARS-CoV-2 или его фрагменты.

OL-141619

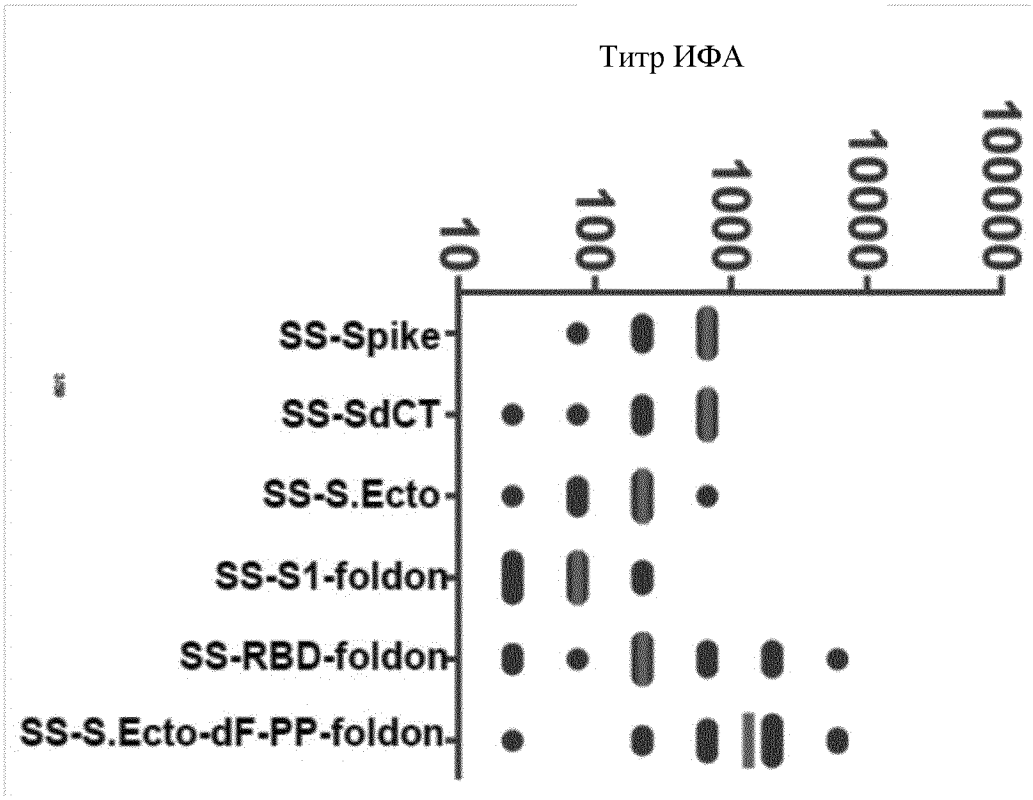


Фиг. 1

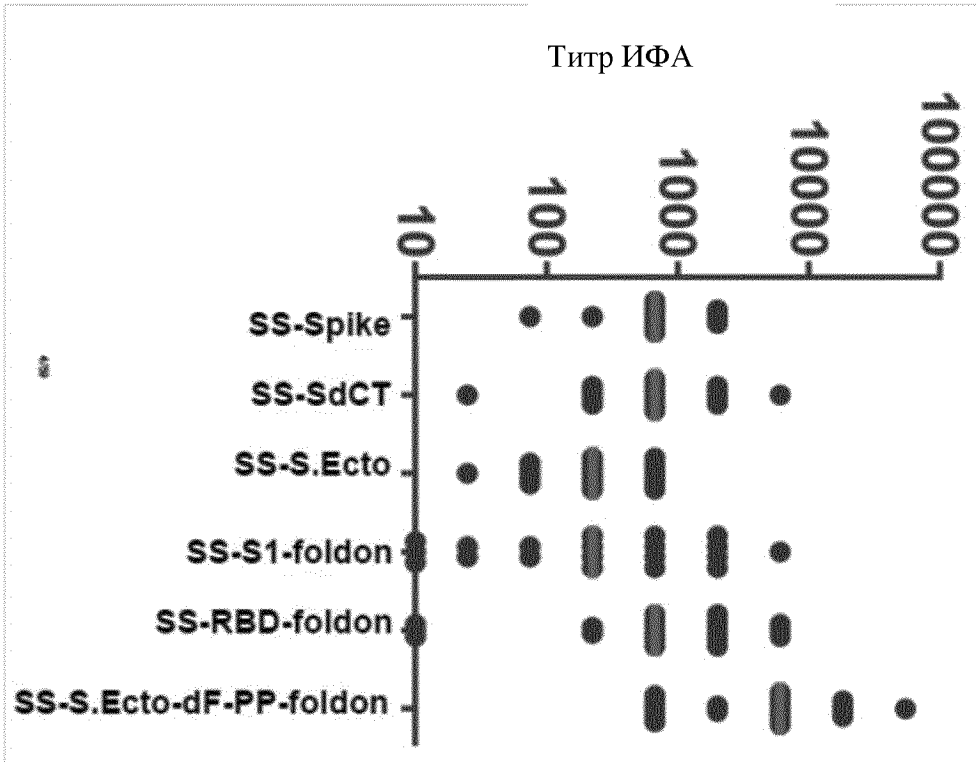
,



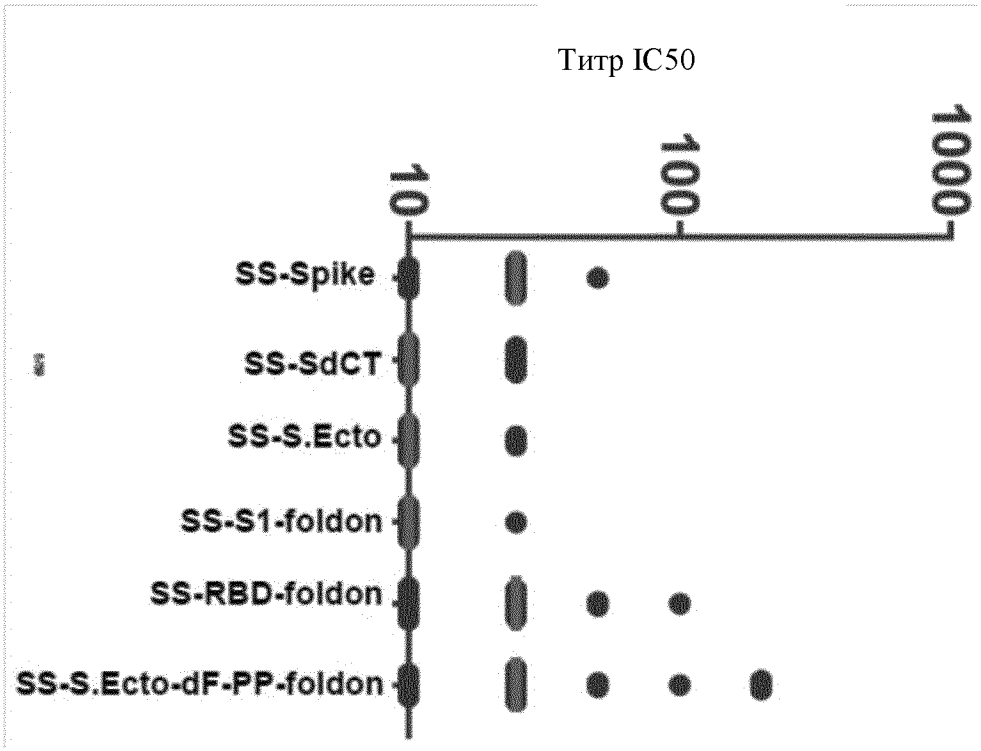
Фиг. 2


Титр ИФА
10
100
1000
10000
100000
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

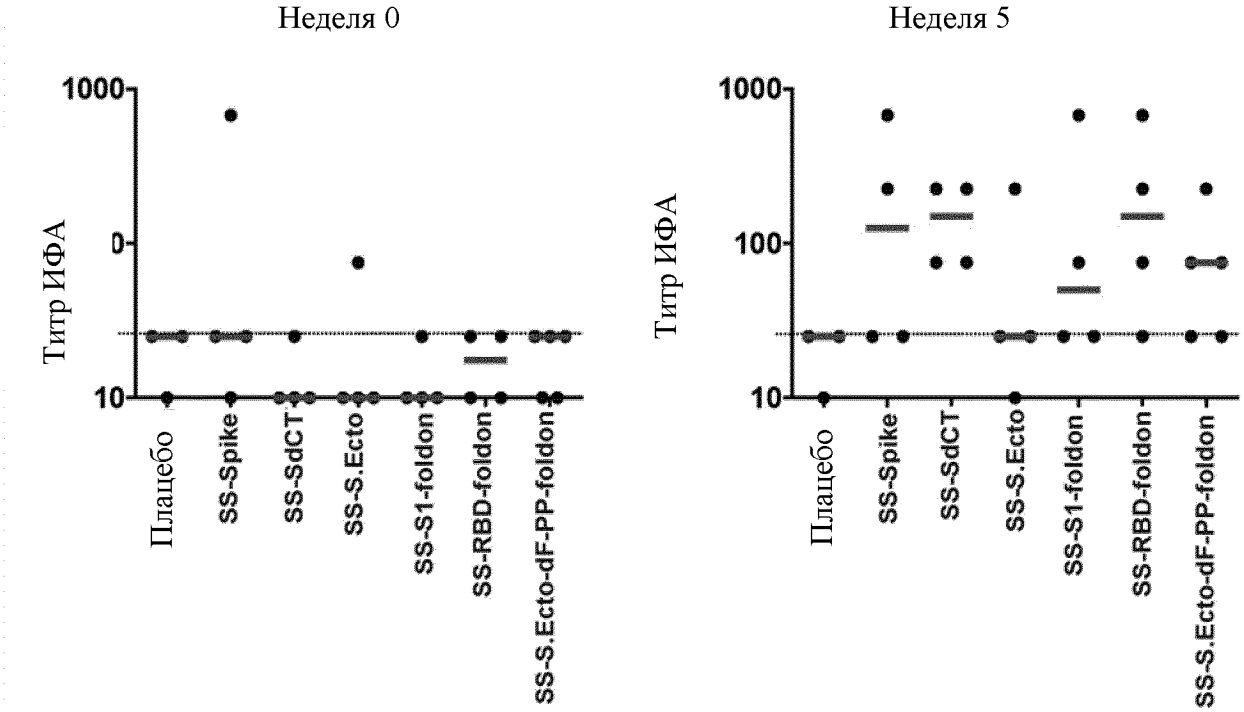
Фиг. 3


Титр ИФА
10
100
1000
10000
100000
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

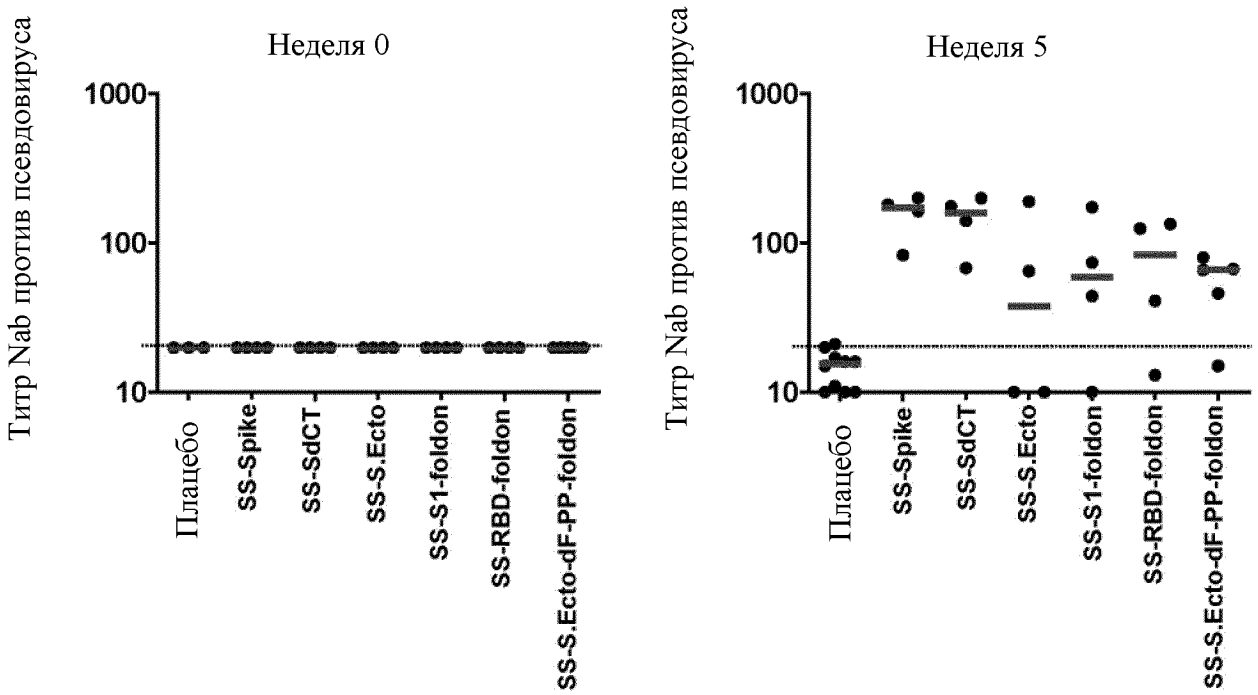
Фиг. 4


Титр IC50
10
100
1000
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

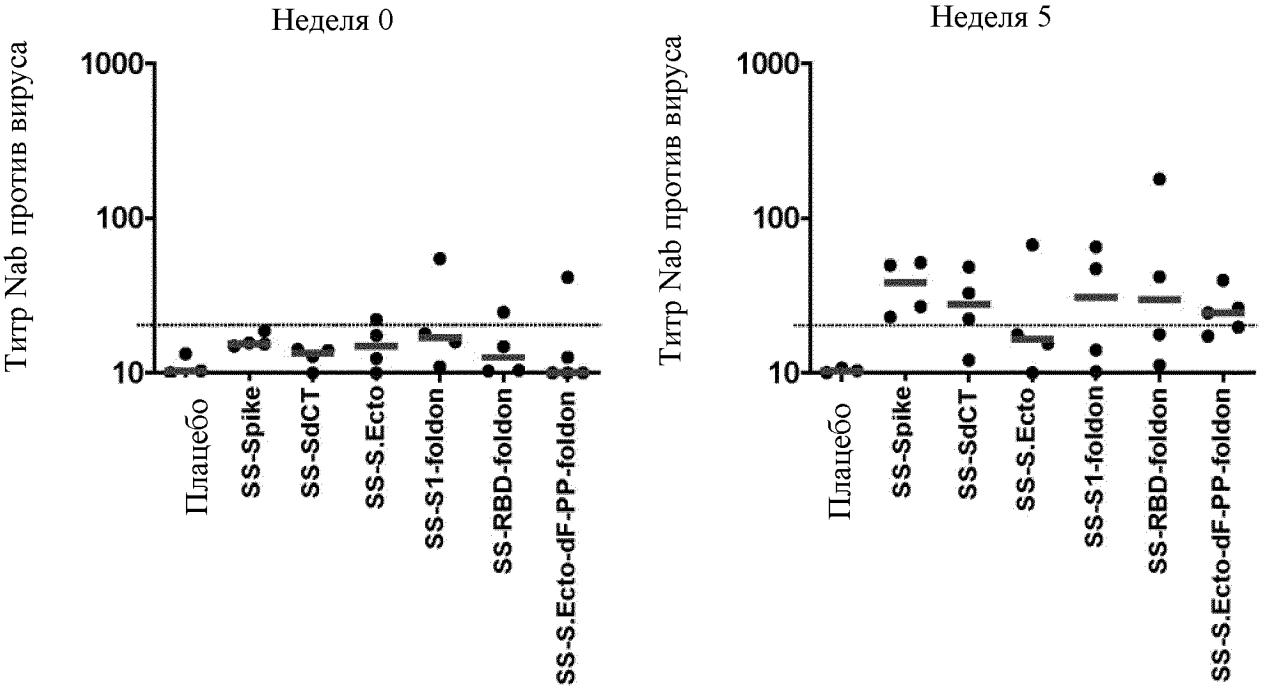
Фиг. 5


Неделя 0
Неделя 5
Титр ИФА
1000
0
10
100
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

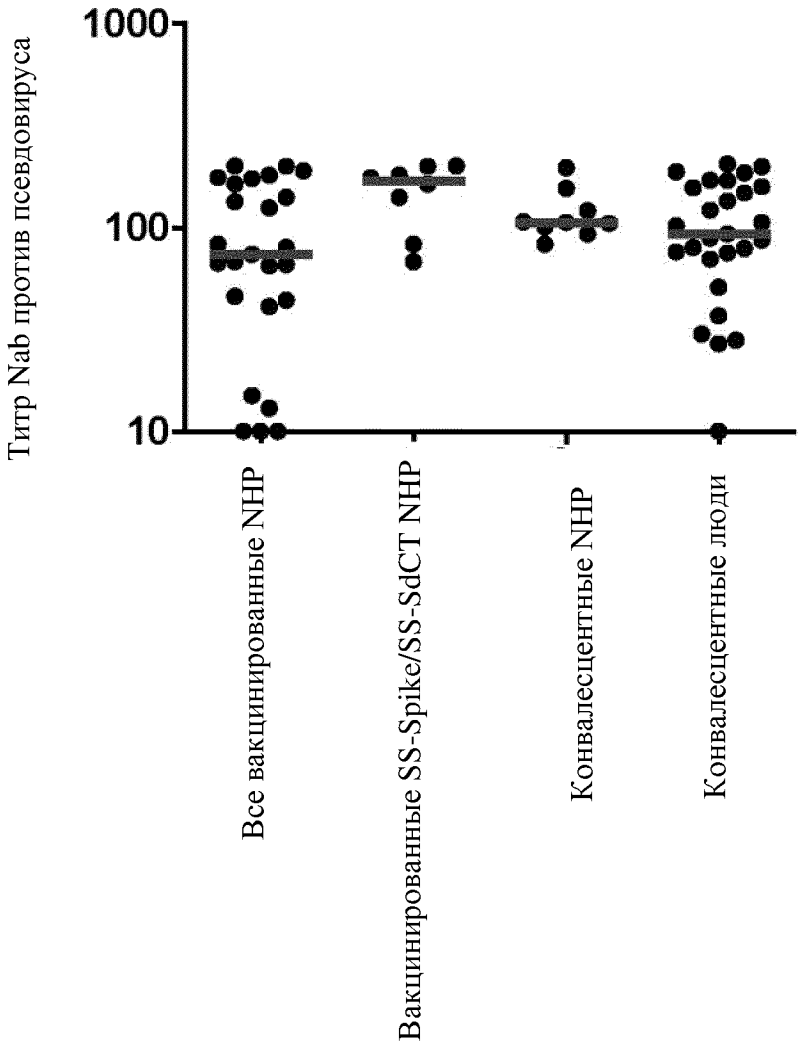
Фиг. 6А


Неделя 0
Неделя 5
Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

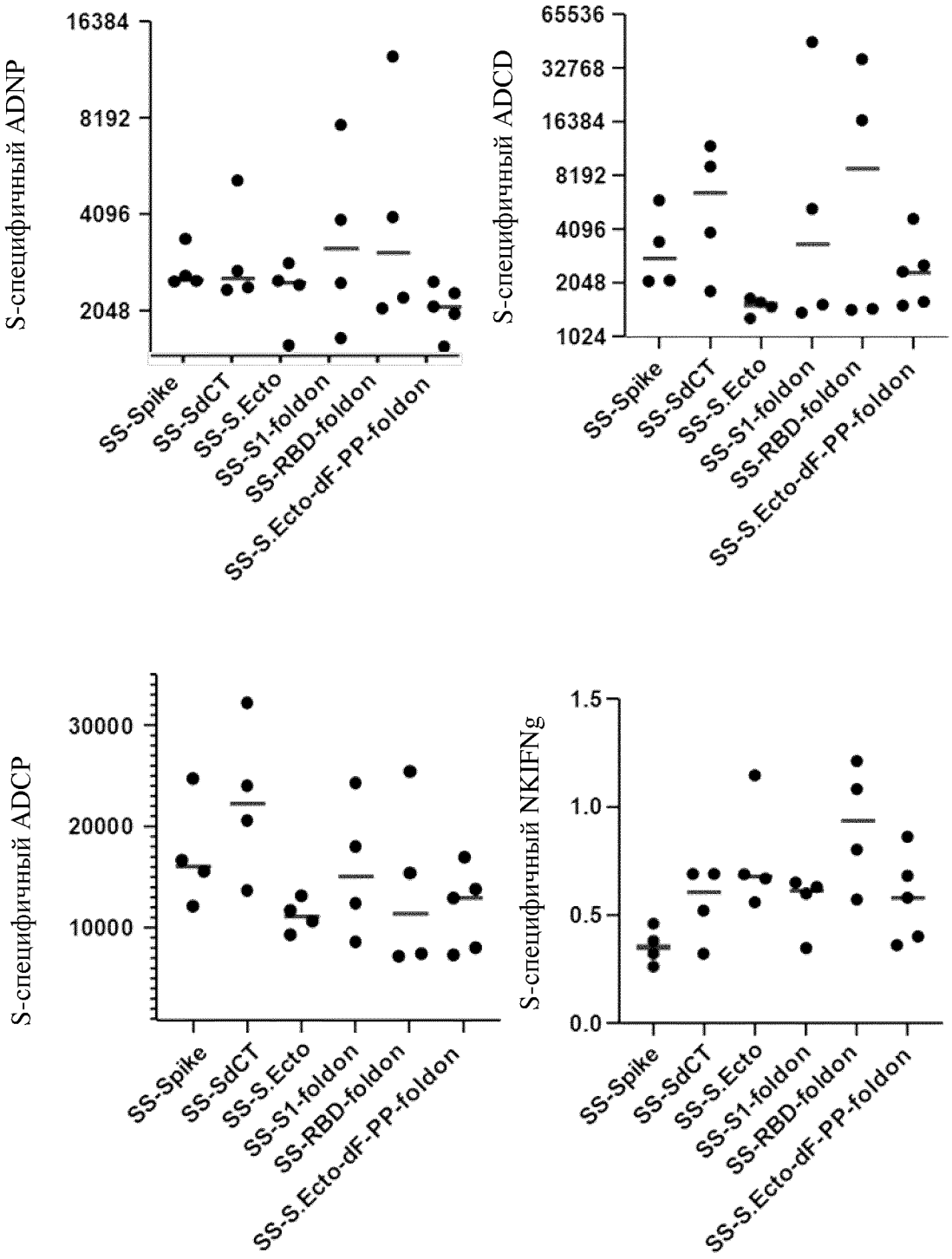
Фиг. 6B


Неделя 0
Неделя 5
Титр Nab против вируса
1000
100
10
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

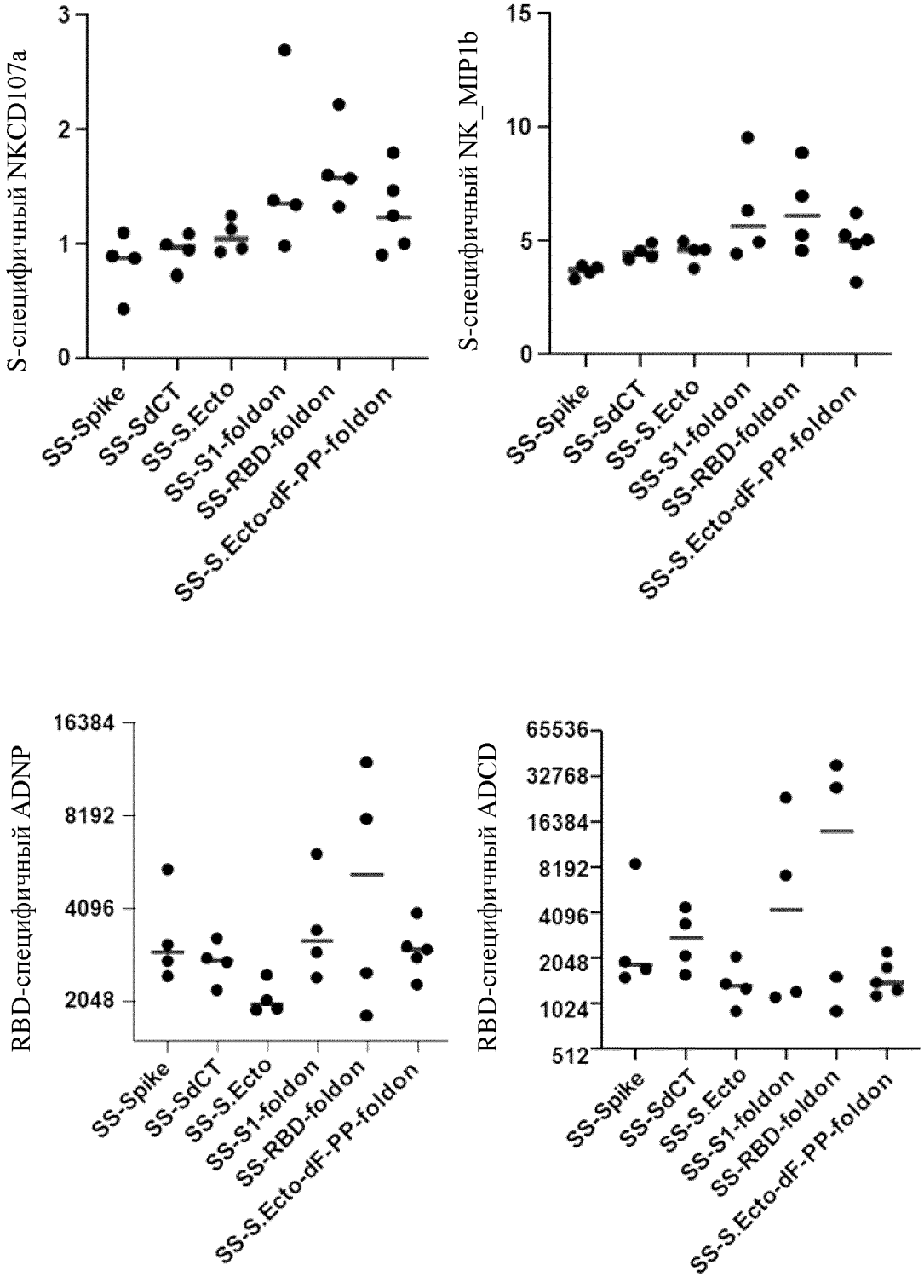
Фиг. 6C


Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
Все вакцинированные NHP
Вакцинированные SS-Spike/SS-SdCT NHP
Конвалесцентные NHP
Конвалесцентные люди

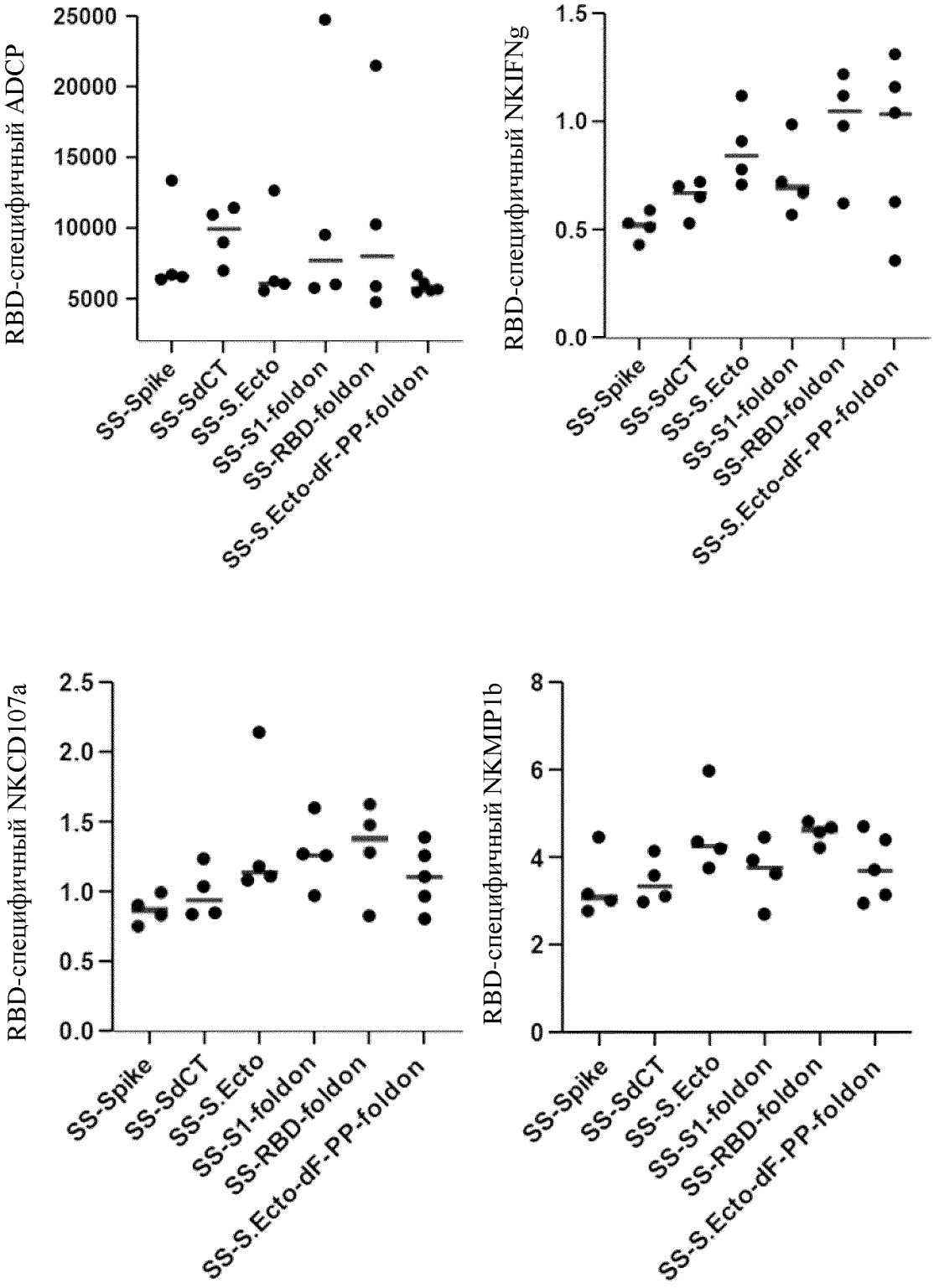
Фиг. 6D


S-специфичный ADNP
16384
8192
4096
2048
S-специфичный ADCD
65536
32768
16384
8192
4096
2048
1024
S-специфичный ADCP
30000
20000
10000
S-специфичный NKIFNg
1.5
1.0
0.5
0.0
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

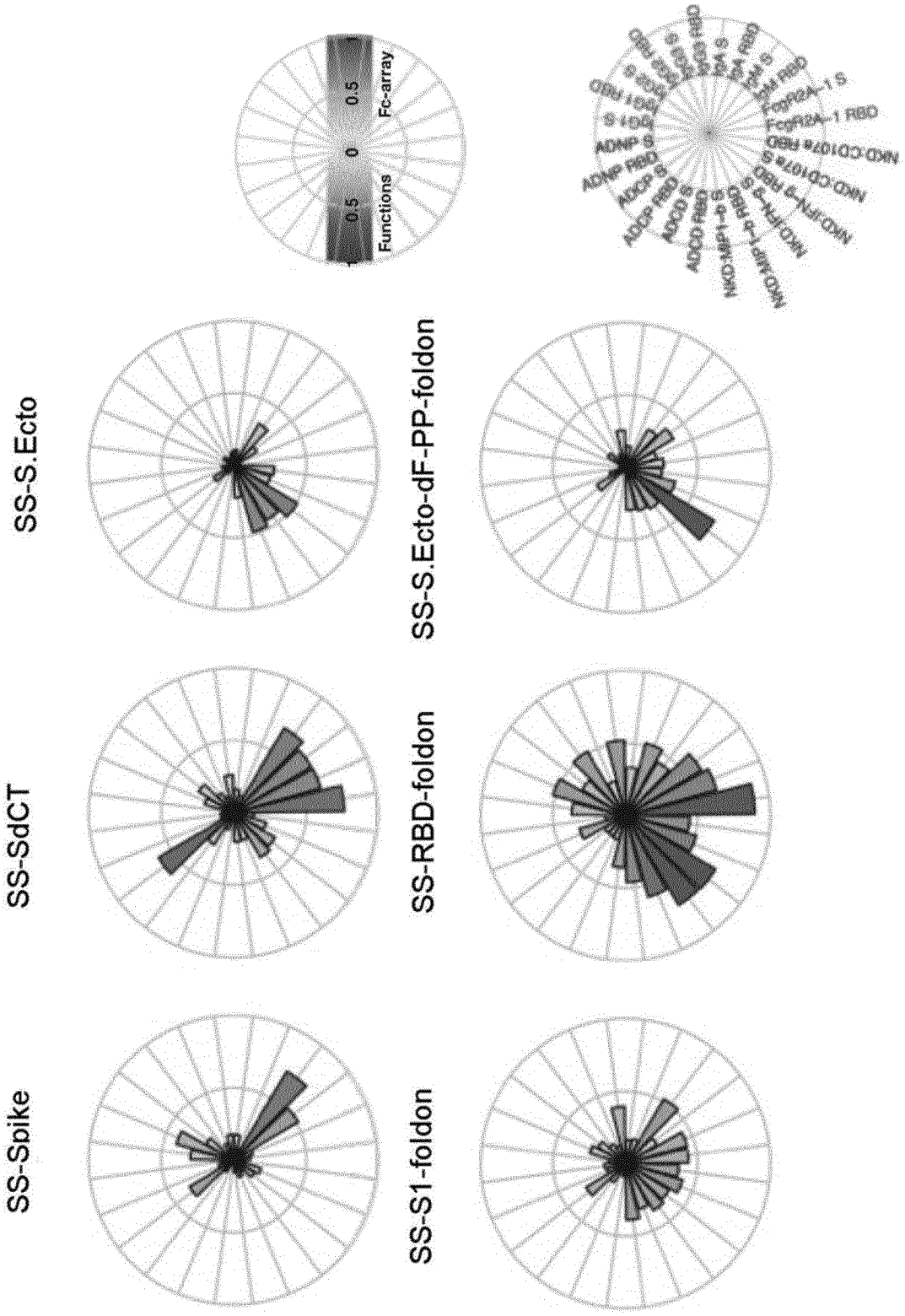
Фиг. 6E



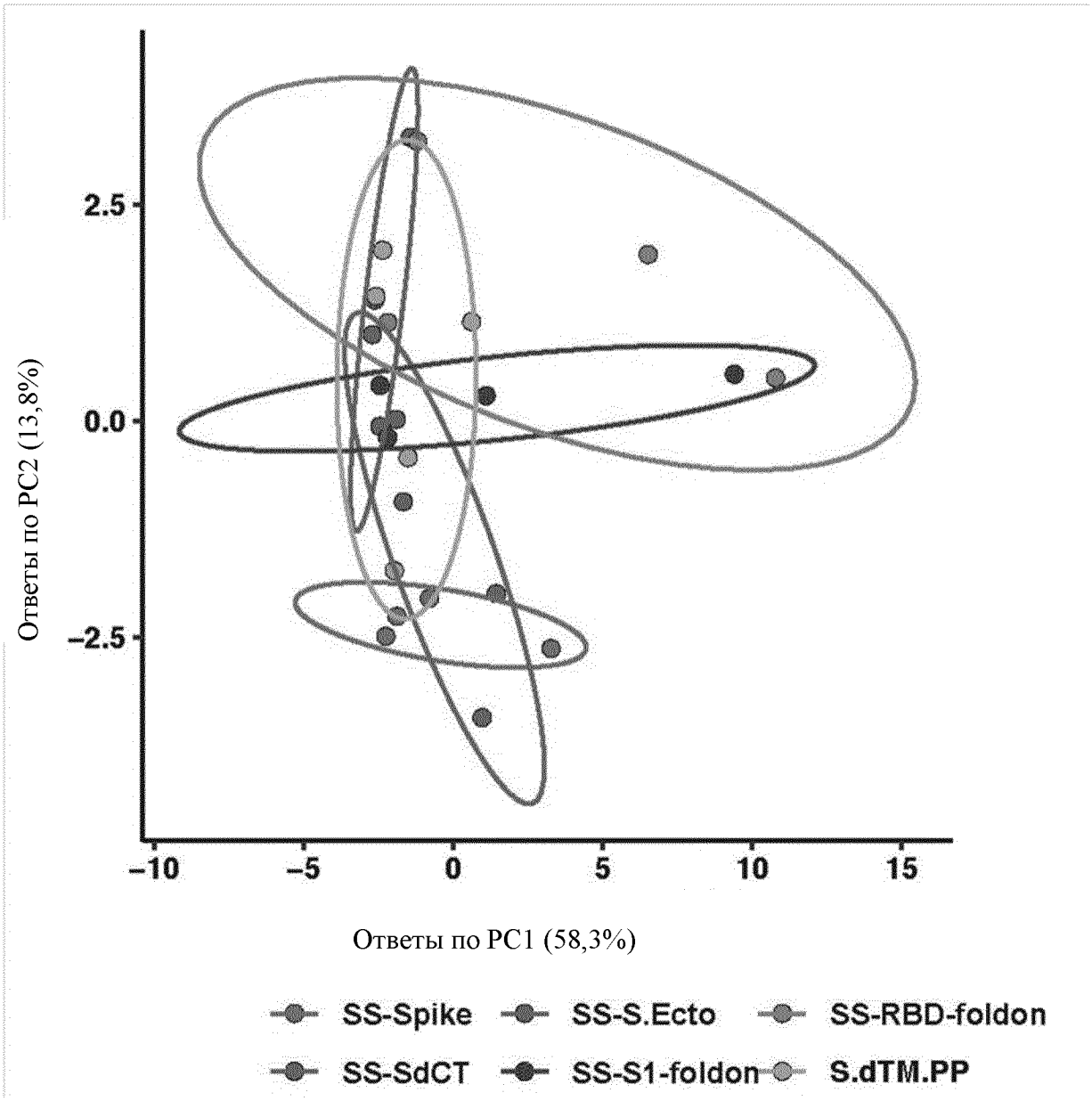
Фиг. 6 (продолжение)



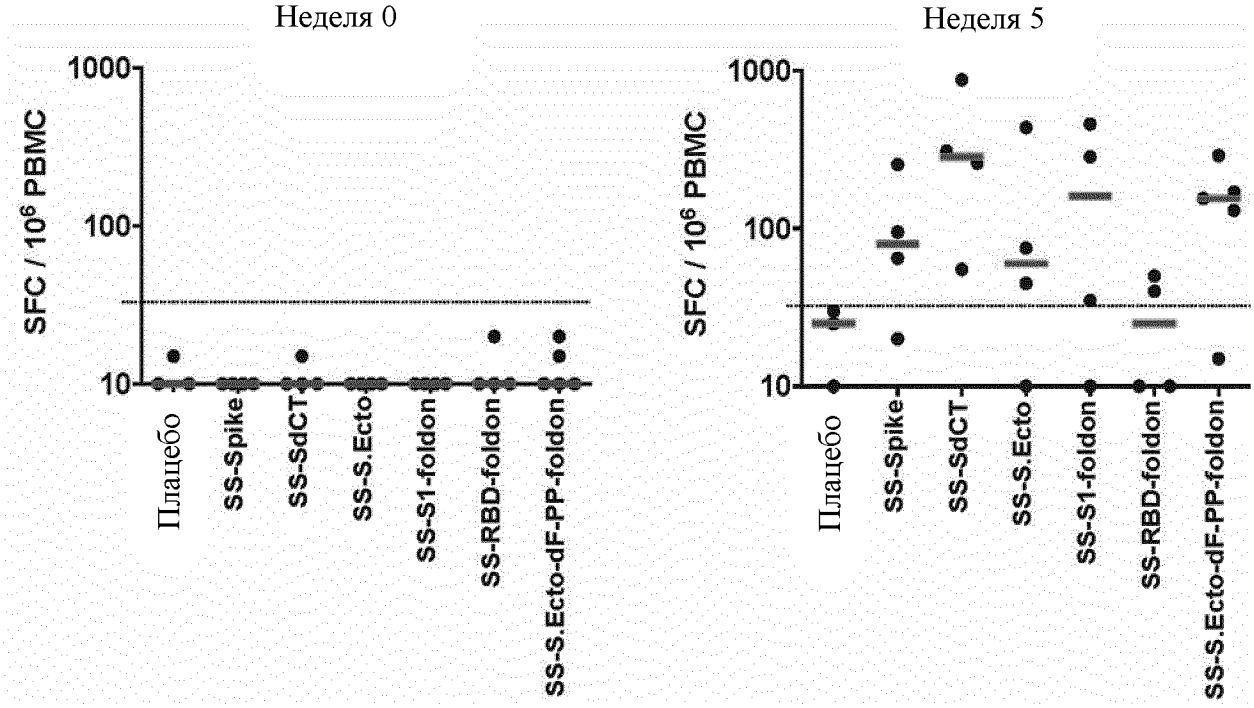
Фиг. 6 (продолжение)



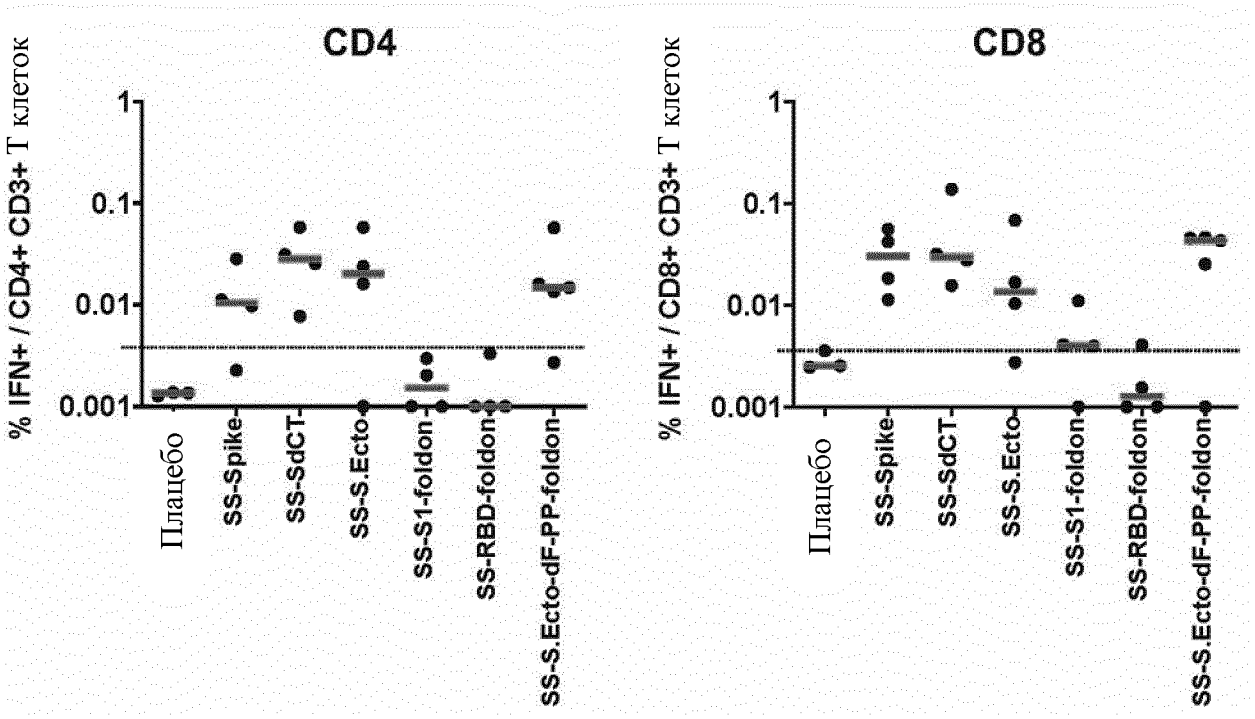
Фиг. 6 (продолжение)



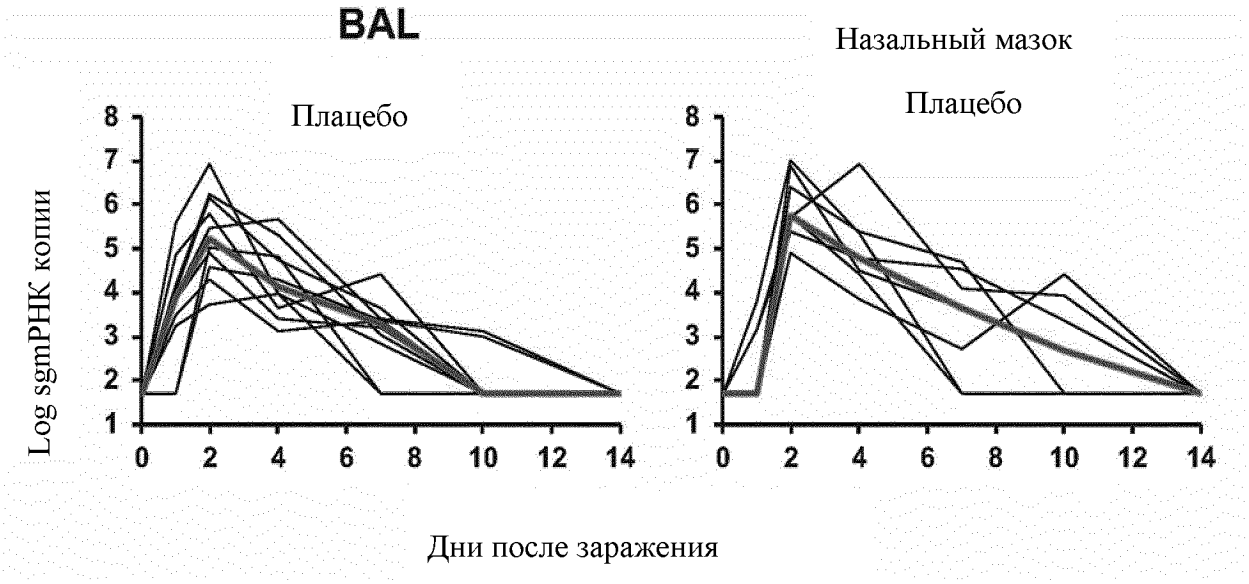
Фиг. 6 (продолжение)


Неделя 0
Неделя 5
SFC / 10^6 PBMC
1000
100
10
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

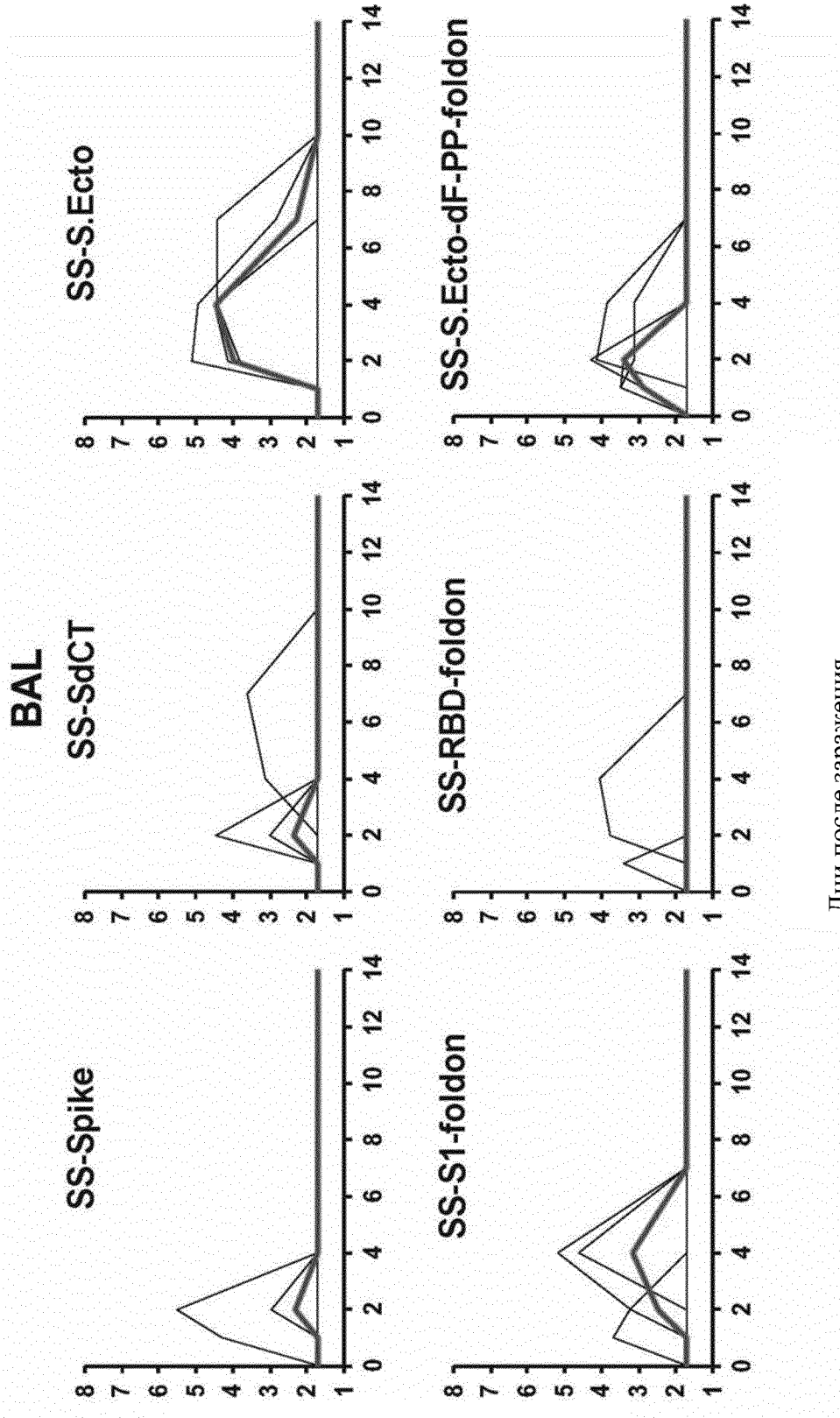
Фиг. 7A


CD4
CD8
% IFN+ / CD4+ CD3+ Т клеток
% IFN+ / CD8+ CD3+ Т клеток
1
0.1
0.01
0.001
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

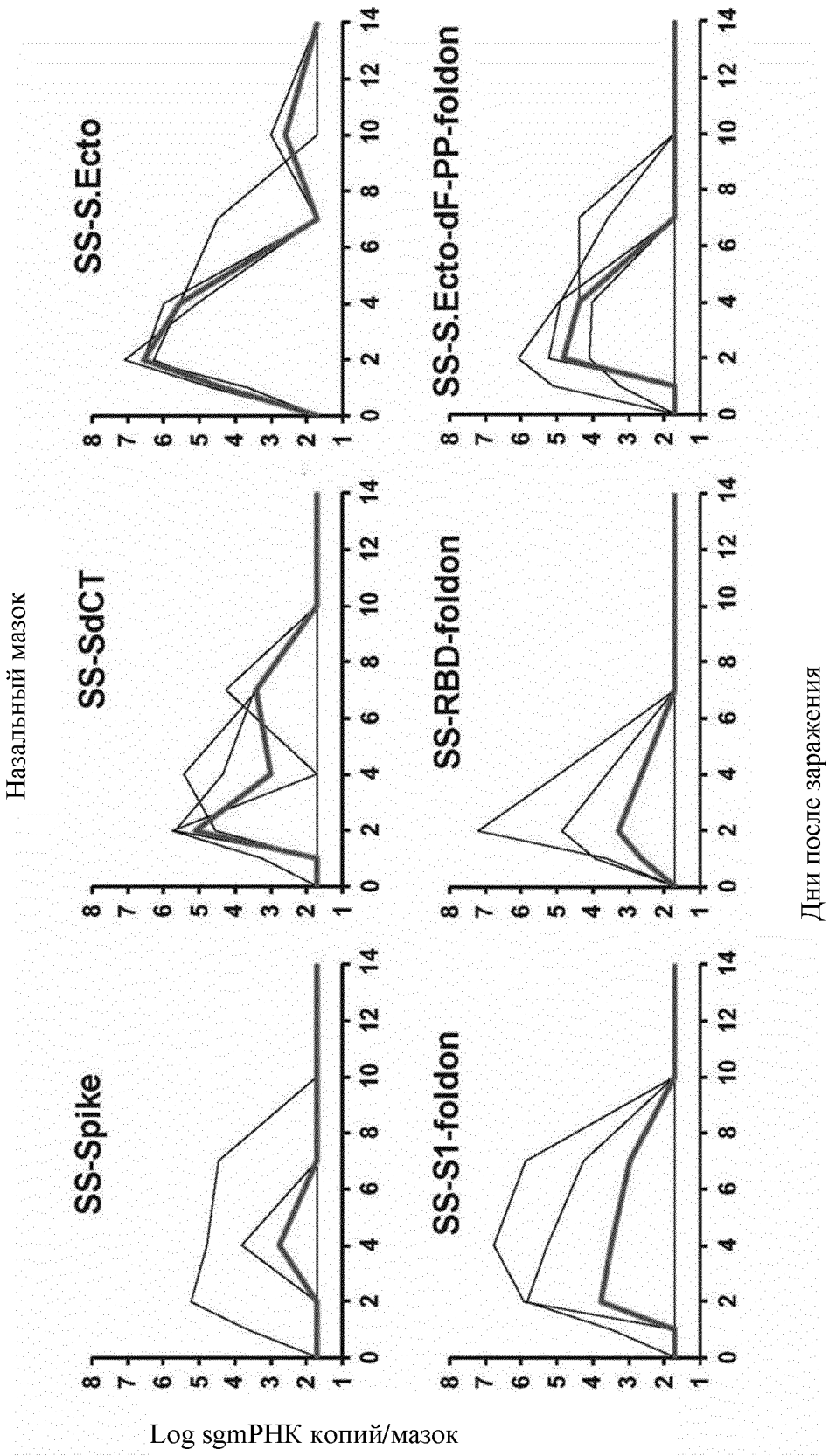
Фиг. 7B


BAL
Назальный мазок
Плацебо
Плацебо
Log sgmРНК копии
Дни после заражения

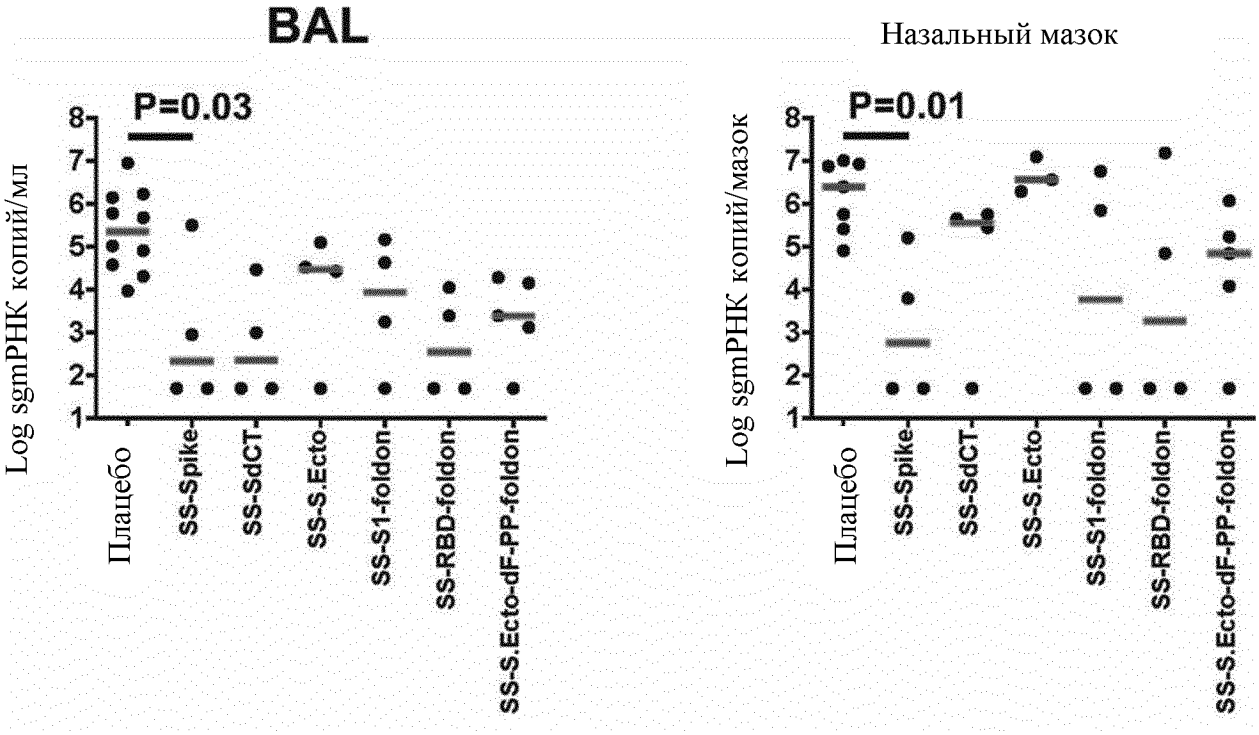
Фиг. 8А


BAL
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon
Log sgmPHK копий/мл
Дни после заражения

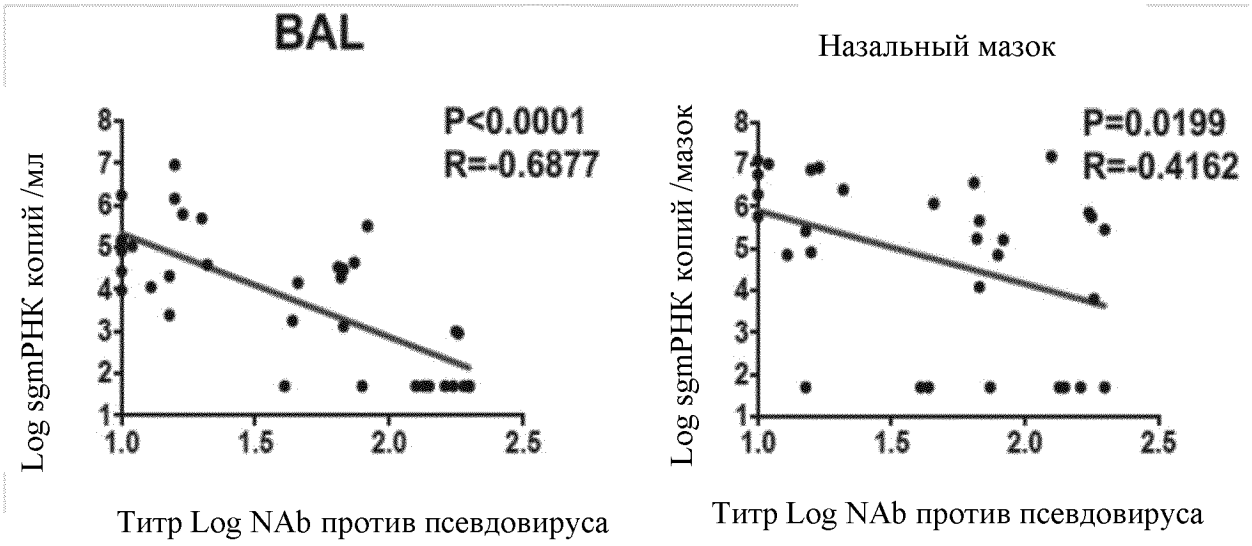
Фиг. 8B


Назальный мазок
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon
Log sgmPHK копий/мазок
Дни после заражения

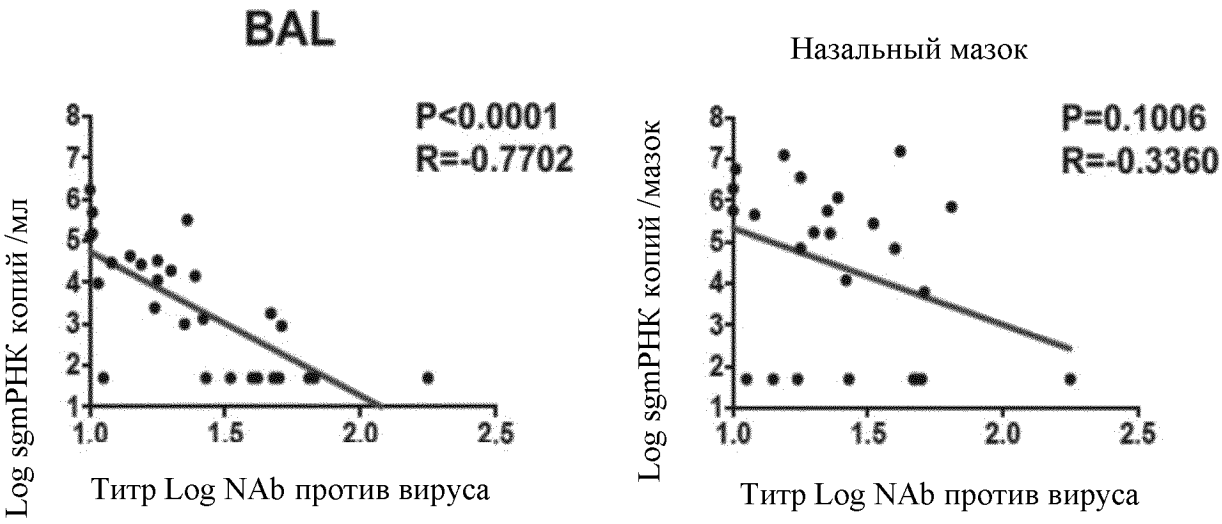
Фиг. 8C


BAL
P=0.03
Log sgmРНК копий/мл
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon
Назальный мазок
P=0.01
Log sgmРНК копий/мазок

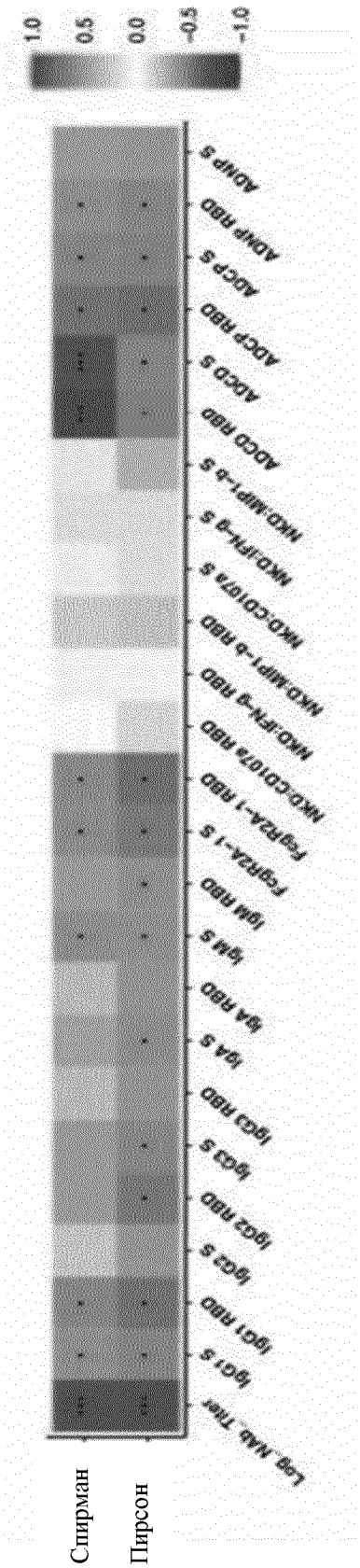
Фиг. 8D


BAL
P<0.0001
R=-0.6877
Log sgmРНК копий /мл
Титр Log NAb против псевдовируса
Назальный мазок
P=0.0199
R=-0.4162
Log sgmРНК копий /мазок
Титр Log NAb против псевдовируса

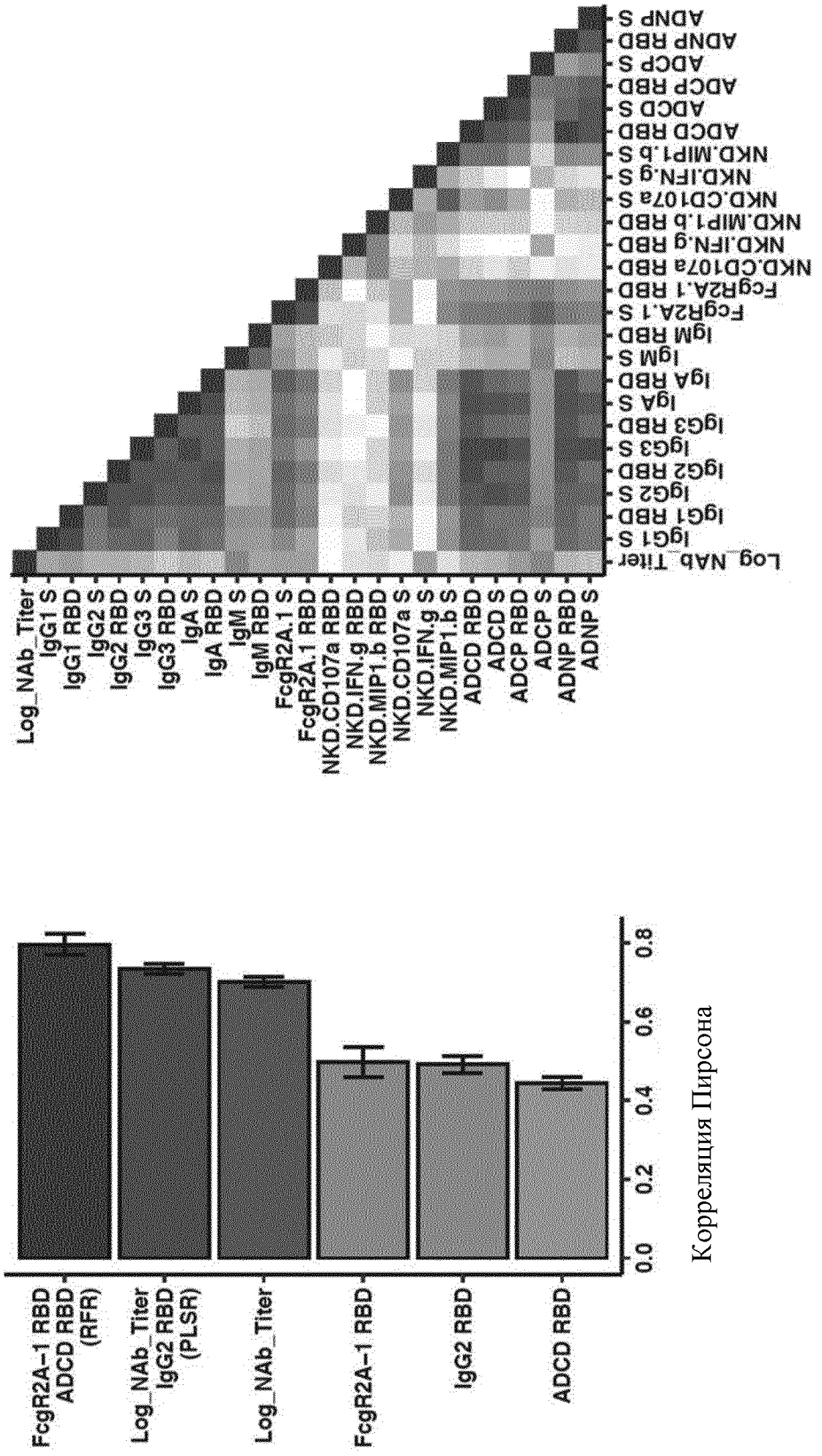
Фиг. 9A


BAL
P<0.0001
R=-0.7702
Log sgmPHK копий /мл
Титр Log NAb против вируса
Назальный мазок
P=0.1006
R=-0.3360
Log sgmPHK копий /мазок
Титр Log NAb против вируса

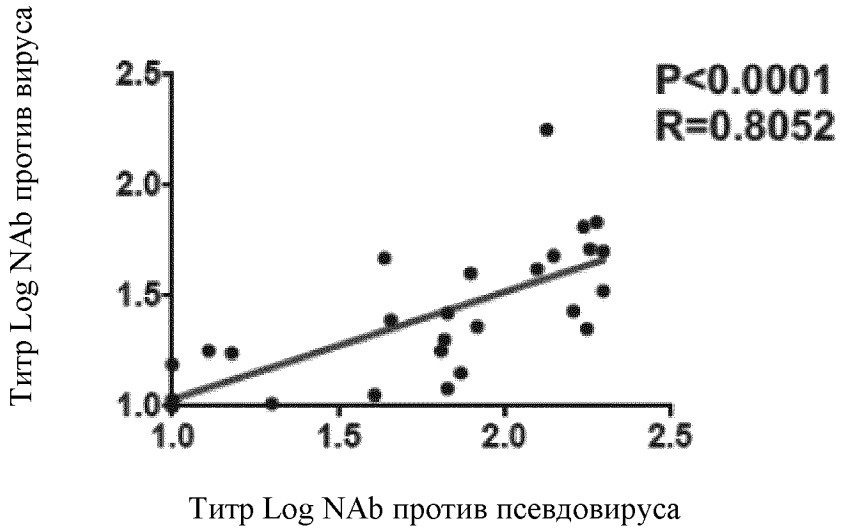
Фиг. 9B


1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
Log_MAb_Titer
IgG1 S
IgG1 RBD
IgG3 S
IgG3 RBD
IgG2 S
IgG2 RBD
IgG S
IgG RBD
IgA S
IgA RBD
IgM S
IgM RBD
FcgR2A-1 S
FcgR2A-1 RBD
NKD:CD107a RBD
NKD:IFN-g RBD
NKD:MIP1-b RBD
NKD:CD107a S
NKD:IFN-g S
NKD:MIP1-b S
ADCD RBD
ADCD S
ADCP RBD
ADCP S
ADNP RBD
ADNP S
Спирман
Пирсон

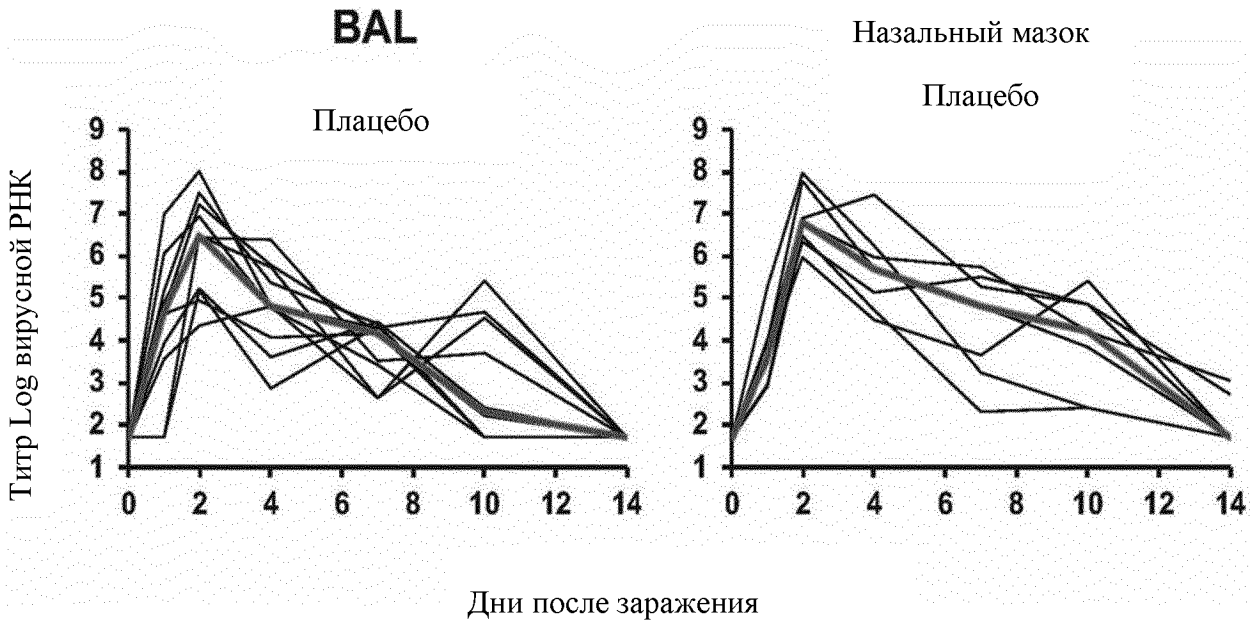
Фиг. 9C



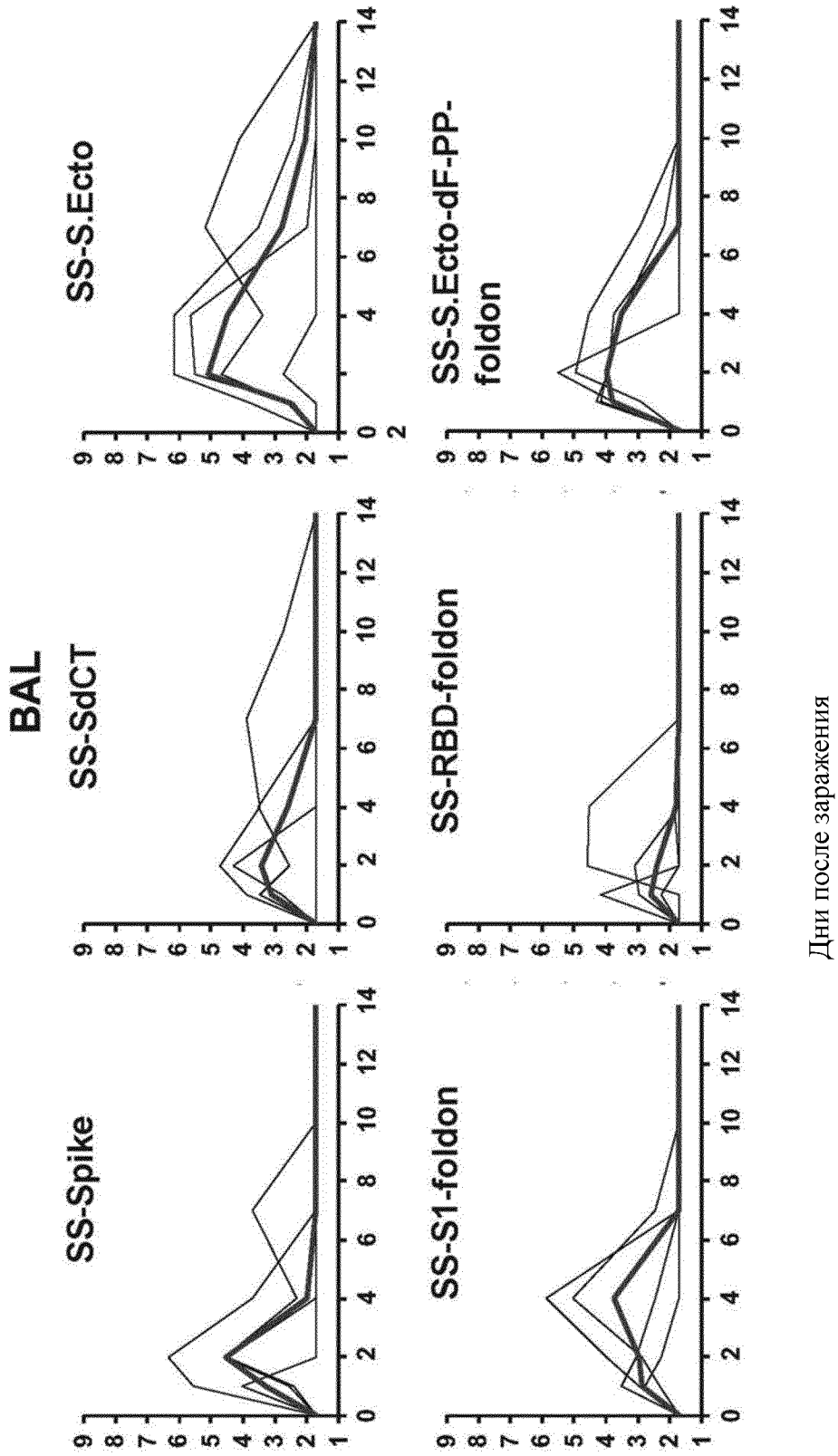
Фиг. 9C (продолжение)


Титр Log NAb против вируса
2.5
2.0
1.5
1.0
1.0
1.5
2.0
2.5
P<0.0001
R=0.8052
Титр Log NAb против псевдовируса

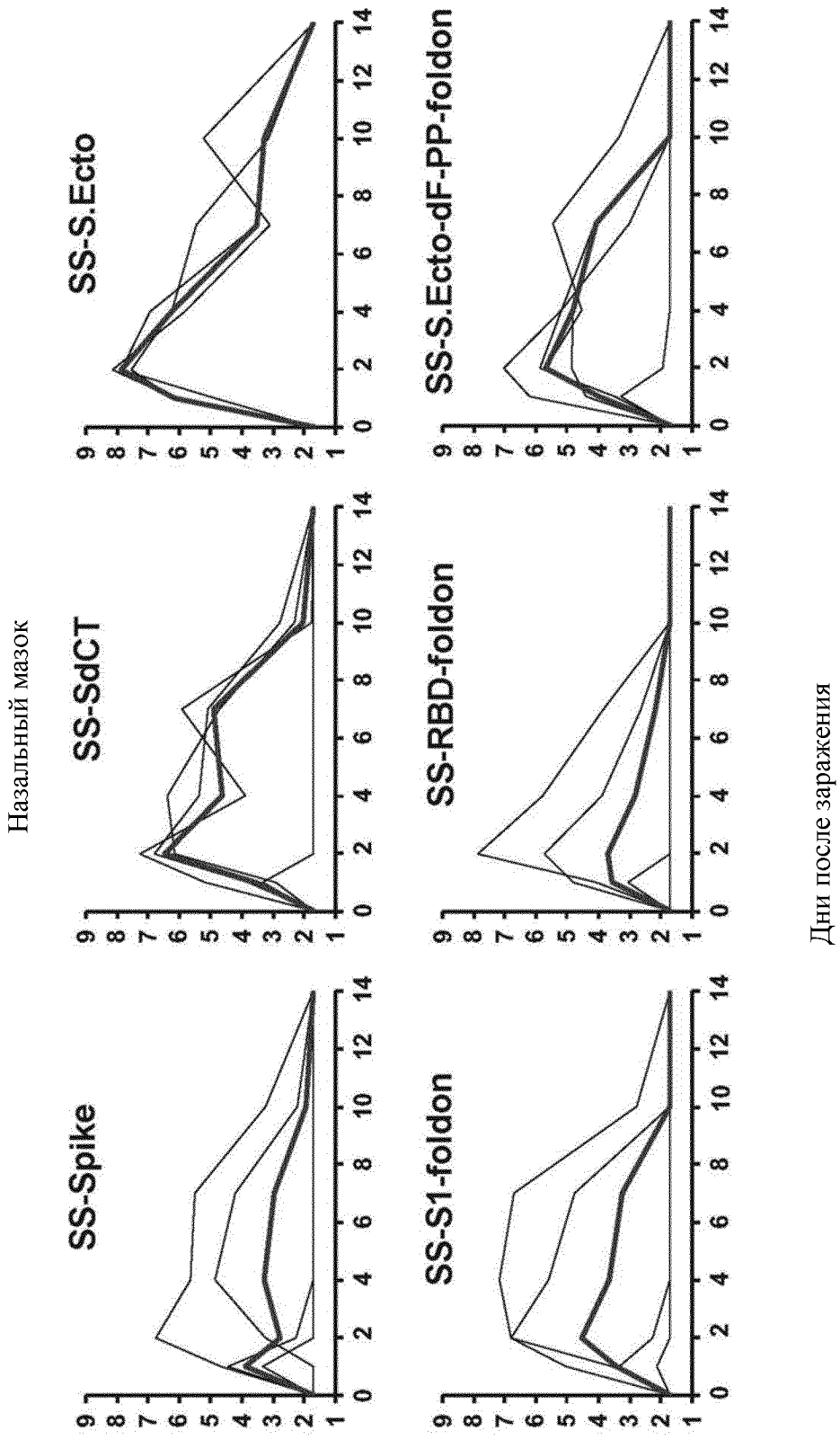
Фиг. 10


BAL
Назальный мазок
Плацебо
Плацебо
Титр Log вирусной РНК
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
2
4
6
8
10
12
14
Дни после заражения

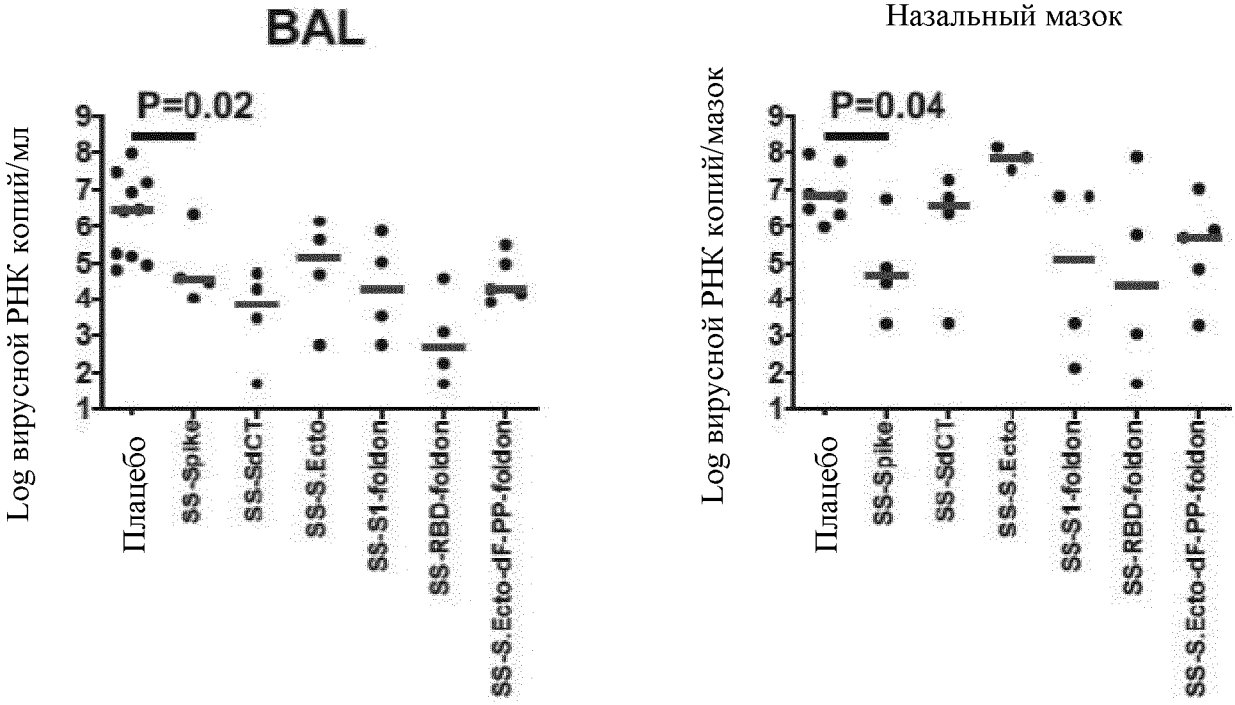
Фиг. 11


BAL
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon
Log вирусной РНК копий/мл
Дни после заражения

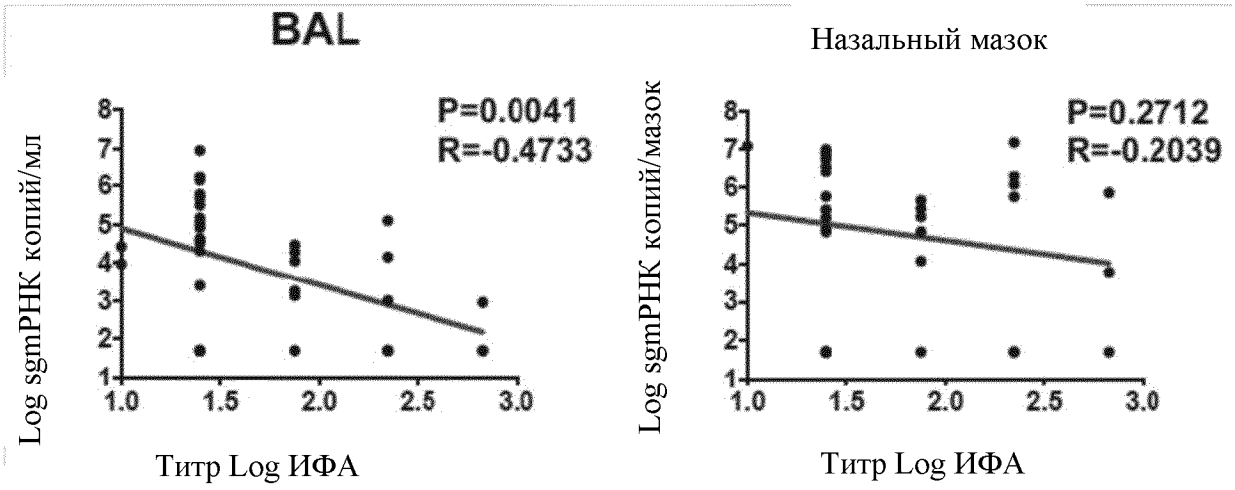
Фиг. 12


Назальный мазок
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon
Log вирусной РНК копий/мл
Дни после заражения

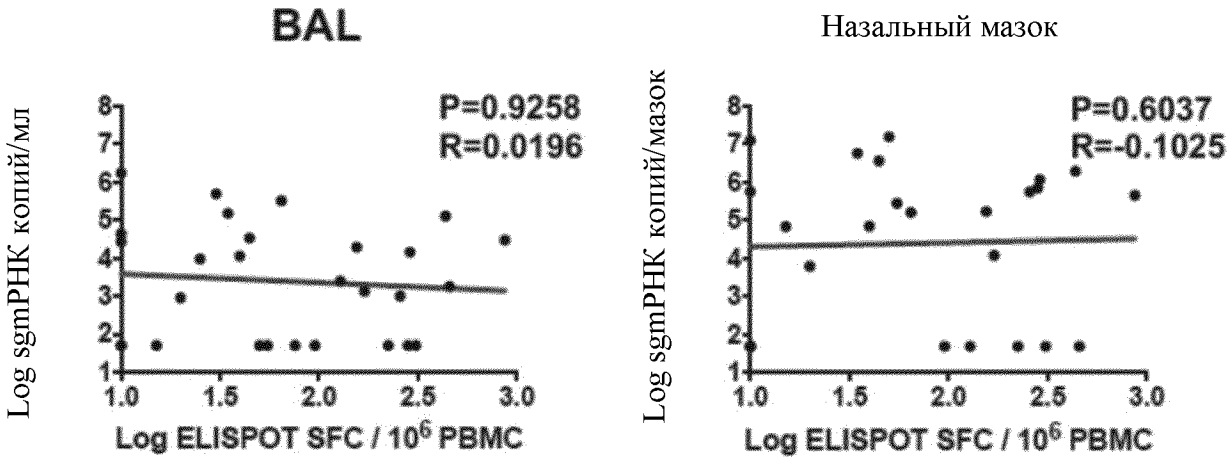
Фиг. 13


BAL
P=0.02
Log вирусной РНК копий/мл
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon
Назальный мазок
P=0.04
Log вирусной РНК копий/мазок

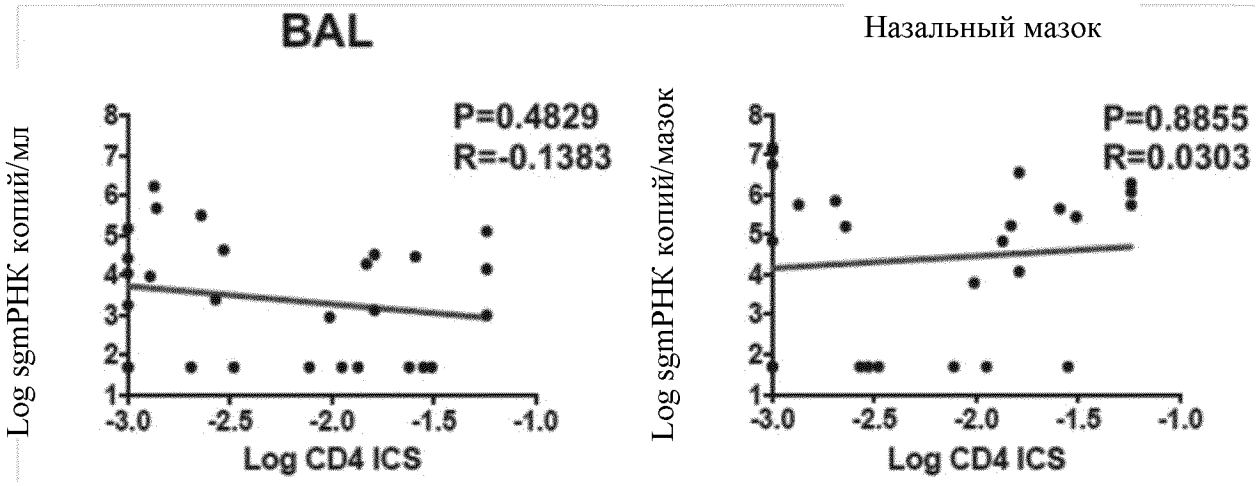
Фиг. 14


BAL
P=0.0041
R=-0.4733
Log sgmРНК копий/мл
Титр Log ИФА
Назальный мазок
P=0.2712
R=-0.2039
Log sgmРНК копий/мазок
Титр Log ИФА

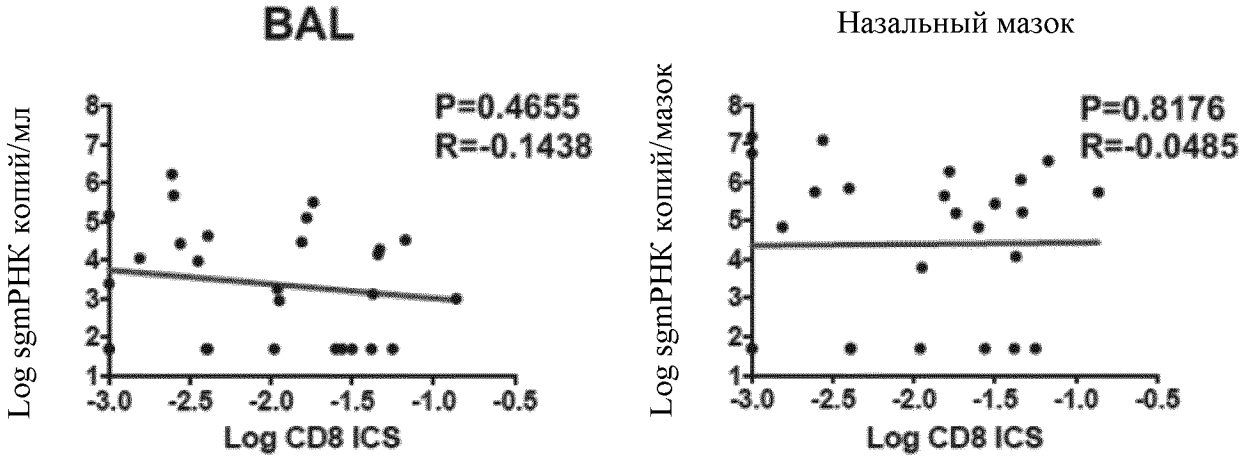
Фиг. 15



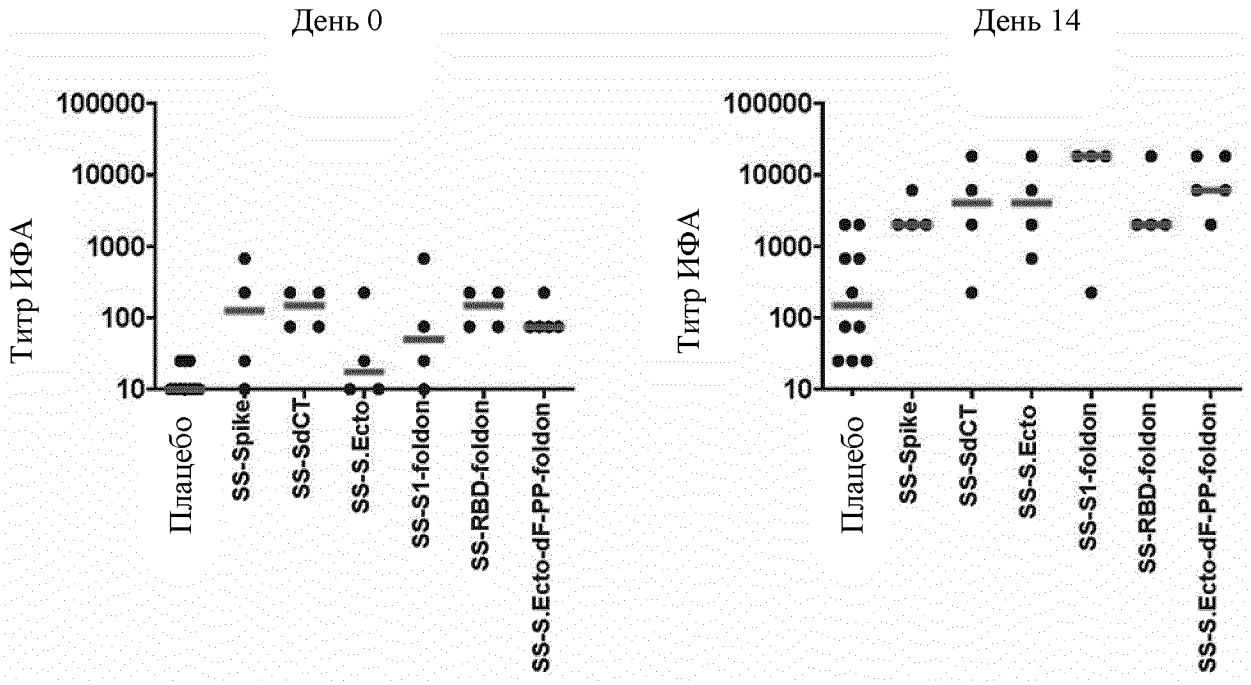
Фиг. 16



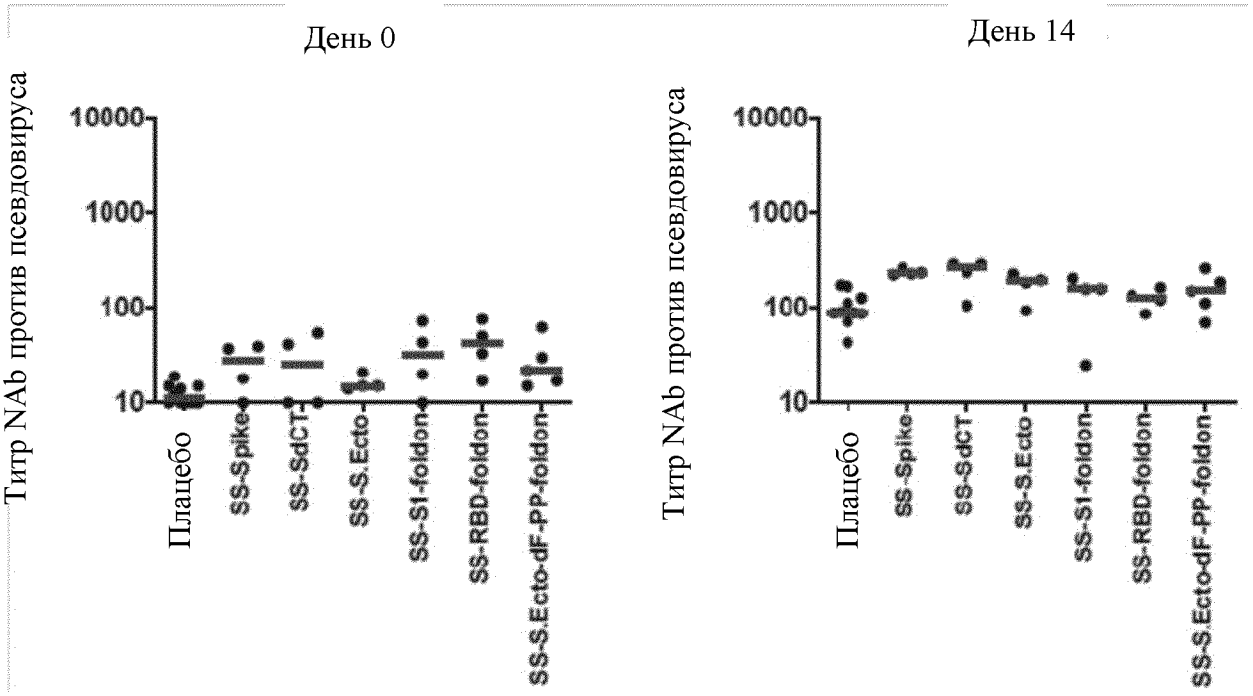
Фиг. 17



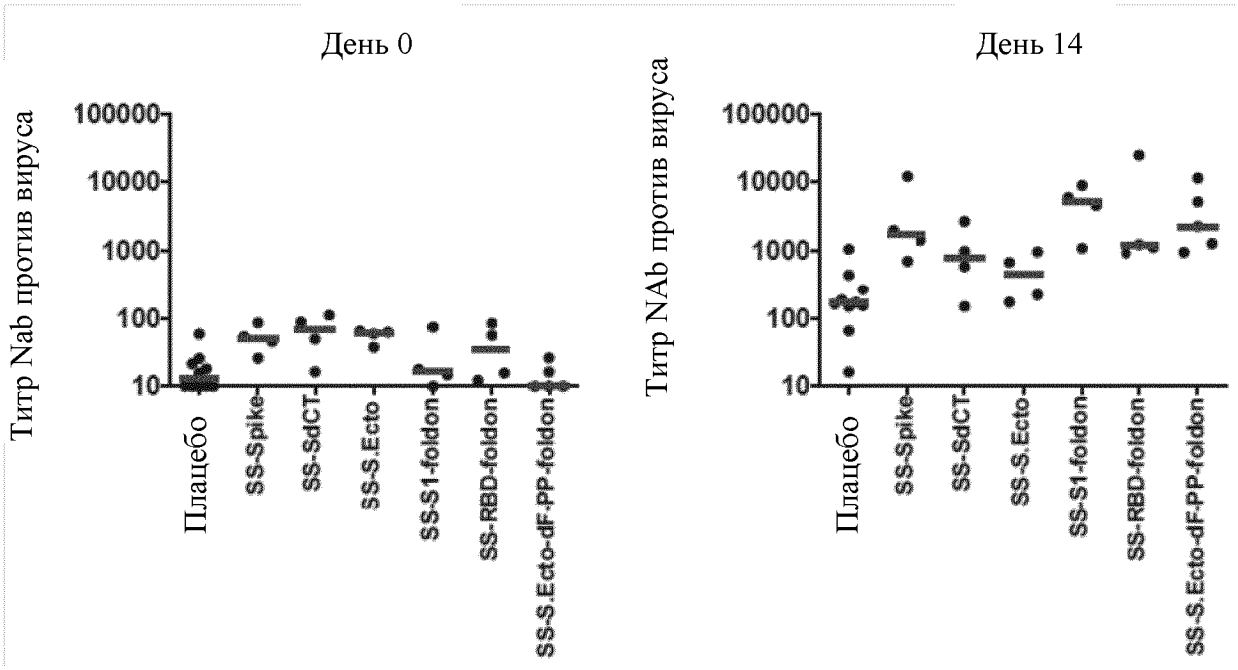
Фиг. 18


День 0
День 14
Титр ИФА
100000
10000
1000
100
10
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

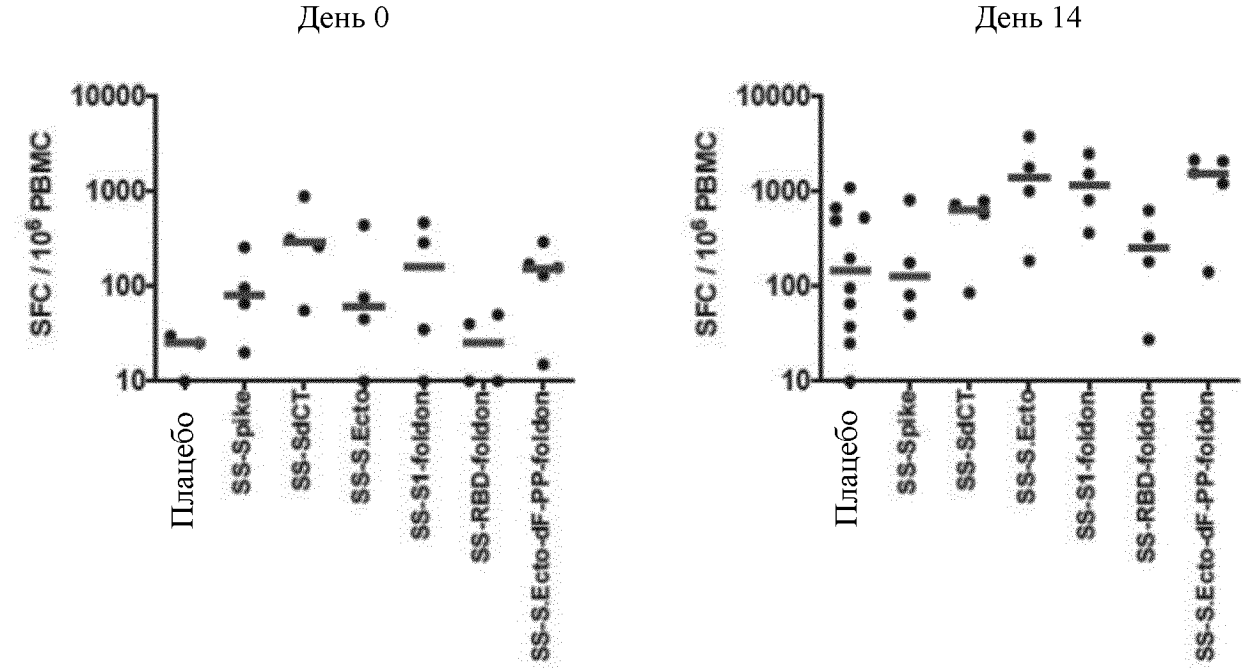
Фиг. 19


День 0
День 14
Титр NAb против псевдовируса
10000
1000
100
10
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

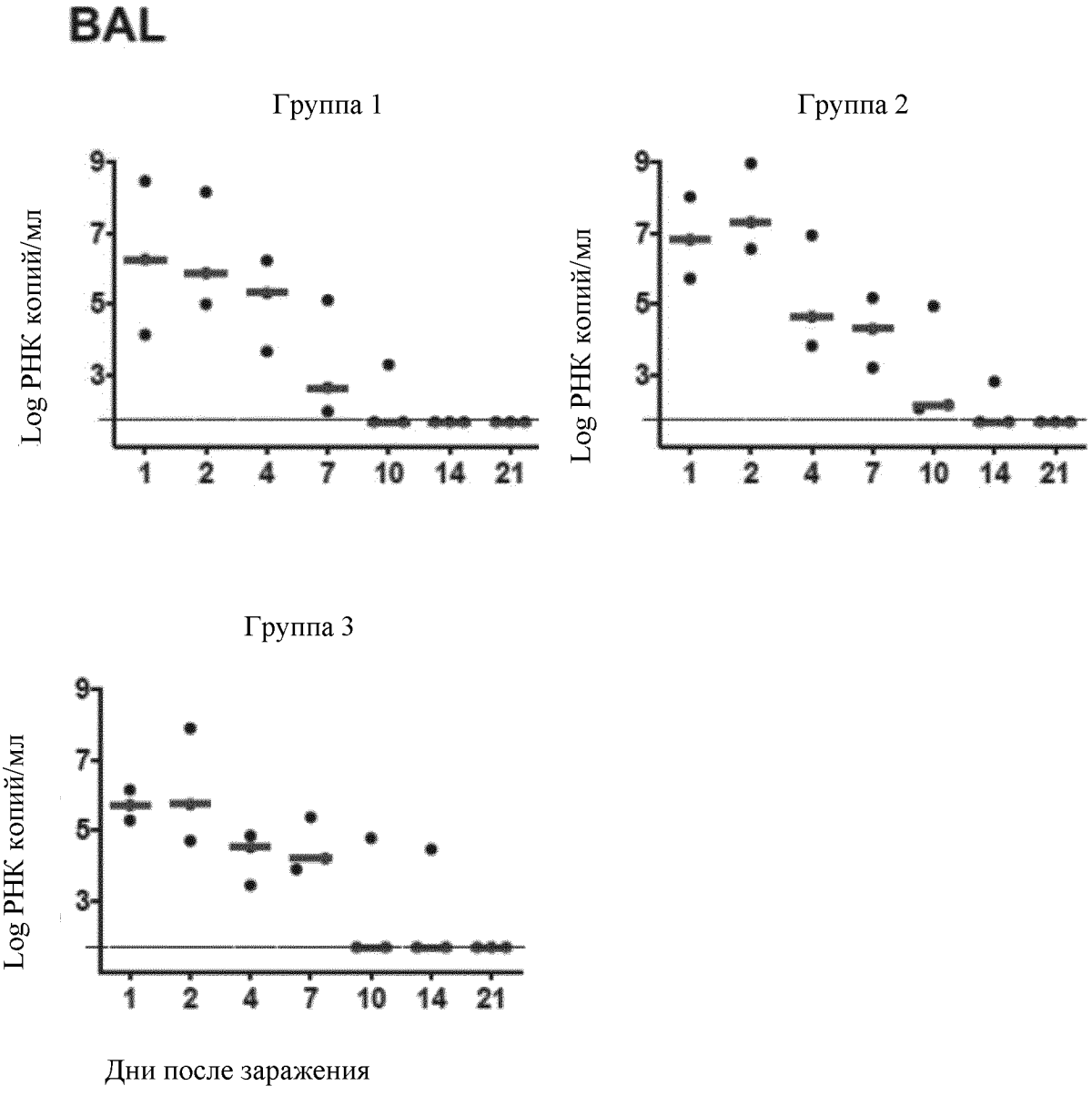
Фиг. 20


День 0
День 14
Титр Nab против вируса
Титр NAb против вируса
100000
10000
1000
100
10
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

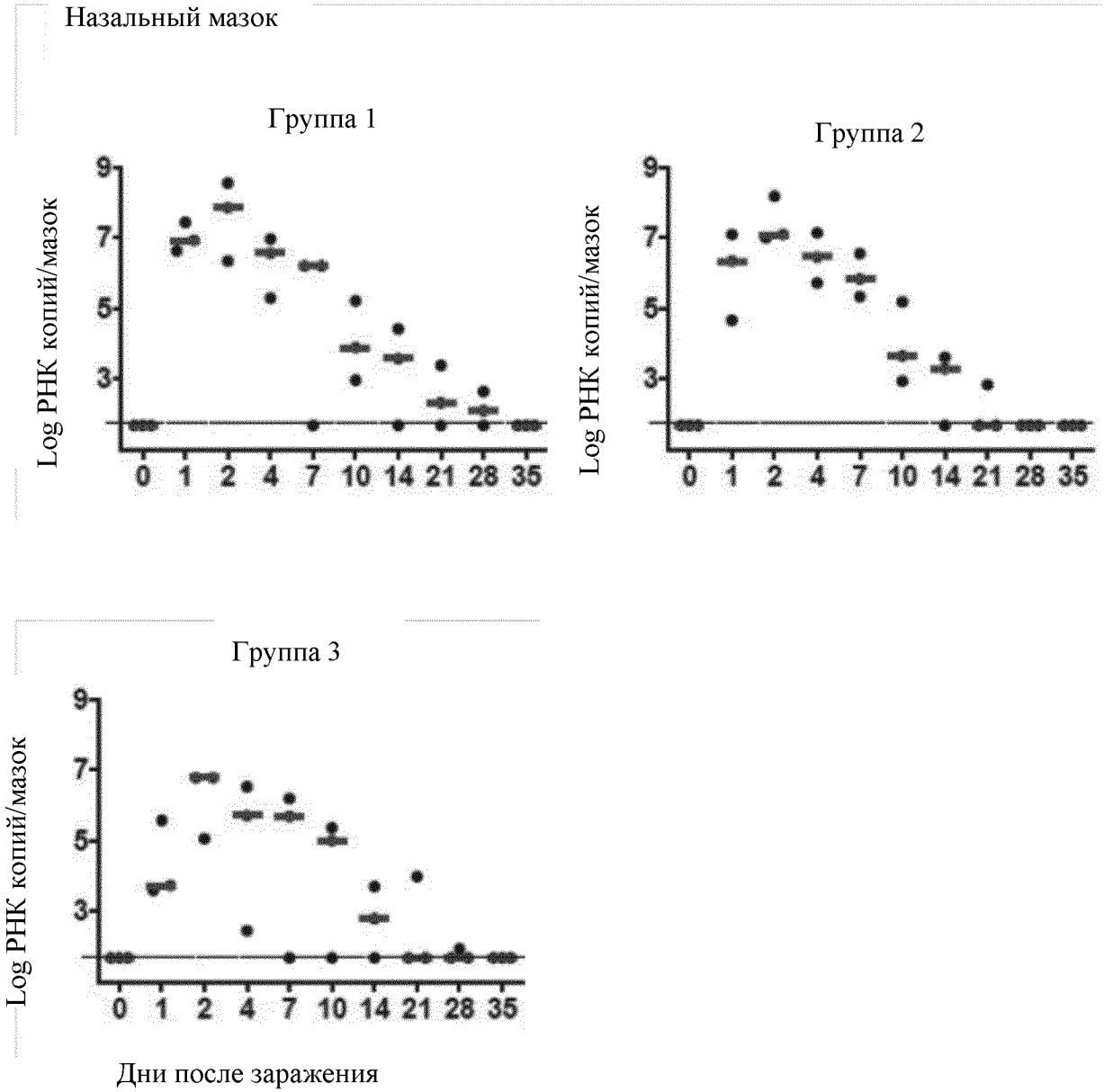
Фиг. 21


День 0
День 14
SFC / 10^6 PBMC
10000
1000
100
10
Плацебо
SS-Spike
SS-SdCT
SS-S.Ecto
SS-S1-foldon
SS-RBD-foldon
SS-S.Ecto-dF-PP-foldon

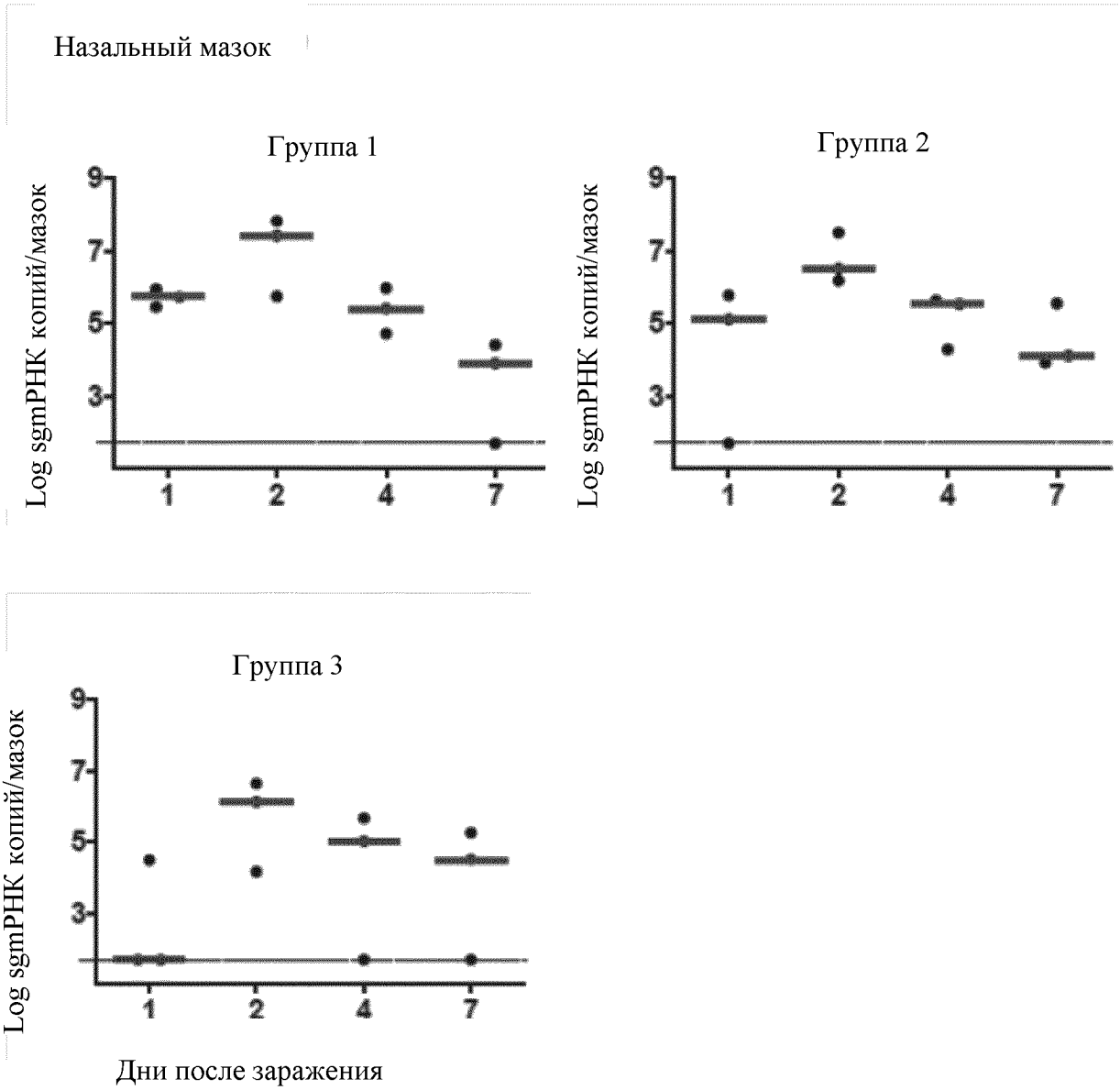
Фиг. 22


BAL
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Log РНК копий/мл
9
7
5
3
1
2
4
7
10
14
21
Дни после заражения

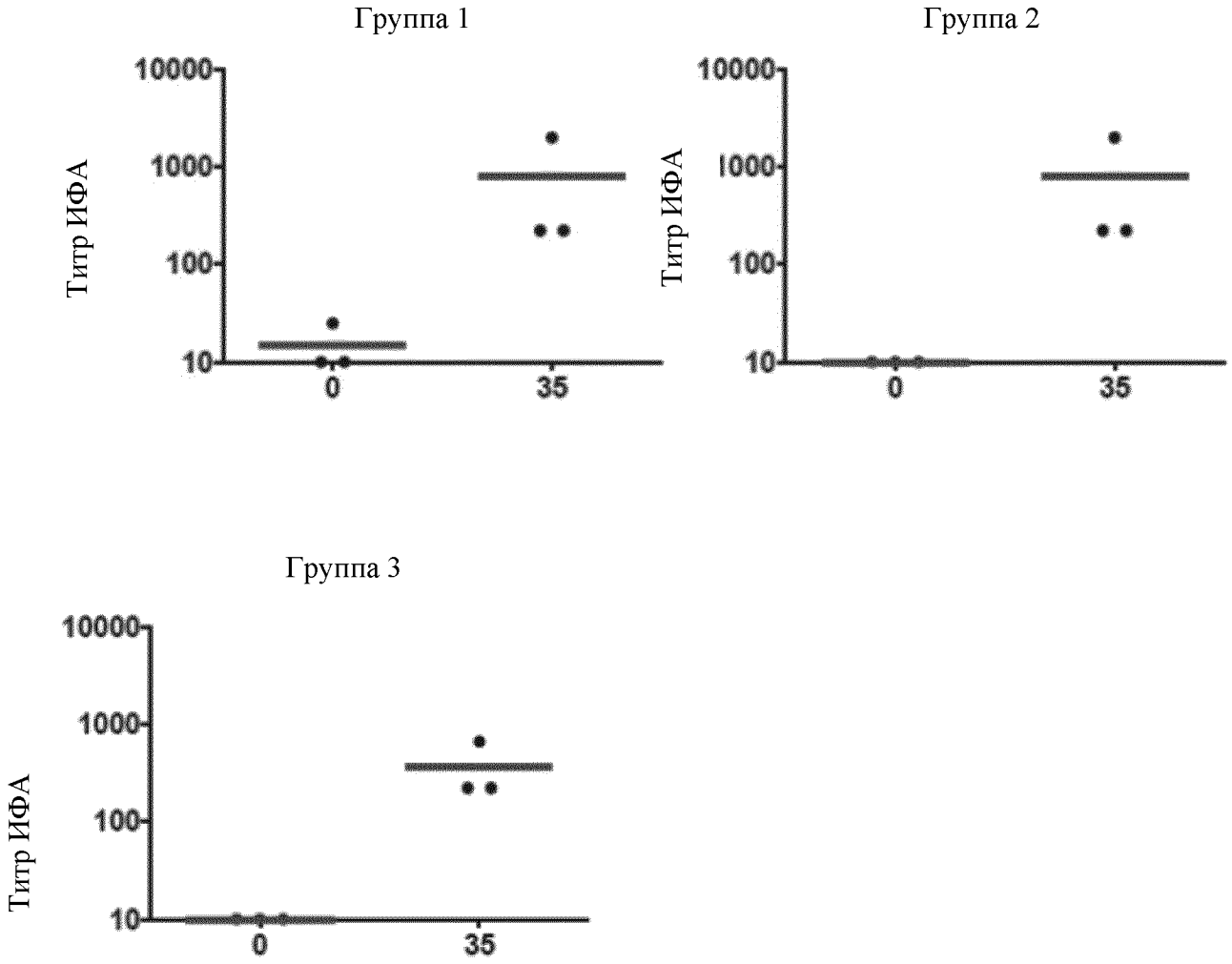
Фиг. 23А


Назальный мазок
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Log РНК копий/мазок
9
7
5
3
0 1 2 4 7 10 14 21 28 35
Дни после заражения

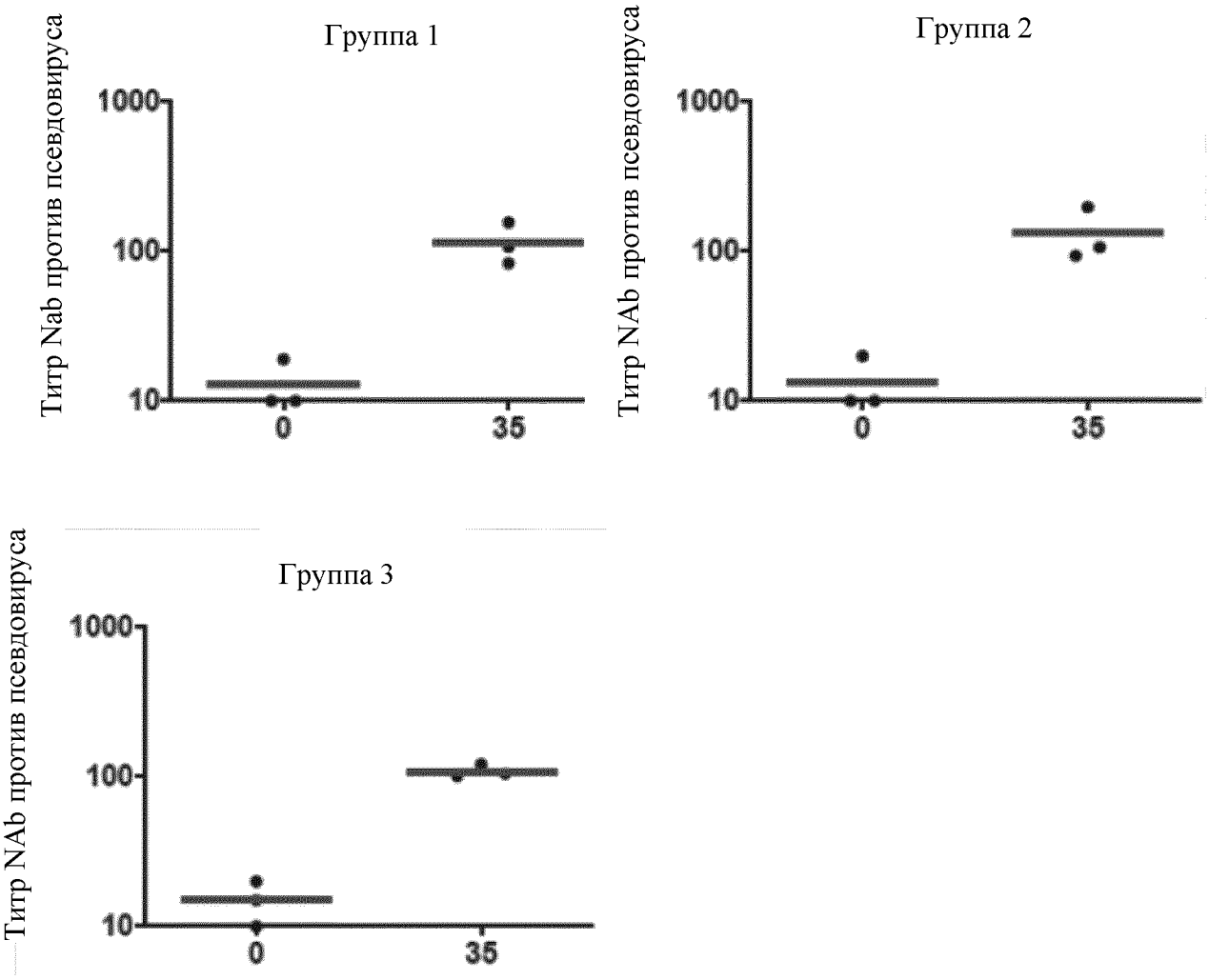
Фиг. 23B


Назальный мазок
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Log sgmPHK копий/мазок
9
7
5
3
1
2
4
7
Дни после заражения

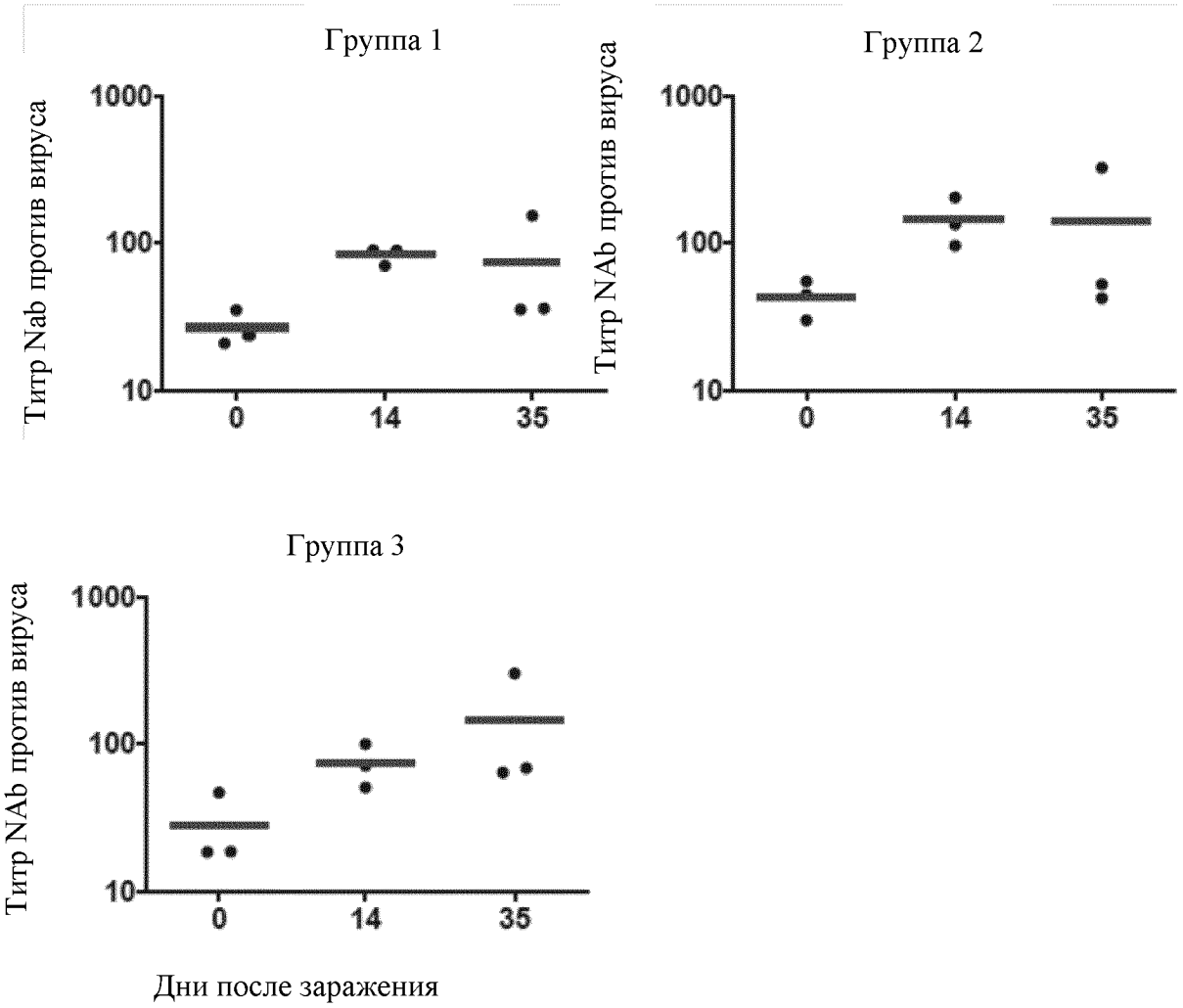
Фиг. 23C


Группа 1
Группа 2
Группа 3
Титр ИФА
10000
1000
100
10
0
35
Дни после заражения

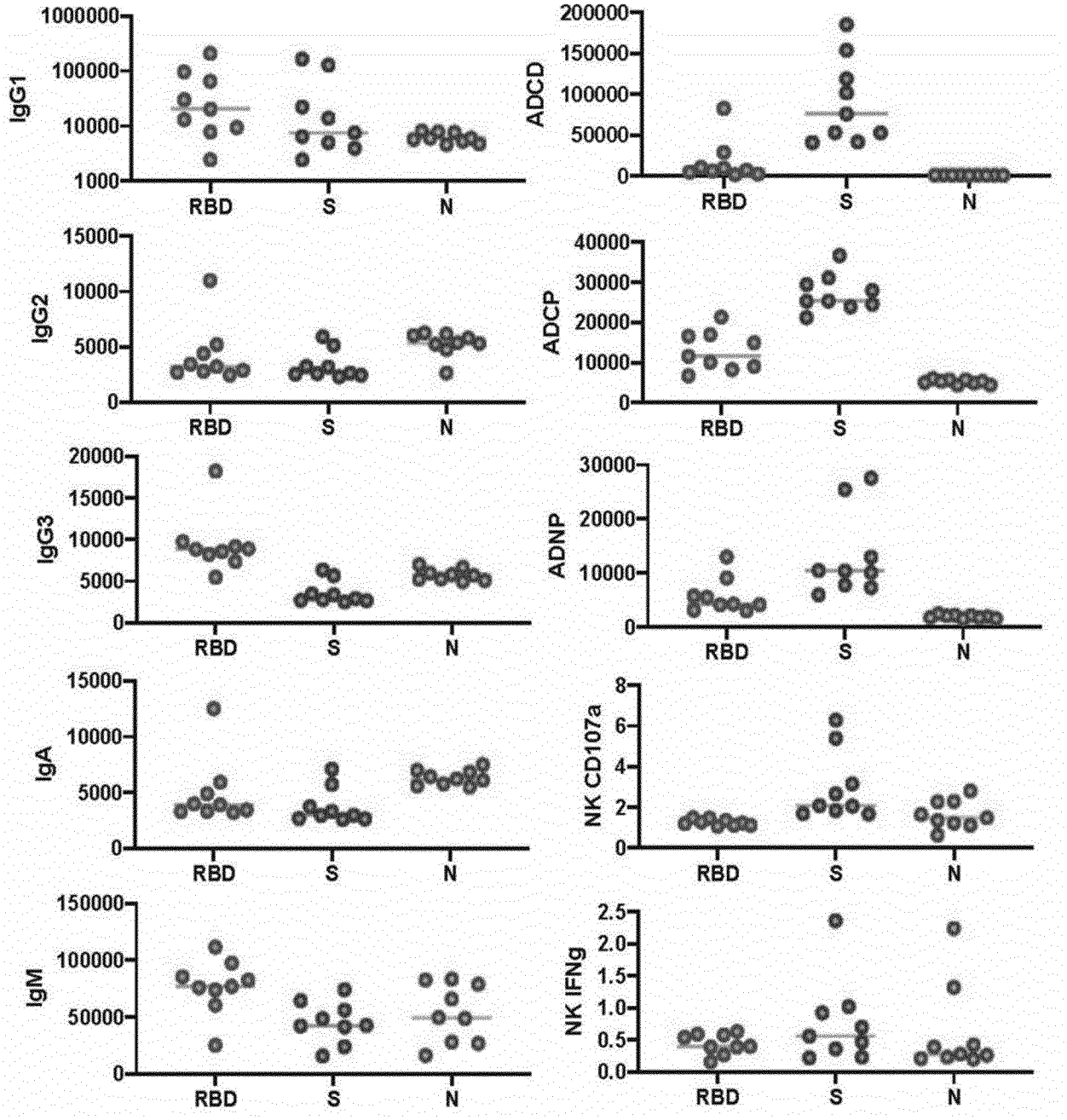
Фиг. 24А


Группа 1
Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
0
35
Группа 2
Титр NAb против псевдовируса
1000
100
10
0
35
Группа 3
Титр NAb против псевдовируса
1000
100
10
0
35
Дни после заражения

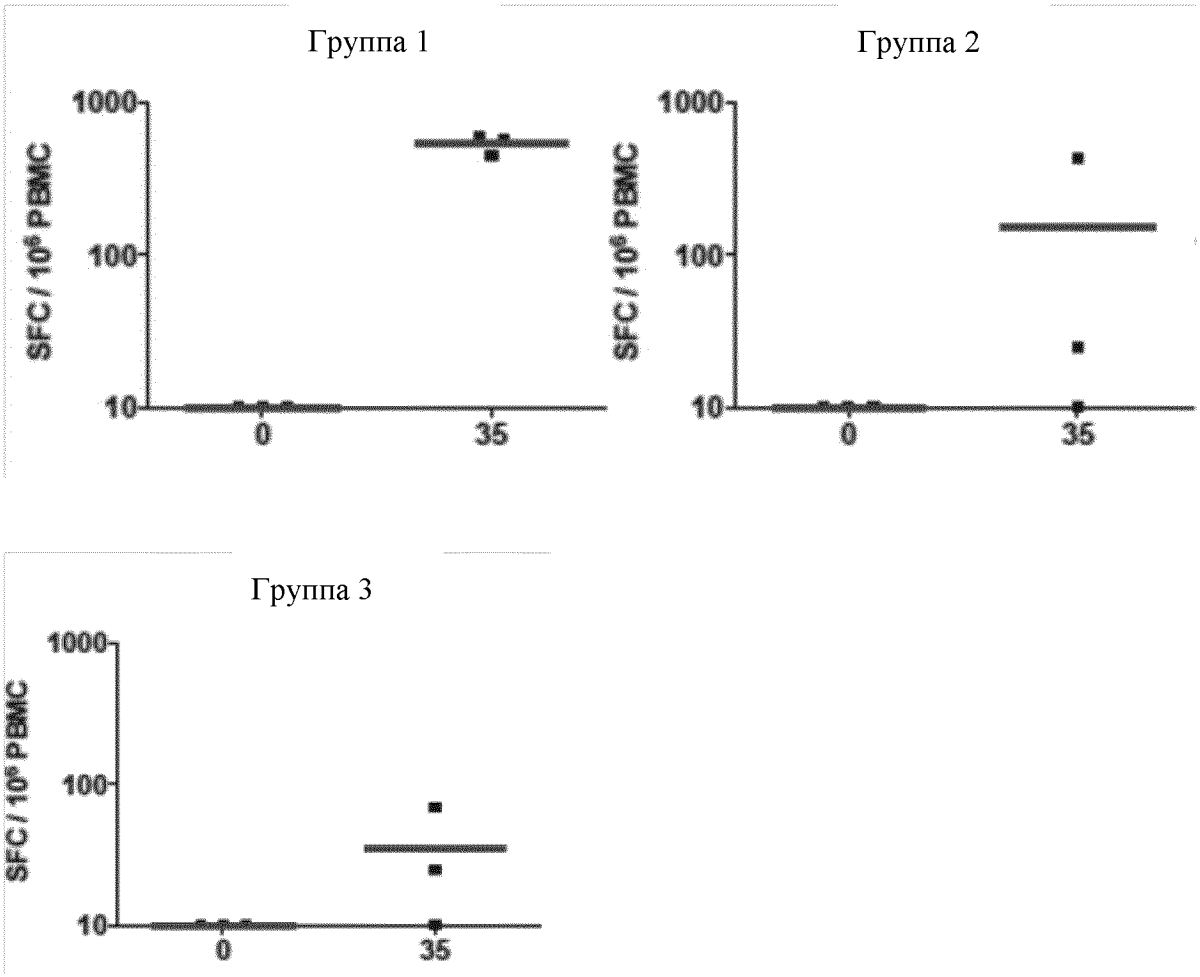
Фиг. 24B


Группа 1
Титр Nab против вируса
1000
100
10
0
14
35
Группа 2
Титр NAb против вируса
1000
100
10
0
14
35
Группа 3
Титр NAb против вируса
1000
100
10
0
14
35
Дни после заражения

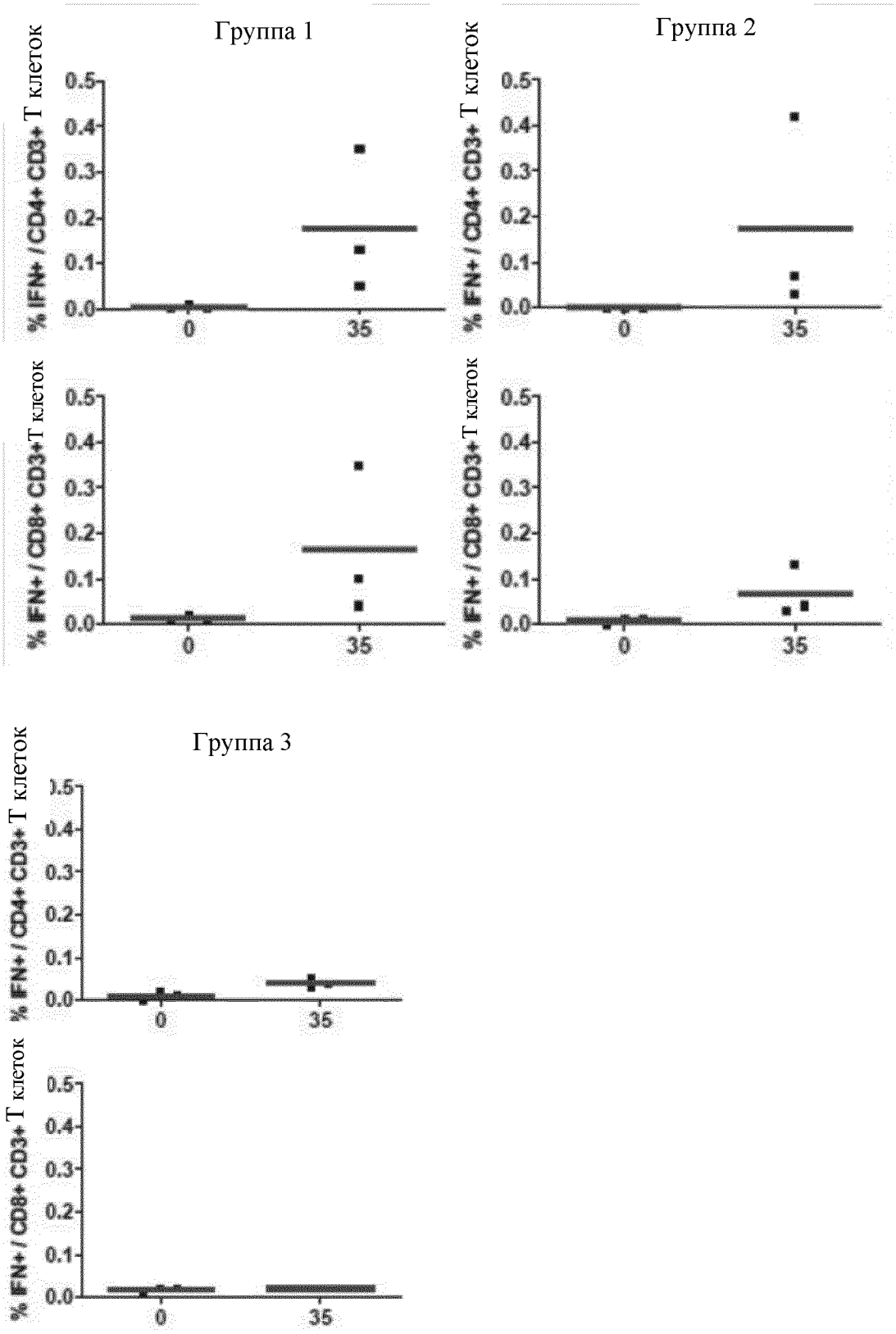
Фиг. 24C


IgG1
1000000
100000
10000
1000
RBD
S
N
ADCD
200000
150000
100000
50000
0
IgG2
15000
10000
5000
ADCP
40000
30000
20000
IgG3
20000
ADNP
30000
IgA
NK CD107a
8
6
4
2
IgM
150000
NK IFNg
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

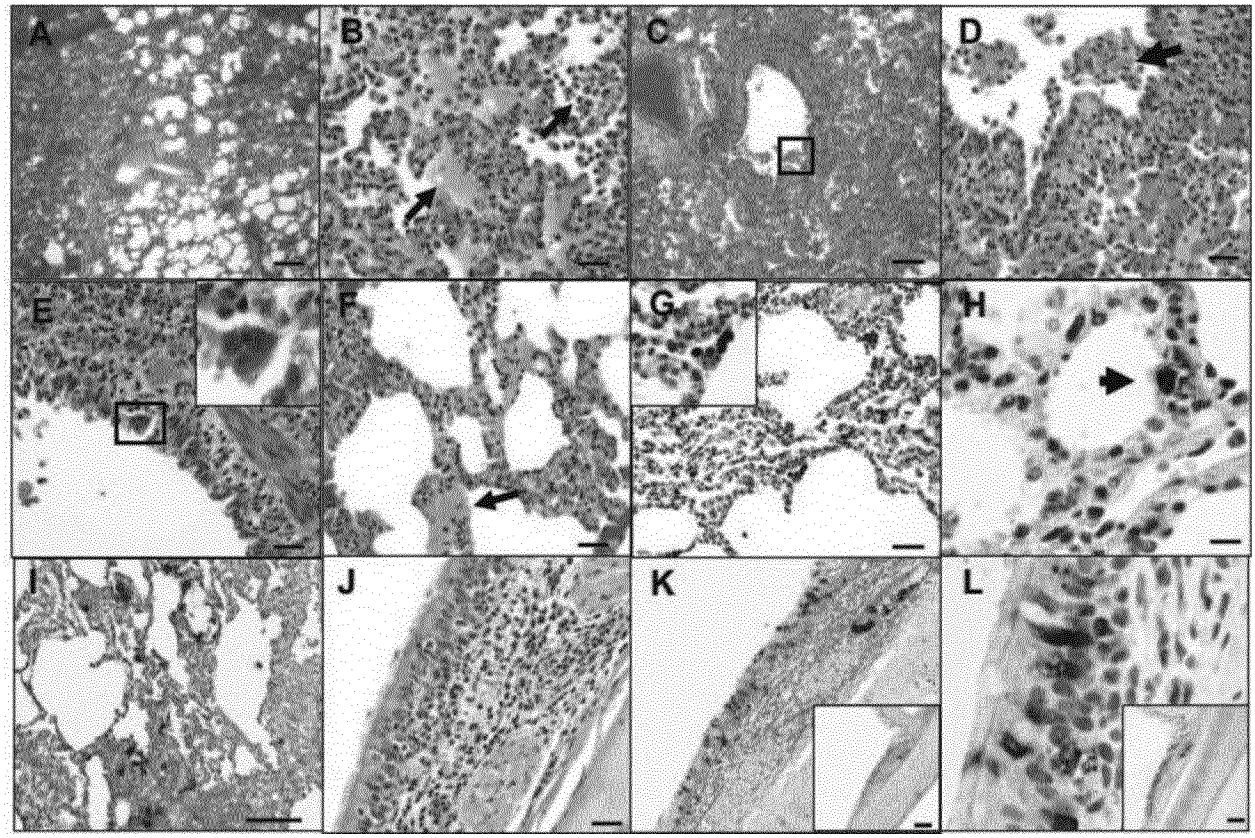
Фиг. 24D


Группа 1
Группа 2
Группа 3
SFC / 10^6 PBMC
1000
100
10
0
35
Дни после заражения

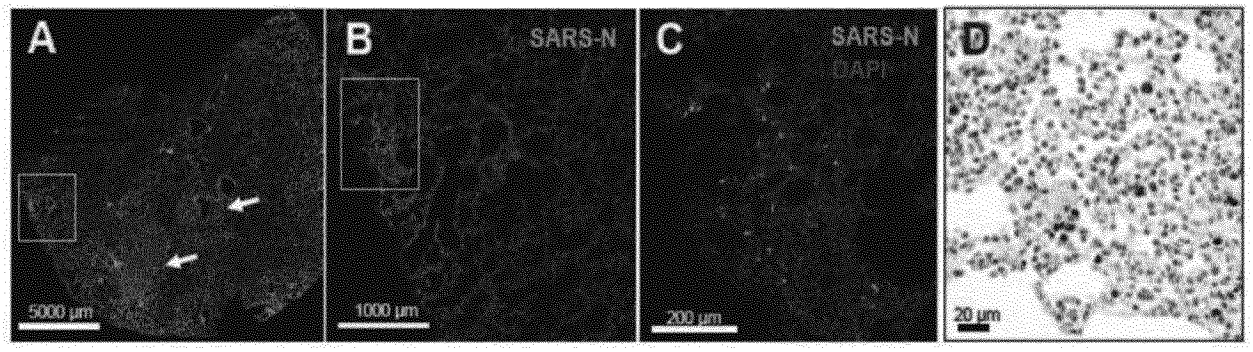
Фиг. 24E


Группа 1
Группа 2
Группа 3
% IFN+ / CD4+ CD3+ Т клеток
% IFN+ / CD8+ CD3+ Т клеток
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
35
Дни после заражения

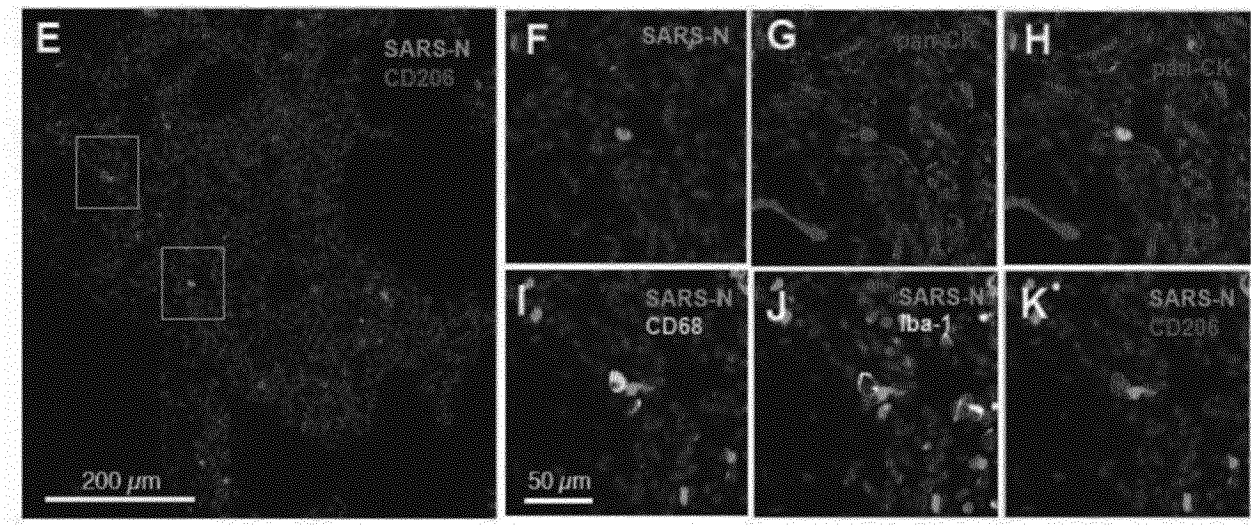
Фиг. 24F



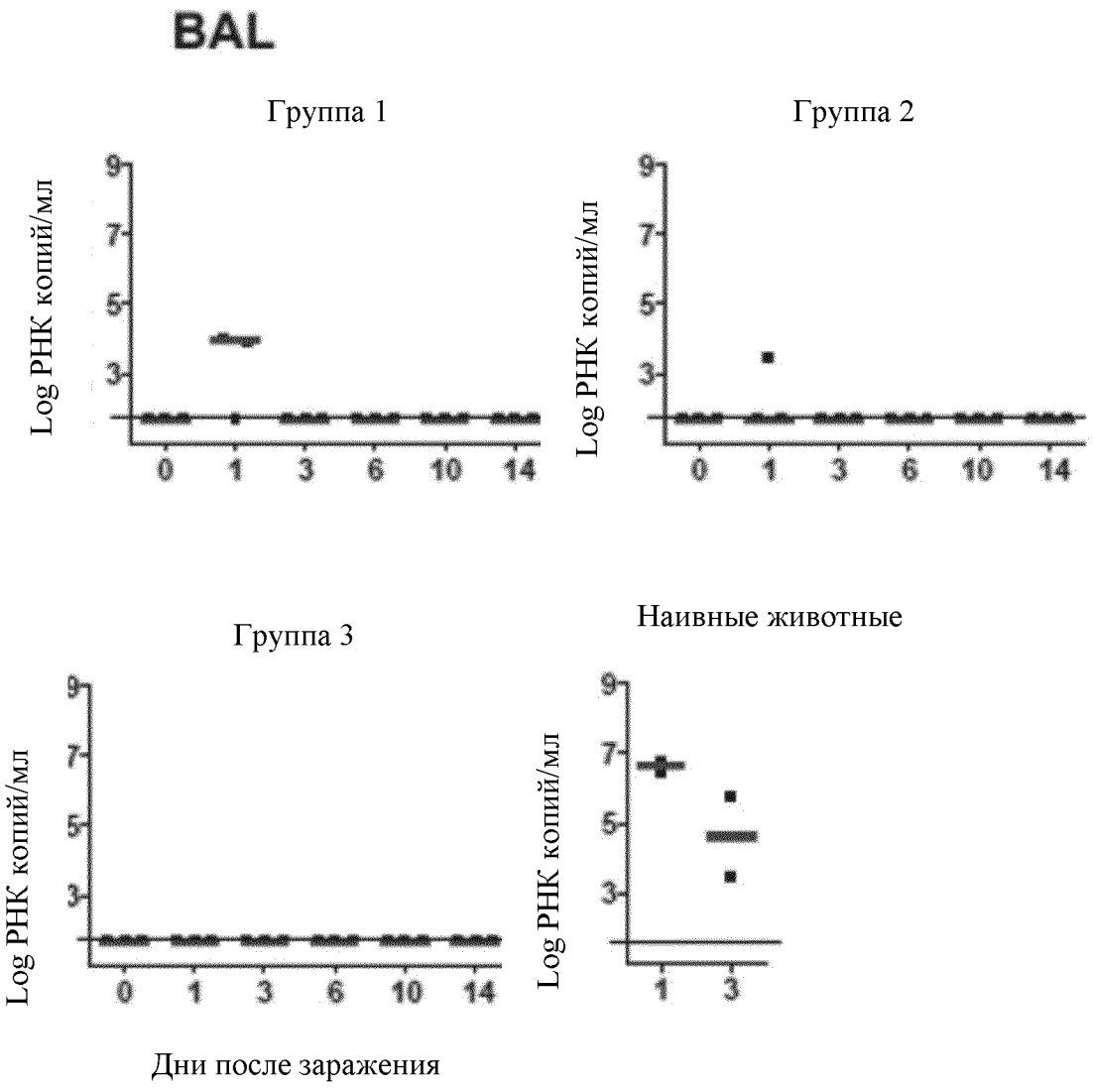
Фиг. 25A-25L



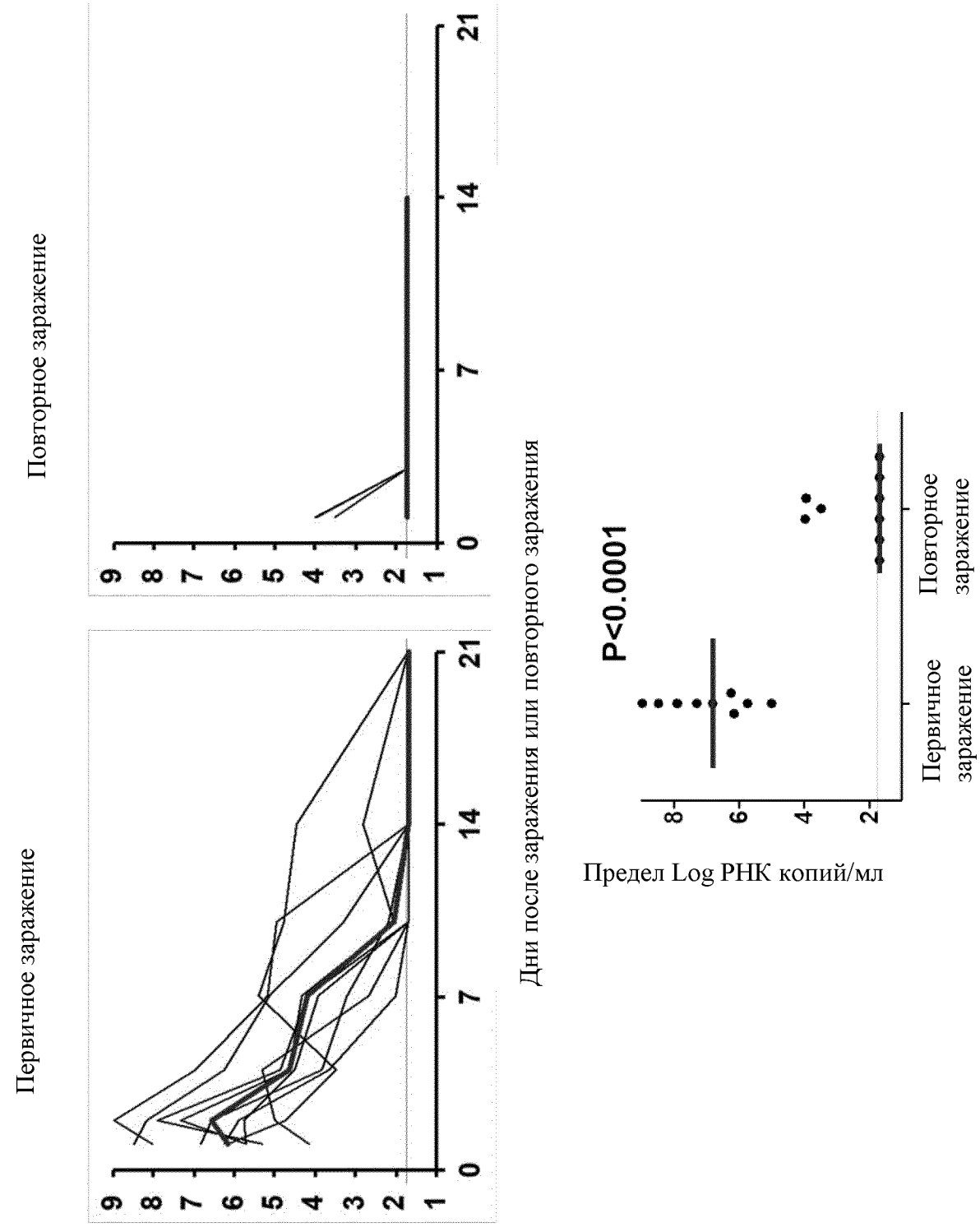
Фиг. 26A-26D



Фиг. 26E-26K

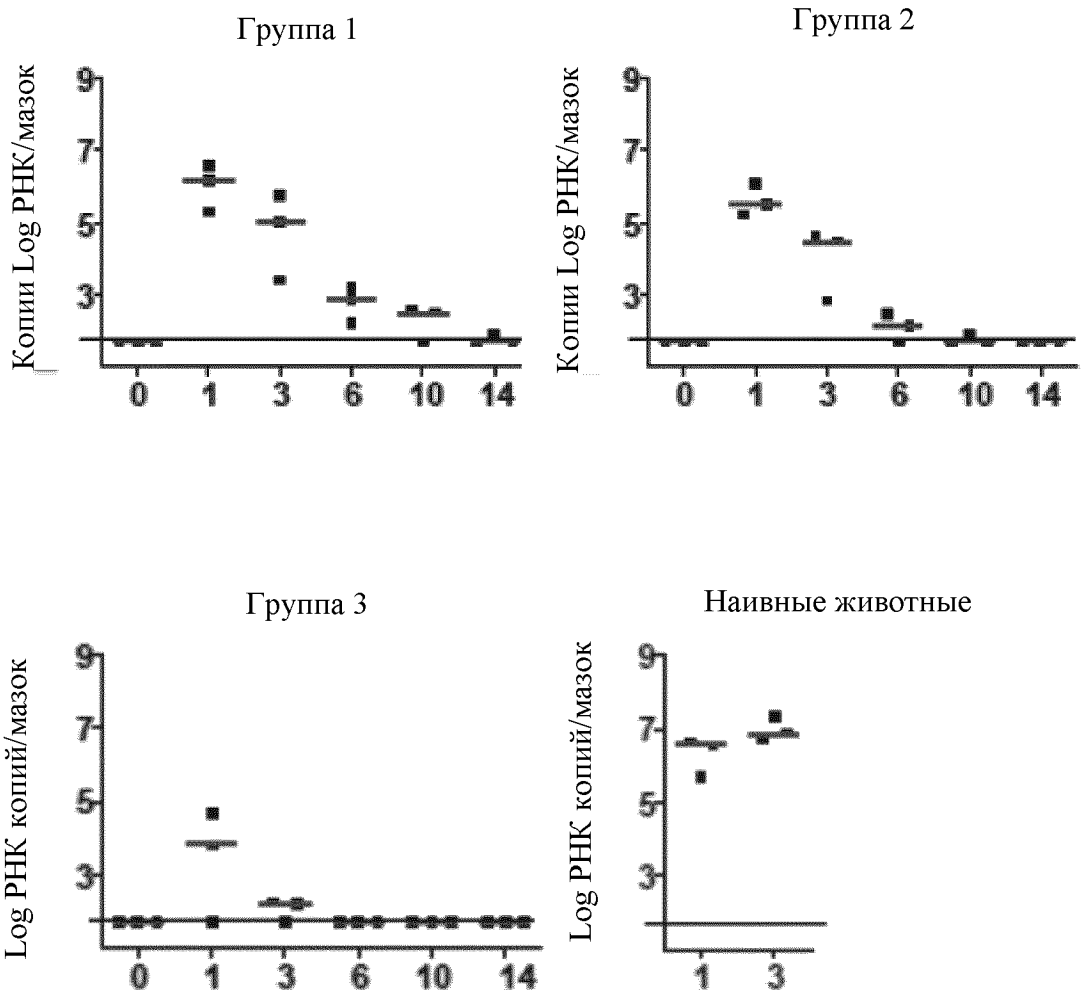


Фиг. 27A

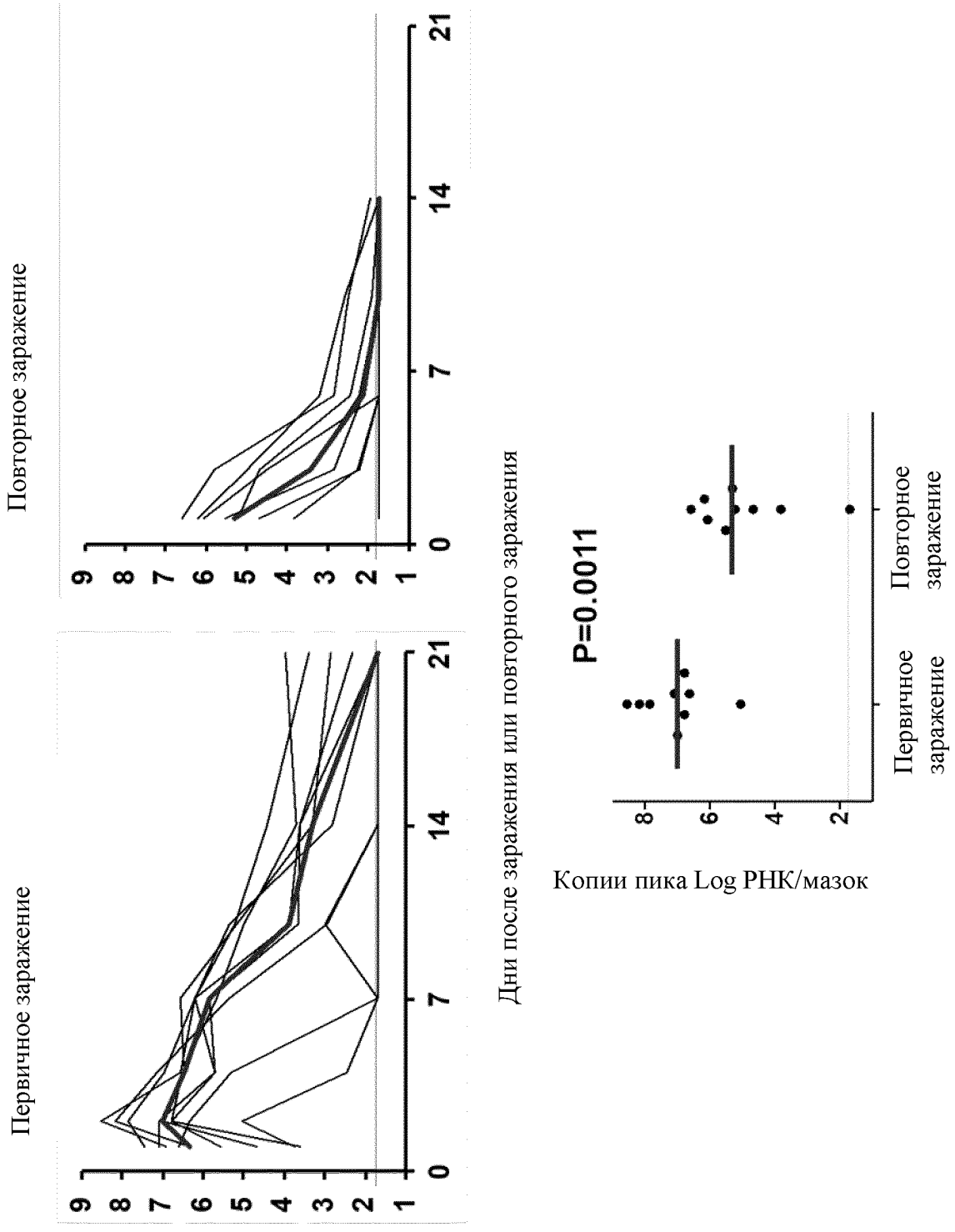

Первичное заражение
Повторное заражение
Log РНК копий/мл
Дни после заражения или повторного заражения
P<0.0001
Предел Log РНК копий/мл
Первичное заражение
Повторное заражение

Фиг. 27B

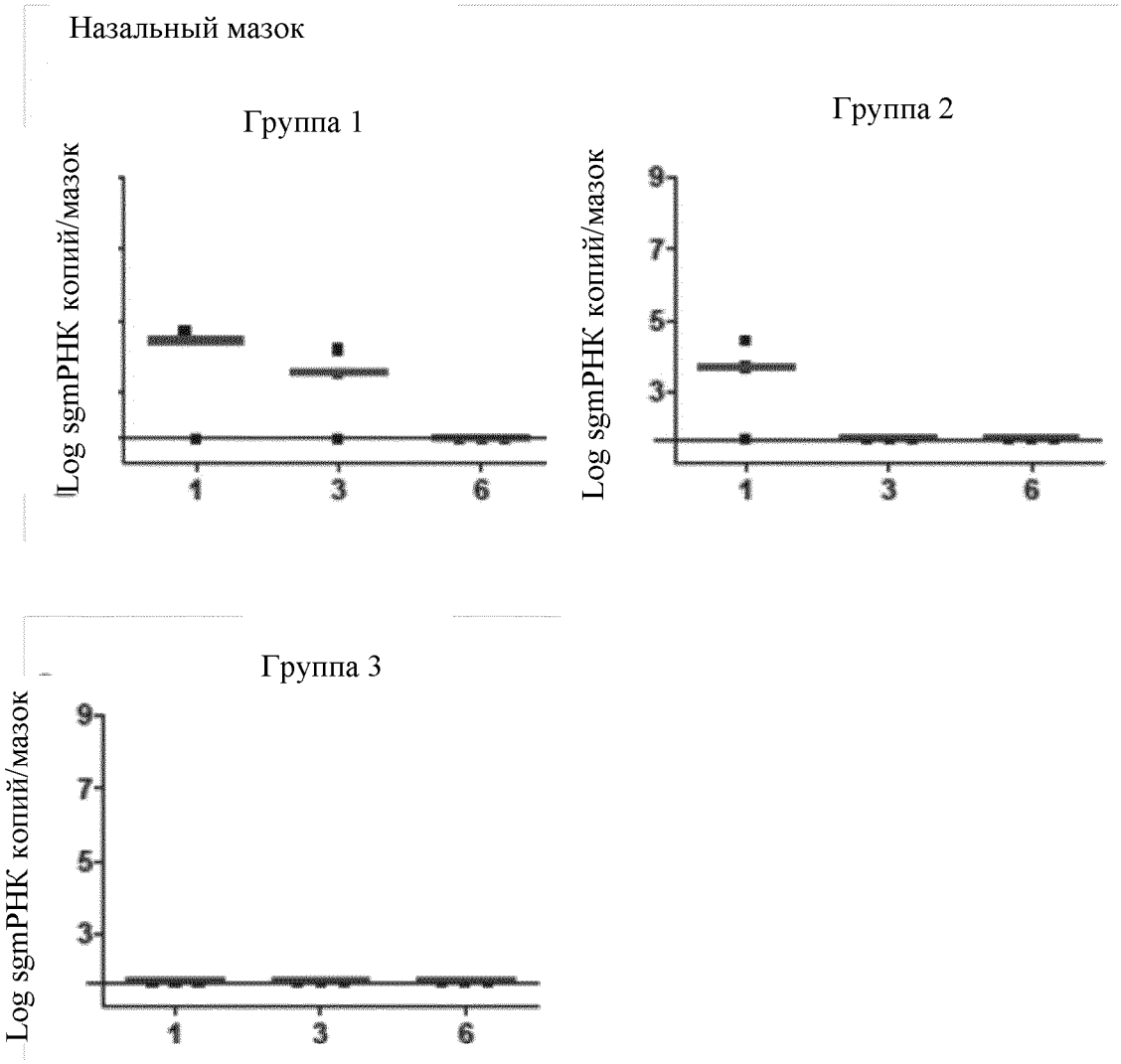
Назальный мазок



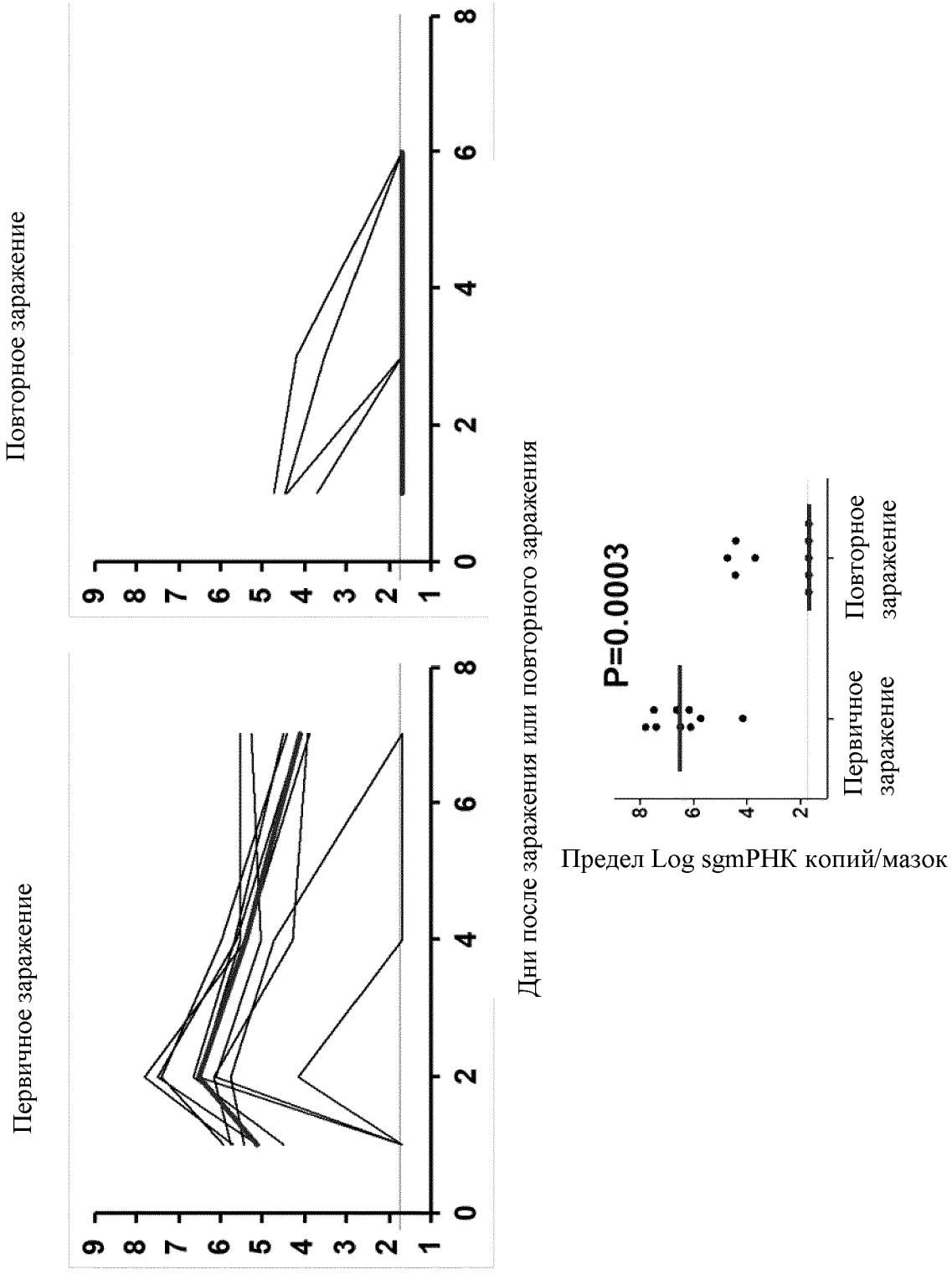
Фиг. 27C


Повторное заражение
Первичное заражение
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
7
14
21
Log РНК копий/мазок
Дни после заражения или повторного заражения
P=0.0011
8
6
4
2
Копии пика Log РНК/мазок
Первичное заражение
Повторное заражение

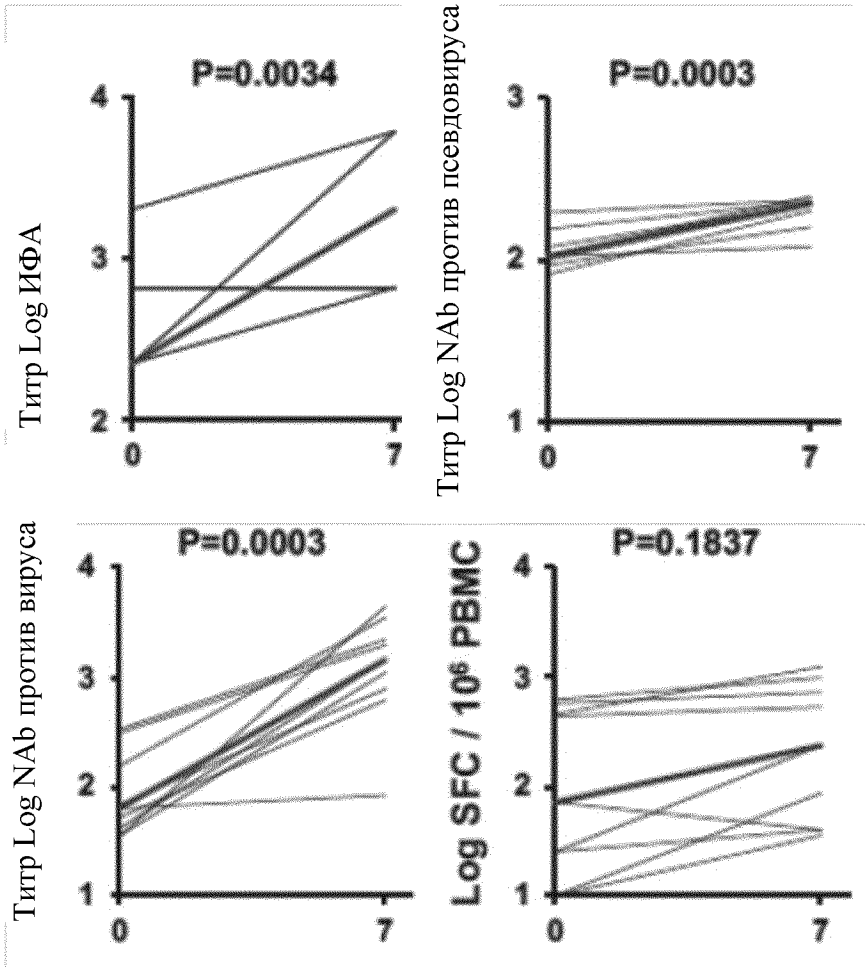
Фиг. 27D


Назальный мазок
Группа 1
Log sgmPHK копий/мазок
9
7
5
3
1
3
6
Группа 2
Log sgmPHK копий/мазок
9
7
5
3
1
3
6
Группа 3
Log sgmPHK копий/мазок
9
7
5
3
1
3
6
Дни после повторного заражения

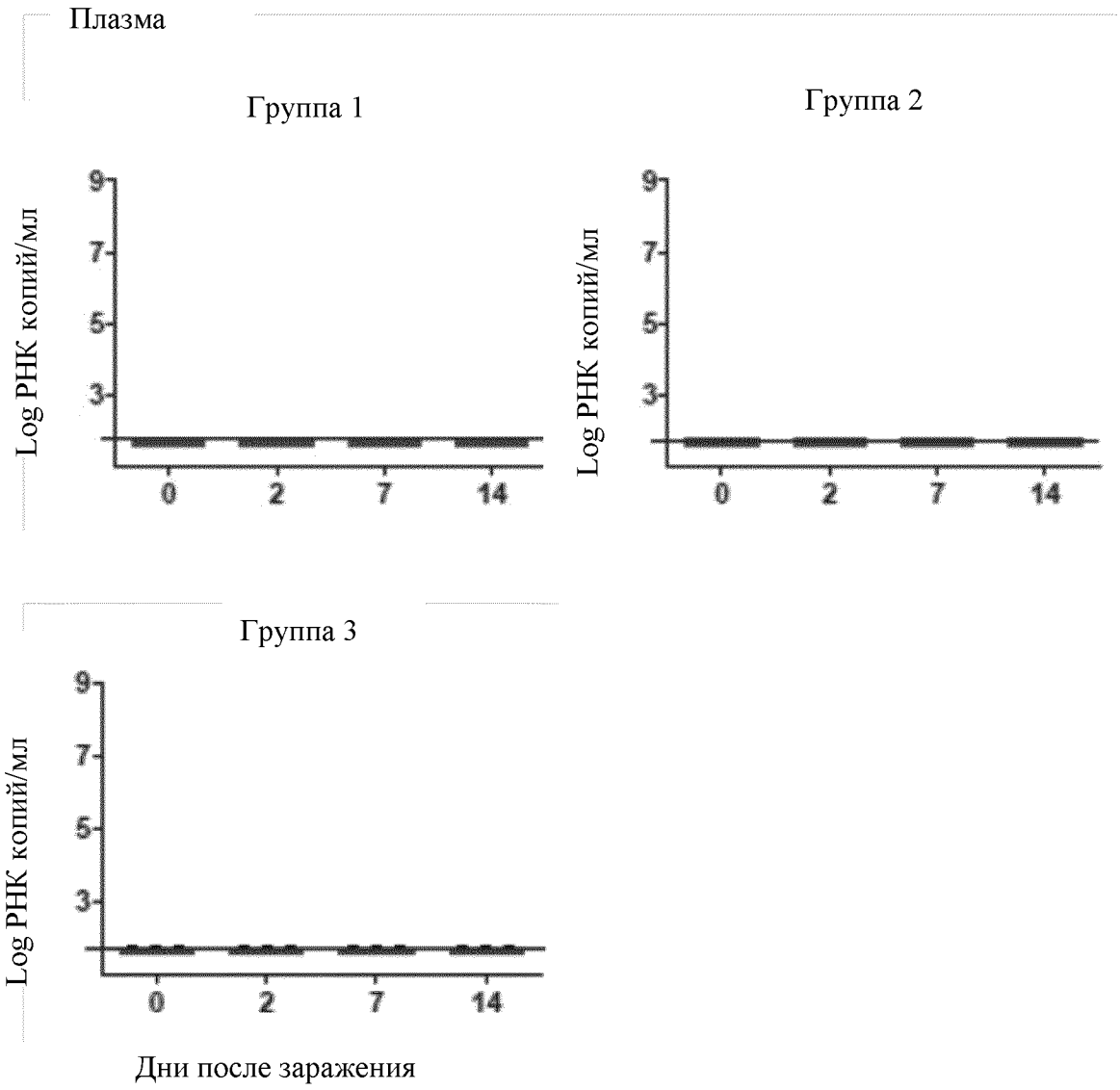
Фиг. 27E


Повторное заражение
Первичное заражение
Log sgmPHK копий/мазок
Дни после заражения или повторного заражения
P=0.0003
Предел Log sgmPHK копий/мазок
Первичное заражение
Повторное заражение

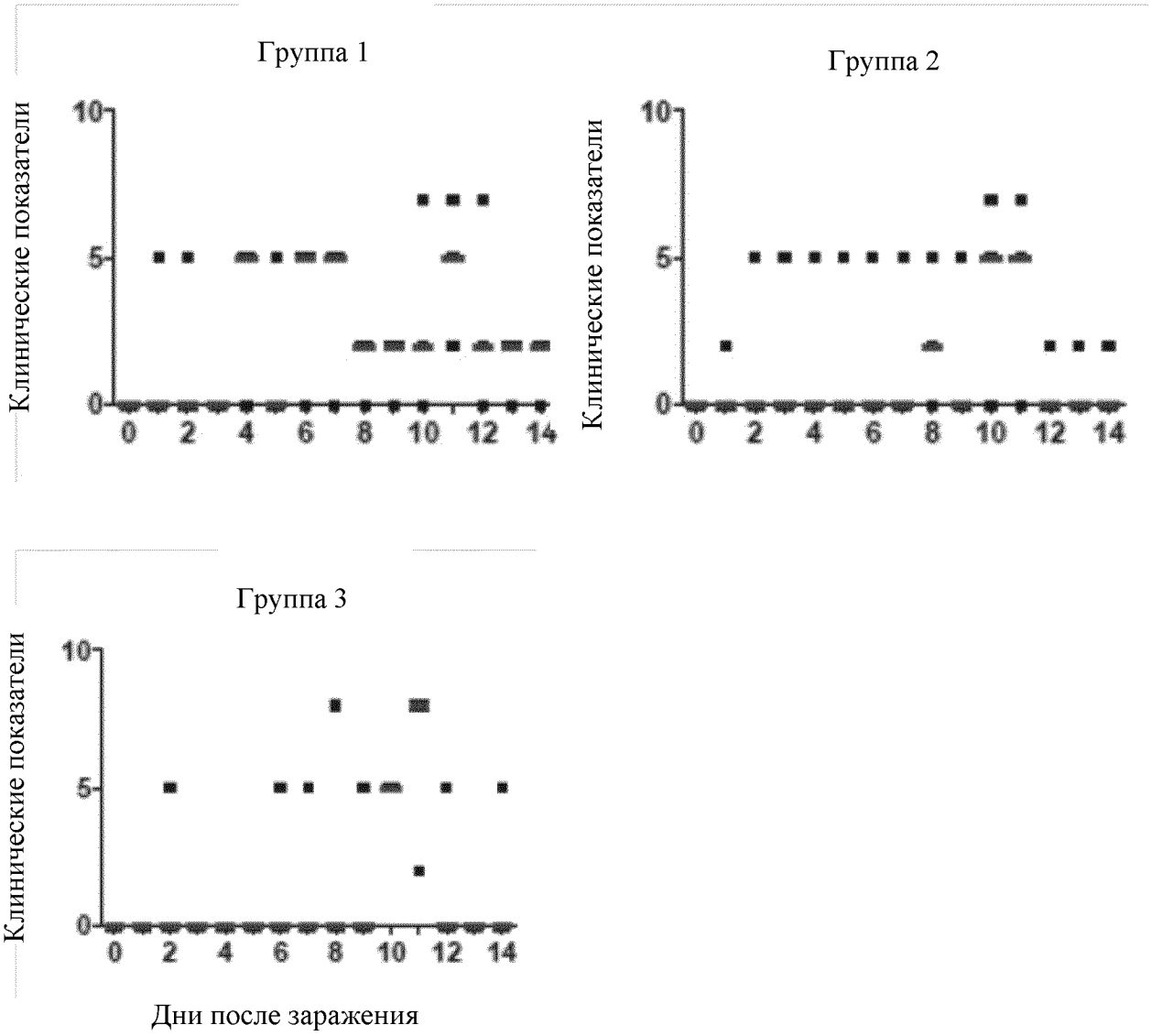
Фиг. 27F


P=0.0034
Титр Log ИФА
P=0.0003
Титр Log NAb против псевдовируса
P=0.0003
Титр Log NAb против вируса
P=0.1837
Log SFC / 10⁶ PBMC
0
7
Дни после повторного заражения

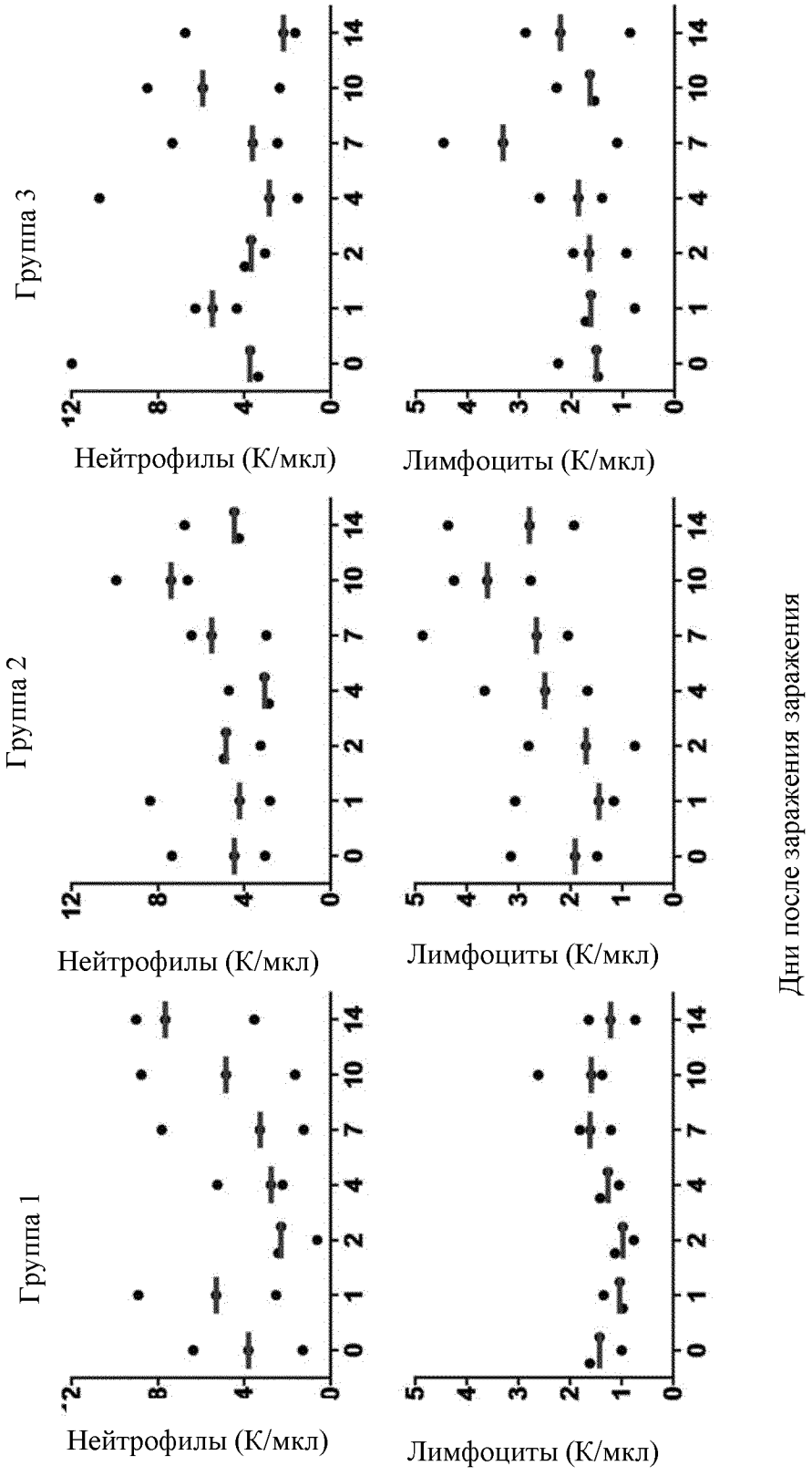
Фиг. 28


Плазма
Группа 1
Группа 2
Группа 3
Log РНК копий/мл
9
7
5
3
0
2
7
14
Дни после заражения

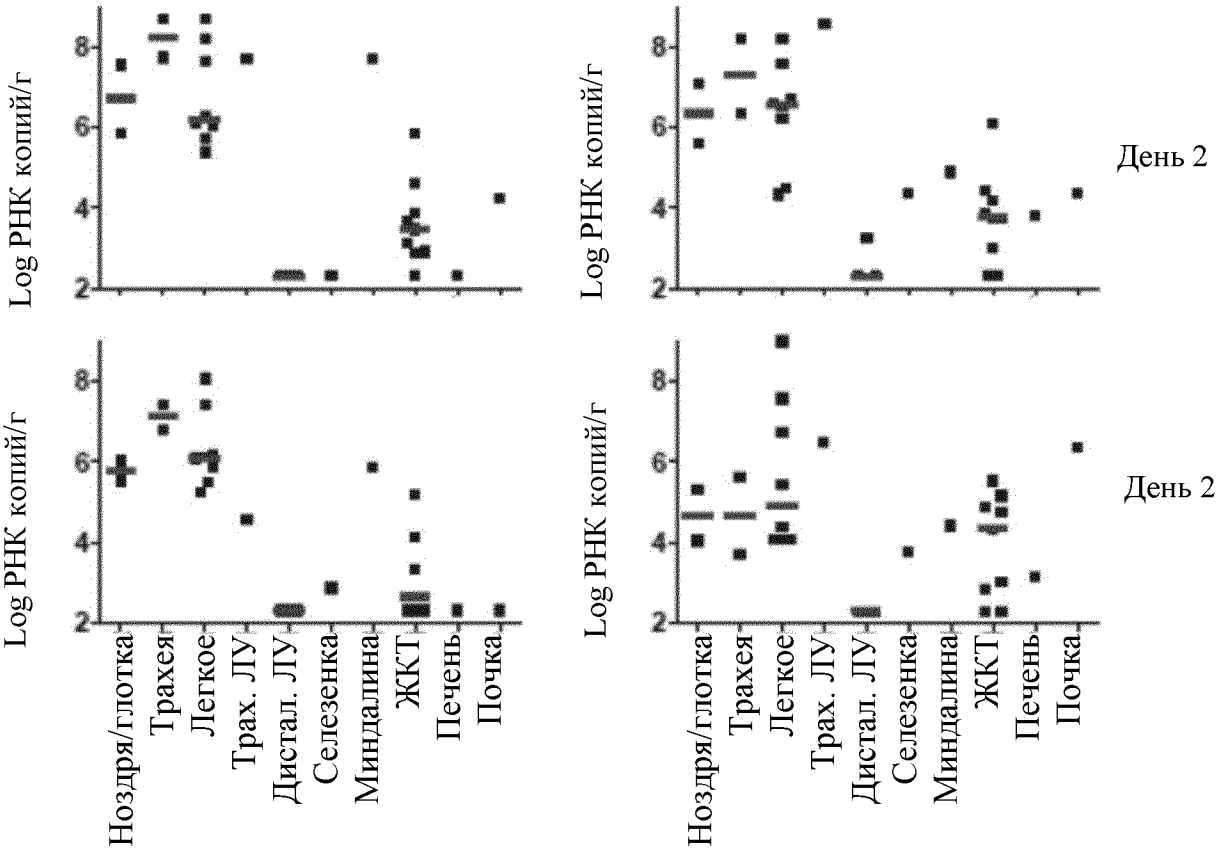
Фиг. 29


Группа 1
Группа 2
Группа 3
Клинические показатели
Клинические показатели
Клинические показатели
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14
Дни после заражения

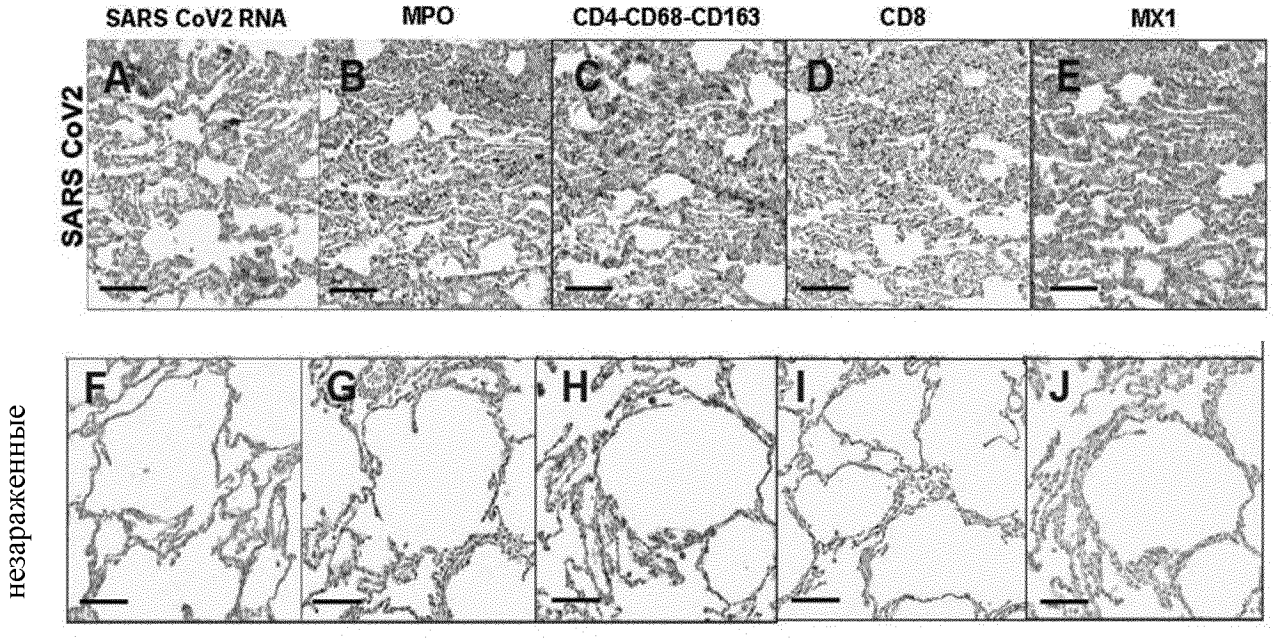
Фиг. 30


Группа 3
Группа 2
Группа 1
Нейтрофилы (К/мкл)
Лимфоциты (К/мкл)
Дни после заражения заражения

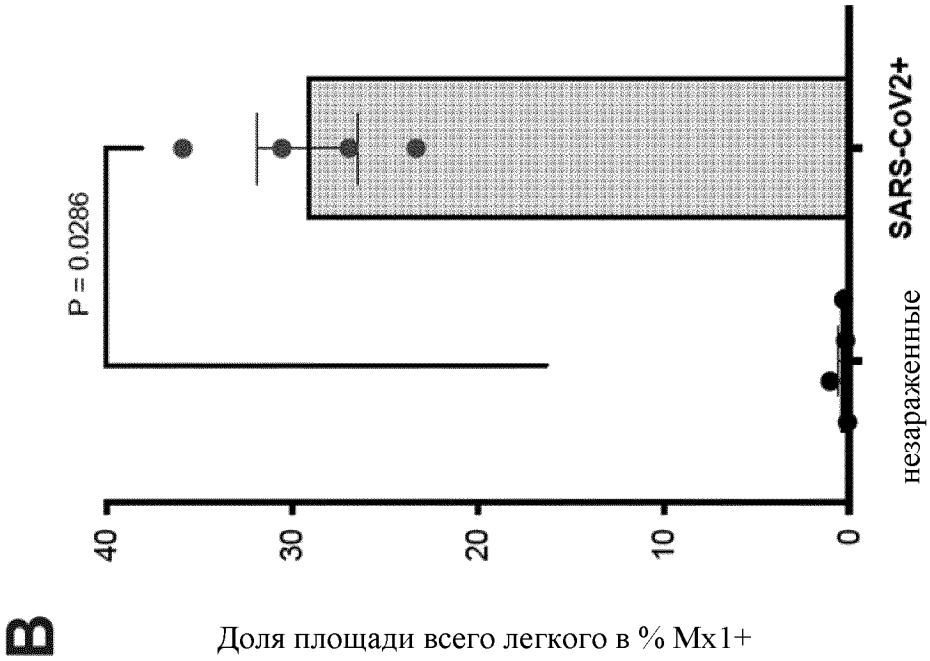
Фиг. 31

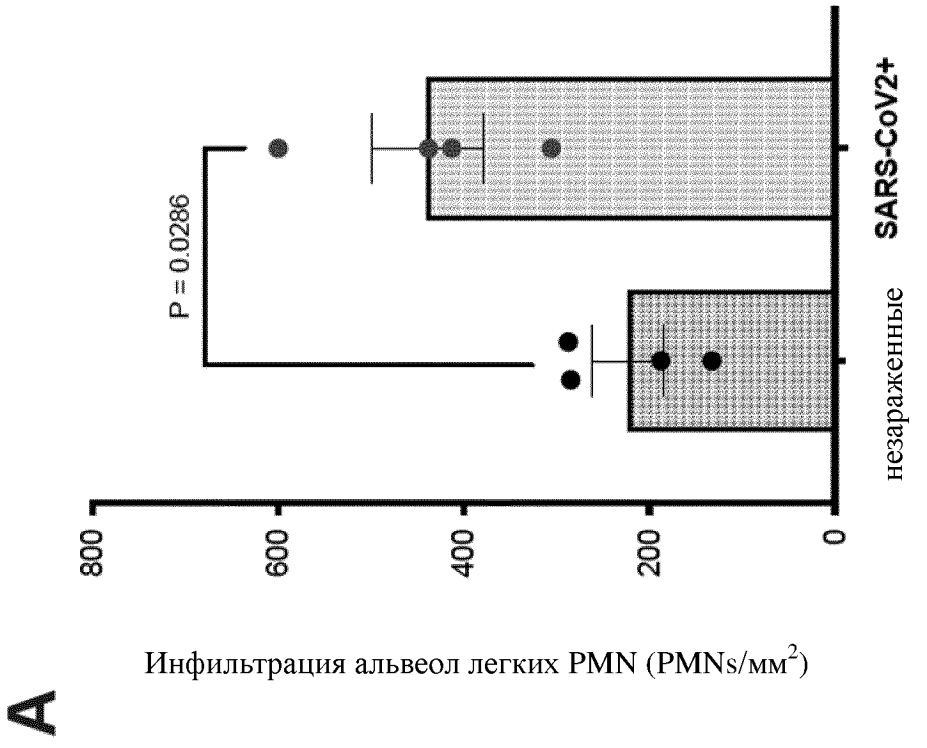


Фиг. 32

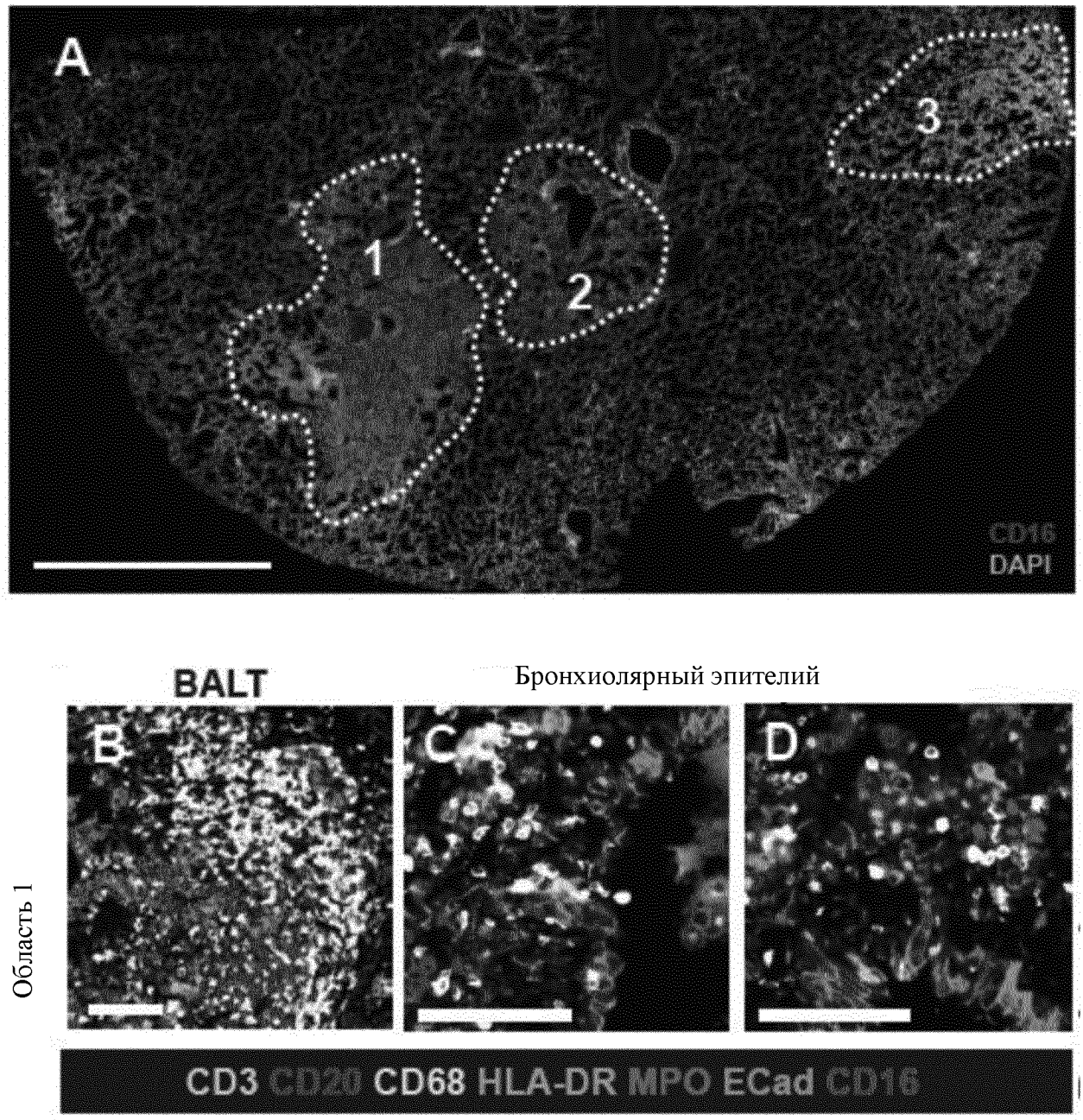


Фиг. 33A-33J

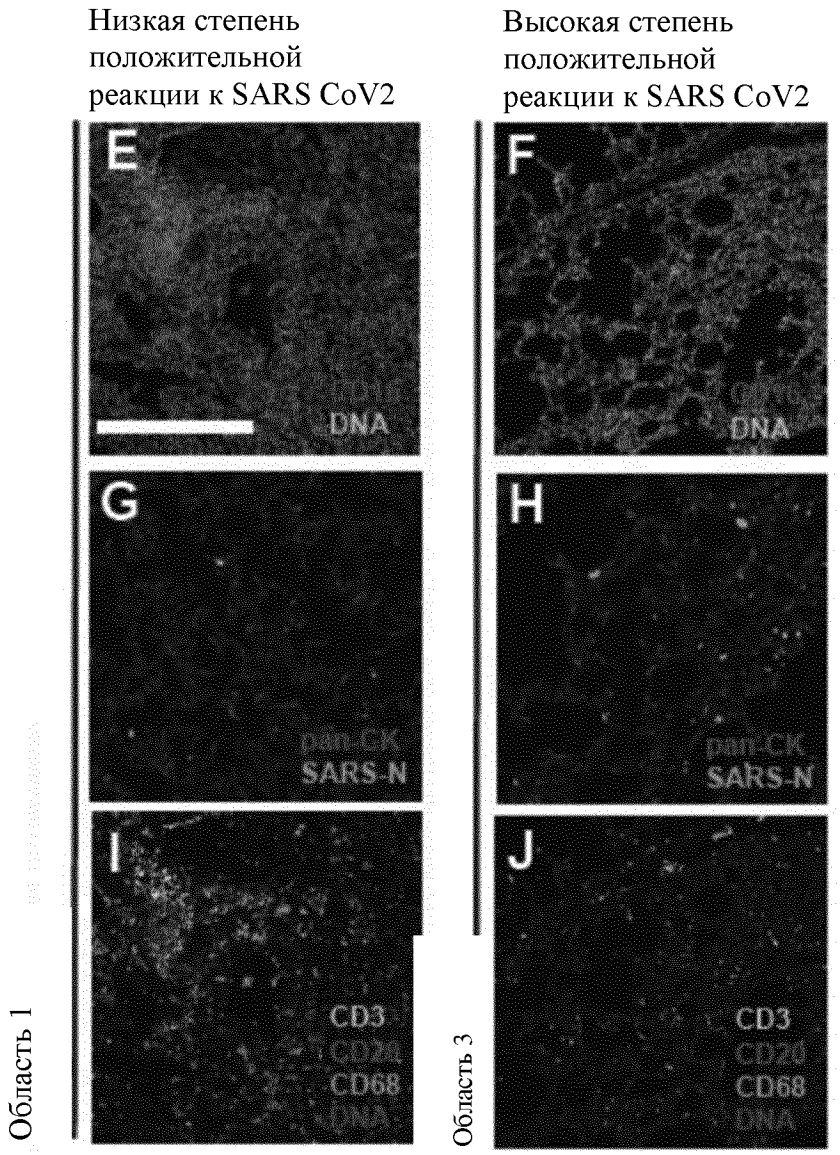

B
P = 0.0286
40
30
20
10
0
незараженные
SARS-CoV2+
Доля площади всего легкого в % Mx1+


A
P = 0.0286
800
600
400
200
0
незараженные
SARS-CoV2+
Инфильтрация альвеол легких PMN (PMNs/мм2)

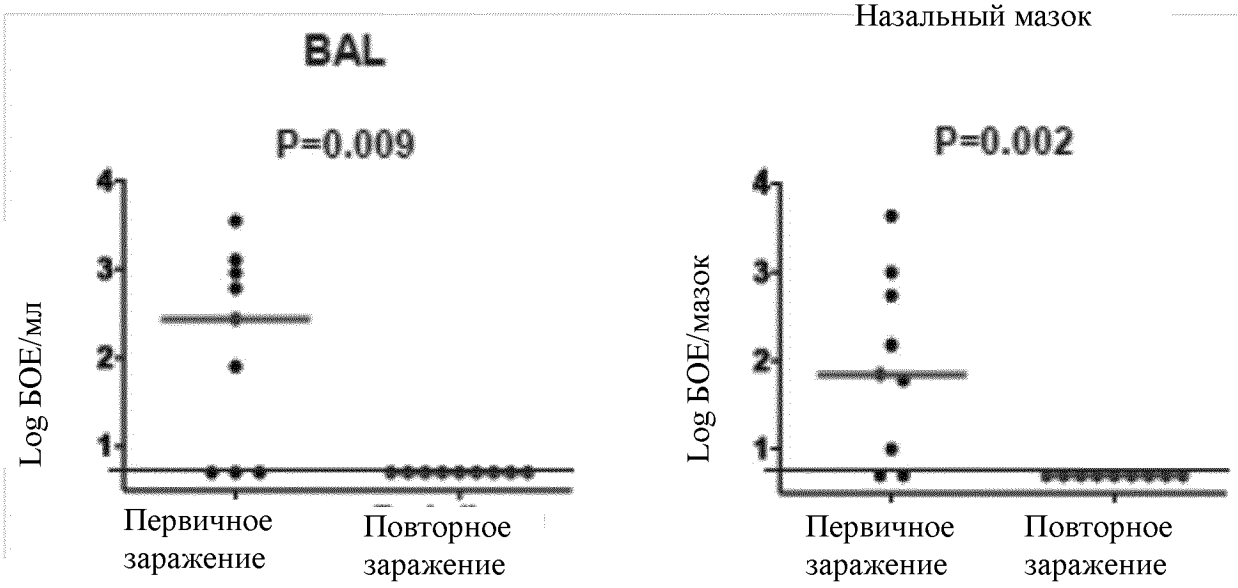
Фиг. 34A-34B


A
1
2
3
CD16
DAPI
BALT
Бронхиолярный эпителий
B
C
D
Область 1
CD3 CD20 CD68 HLA-DR MPO ECad CD16

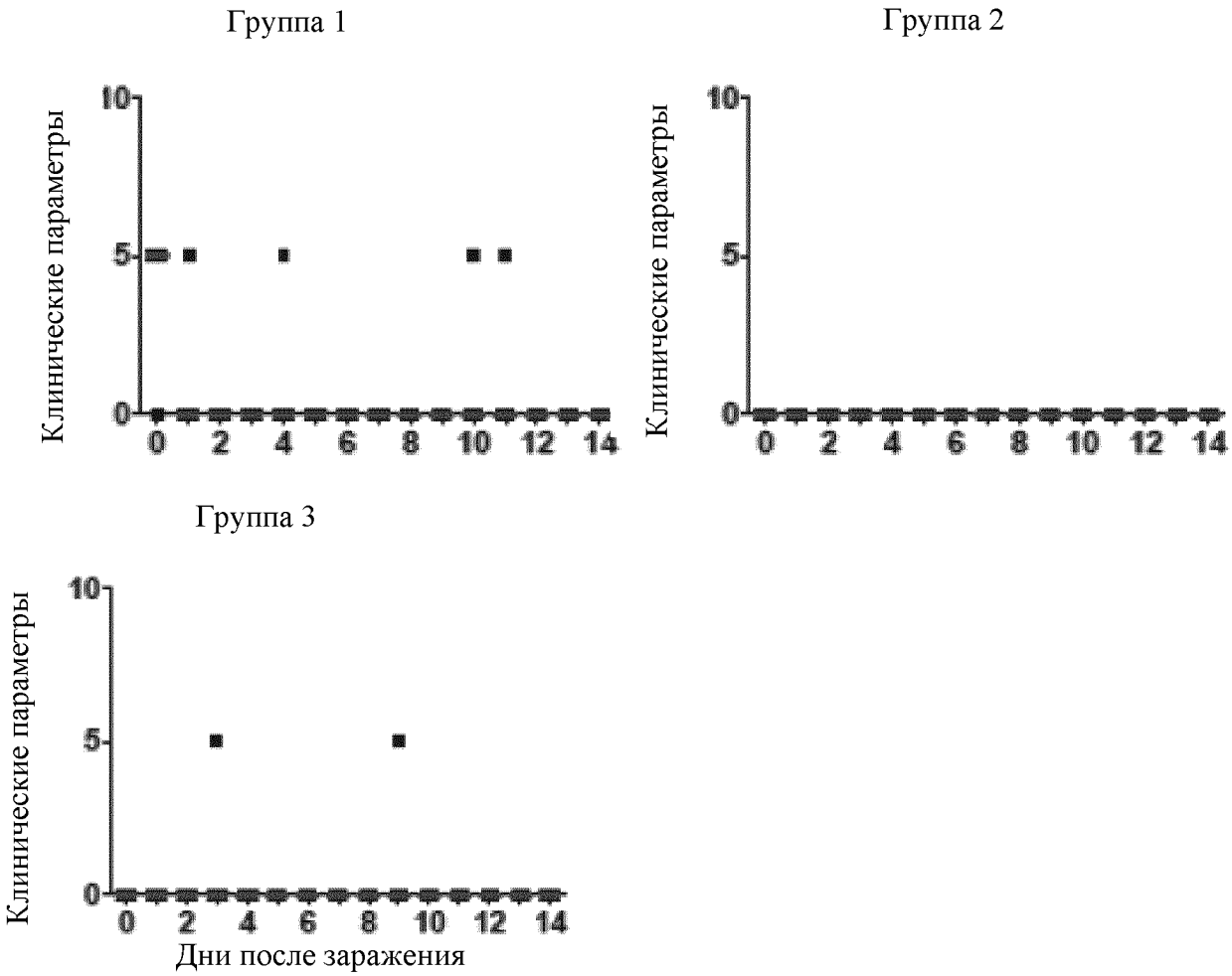
Фиг. 35A-35D



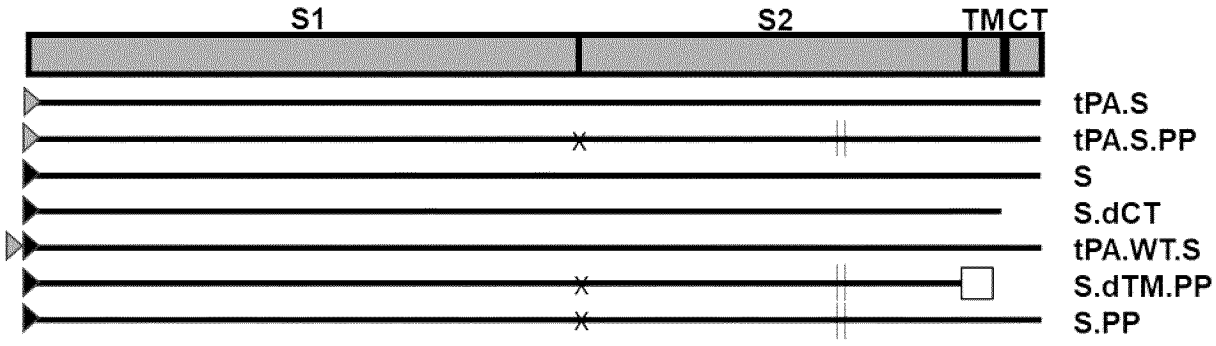
Фиг. 35E-35J



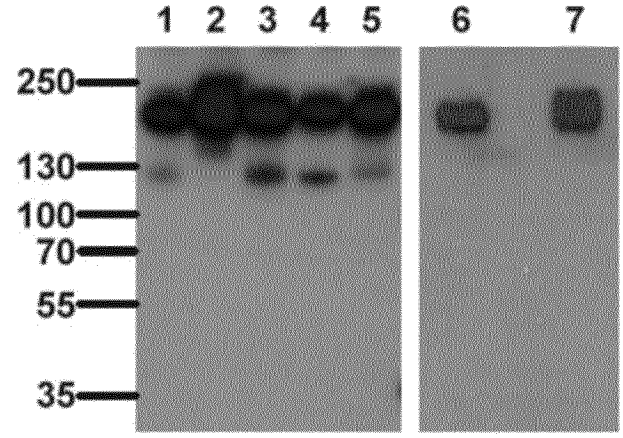
Фиг. 36



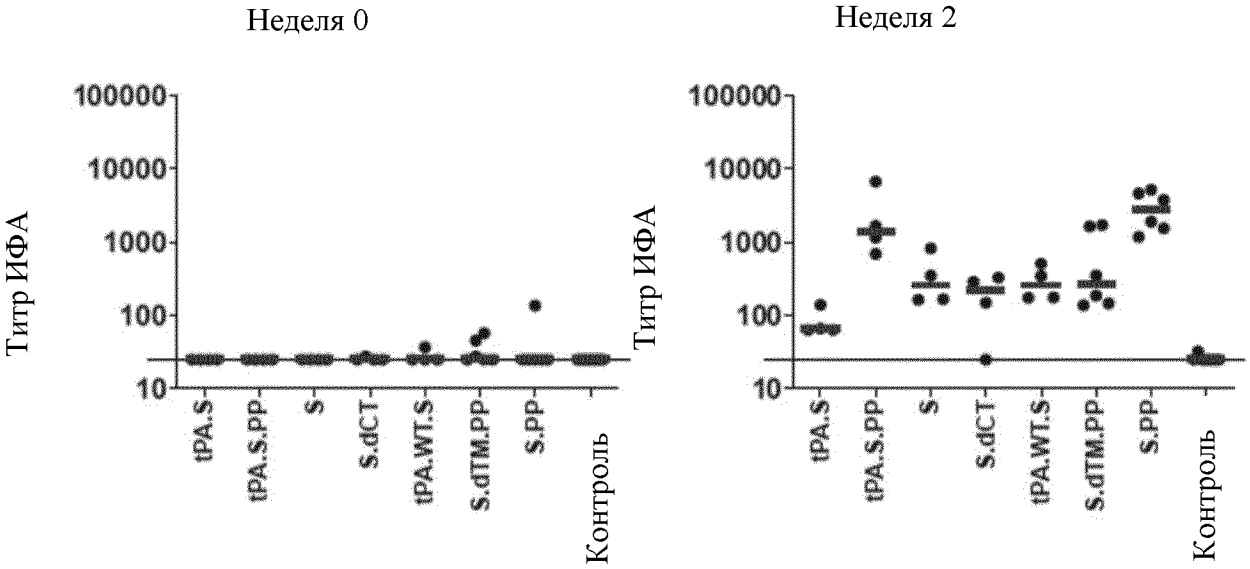
Фиг. 37

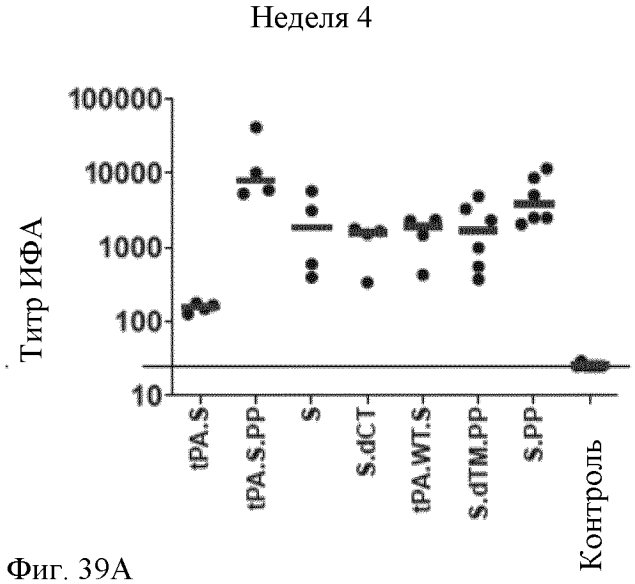


Фиг. 38A

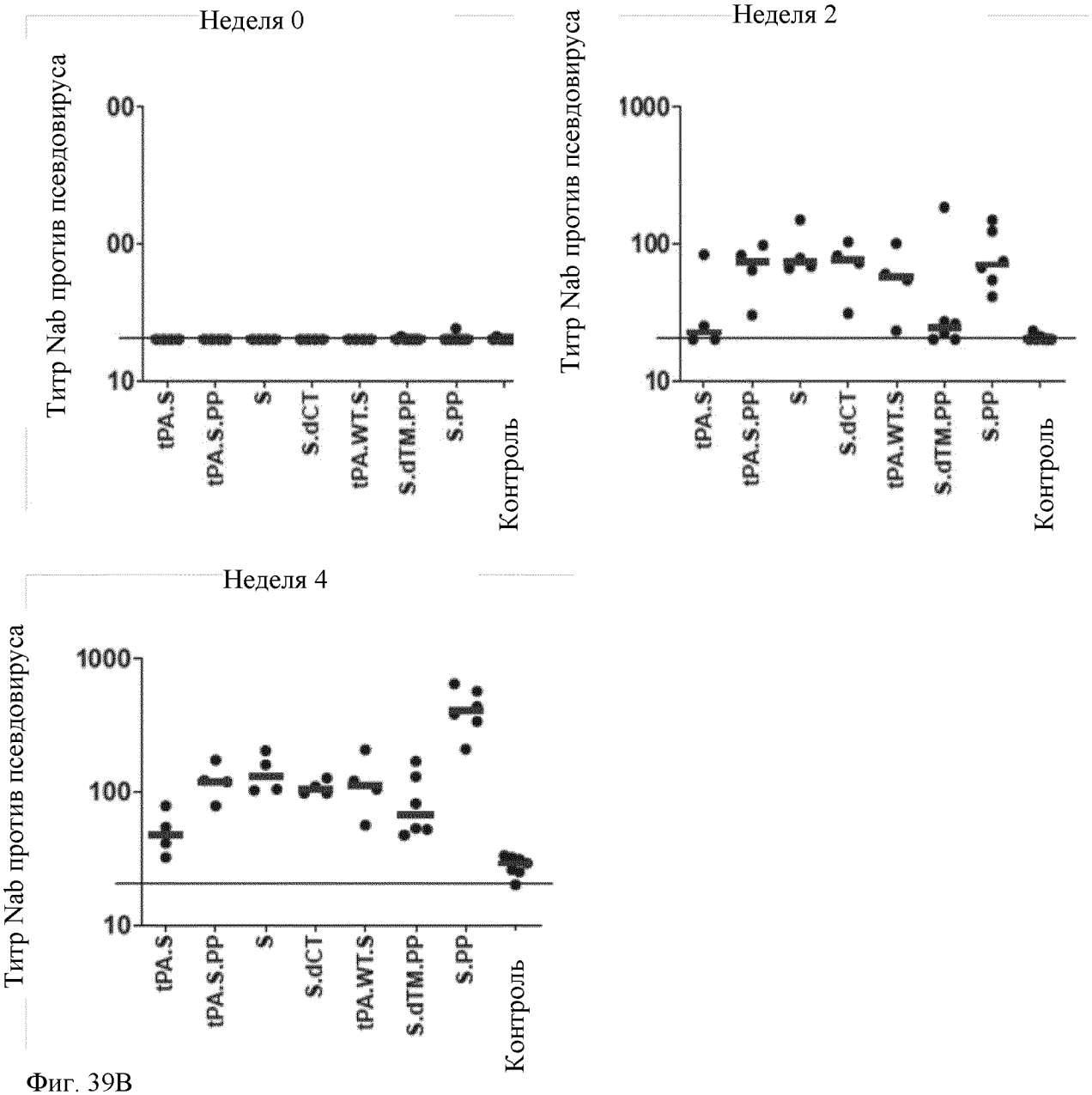


Фиг. 38B

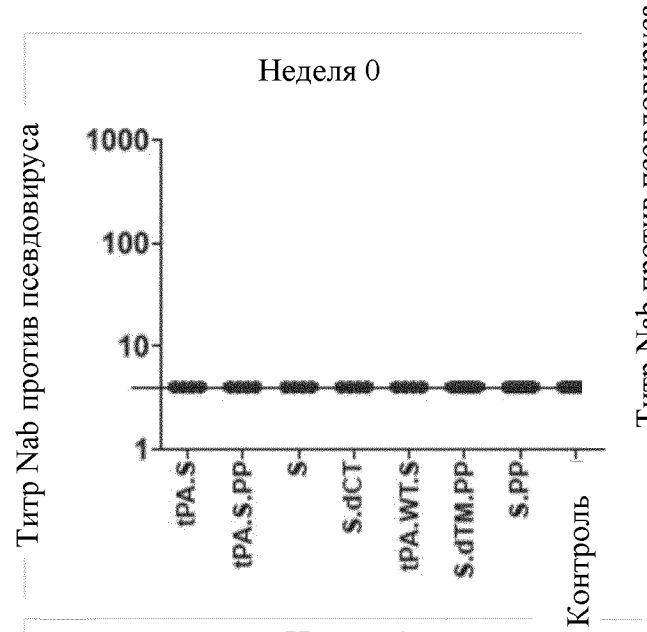


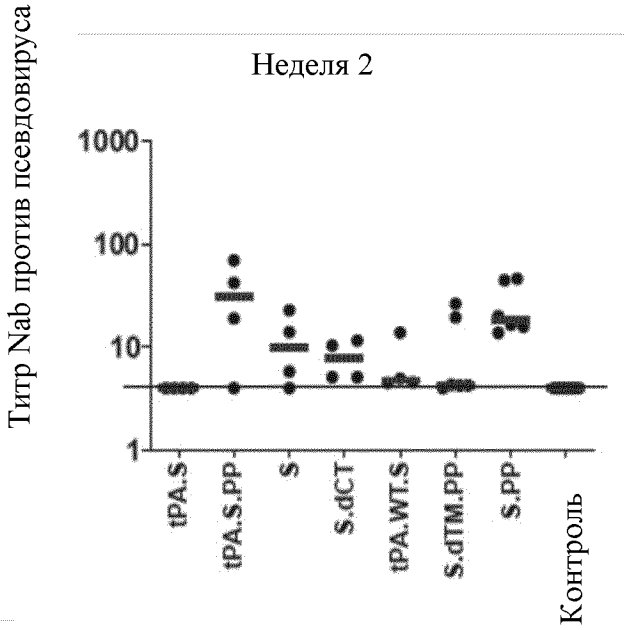


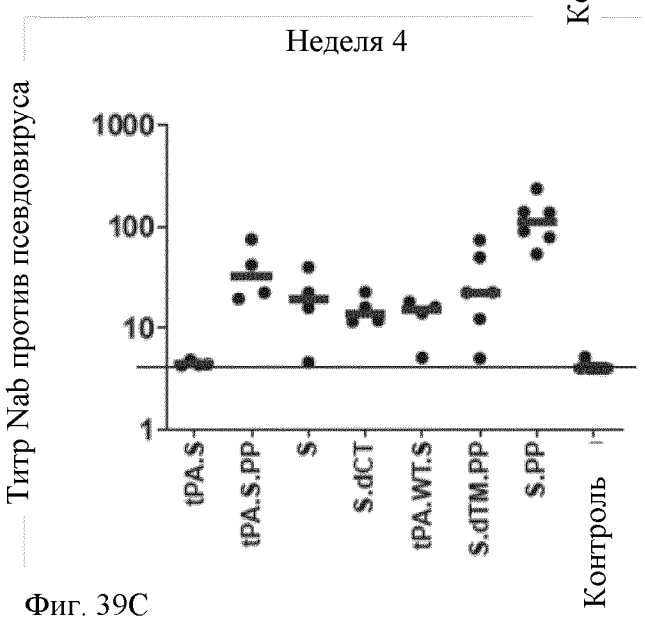
Фиг. 39A


Неделя 0
Титр Nab против псевдовируса
00
00
10
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль
Неделя 2
Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль
Неделя 4
Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль

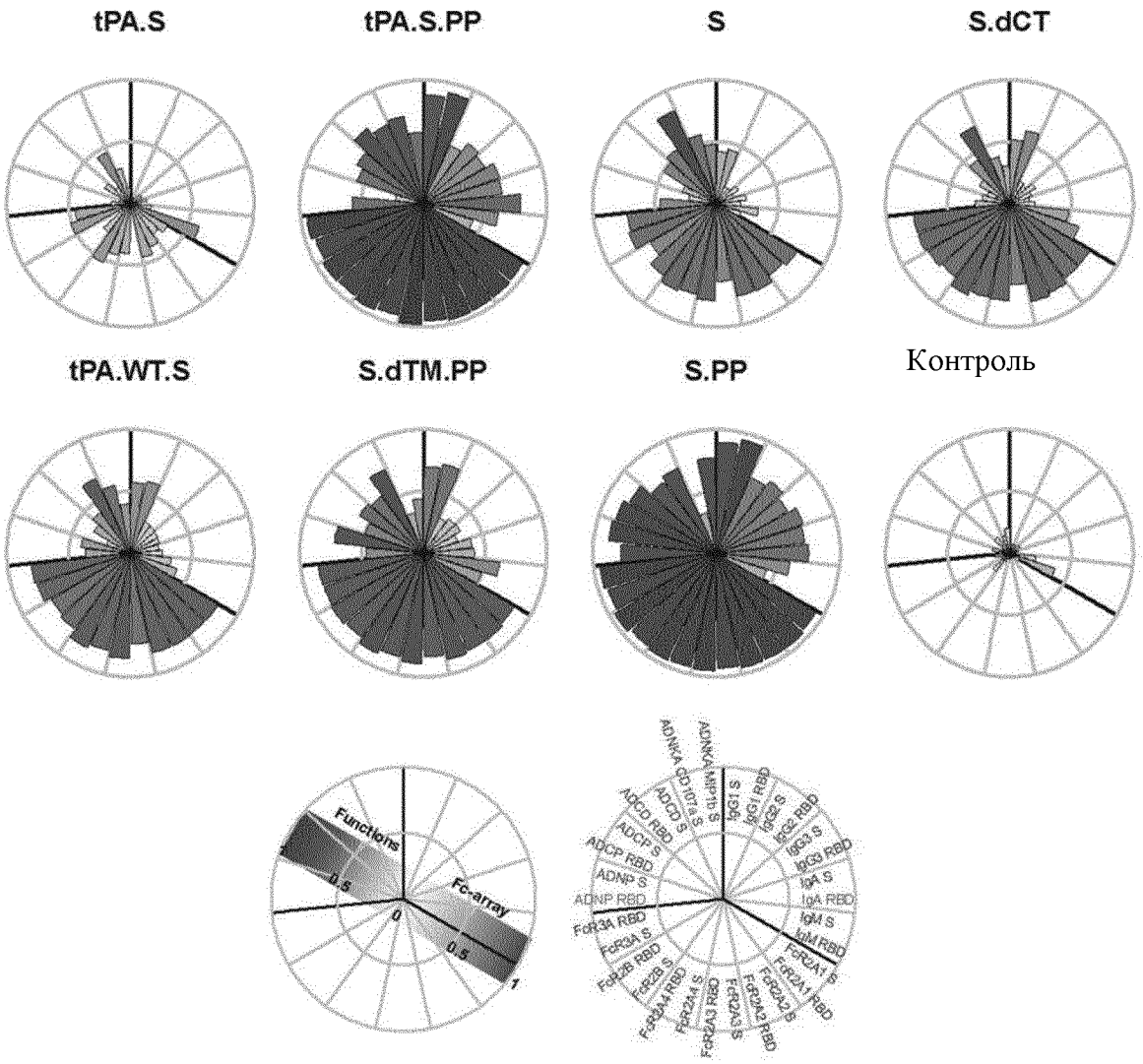
Фиг. 39B


Неделя 0
Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
1
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль

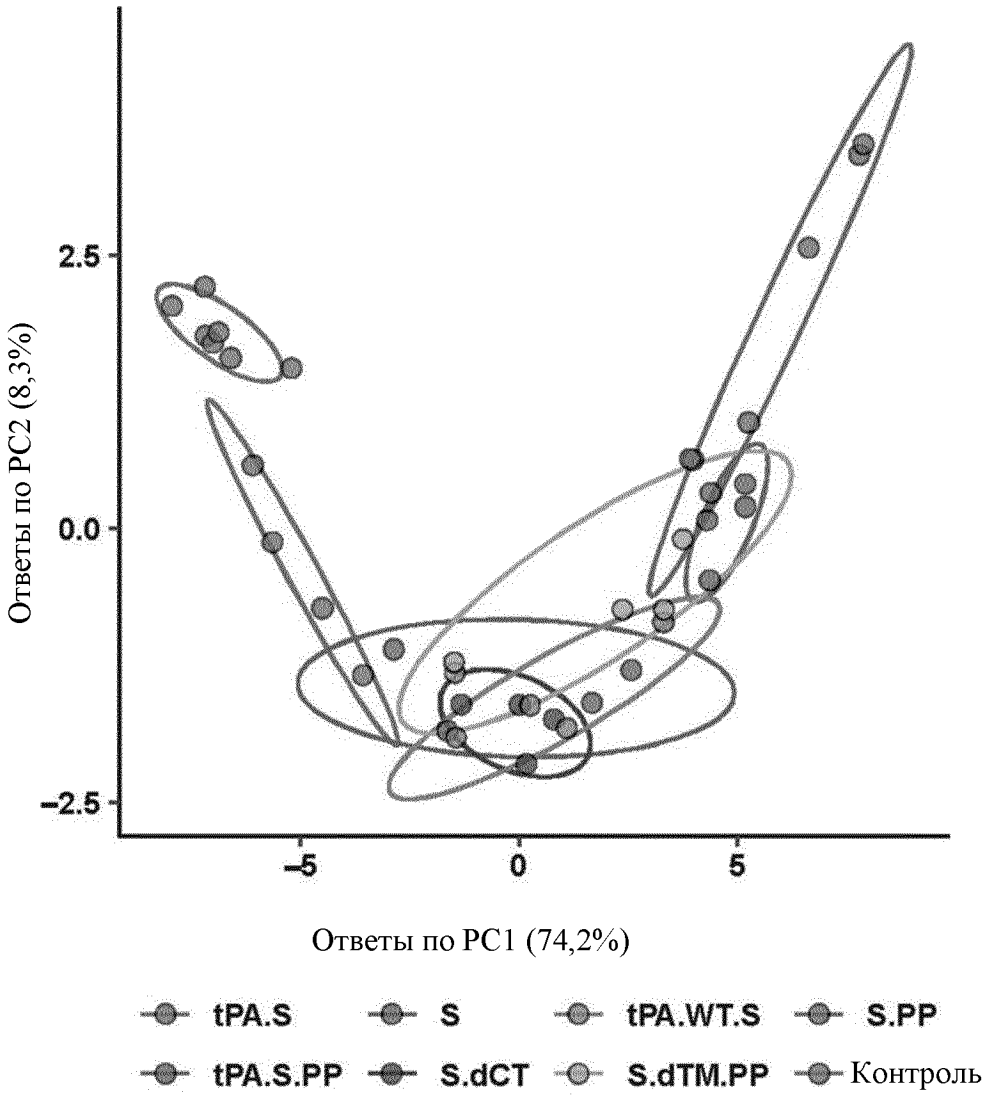

Неделя 2
Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
1
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль


Неделя 4
Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
1
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль

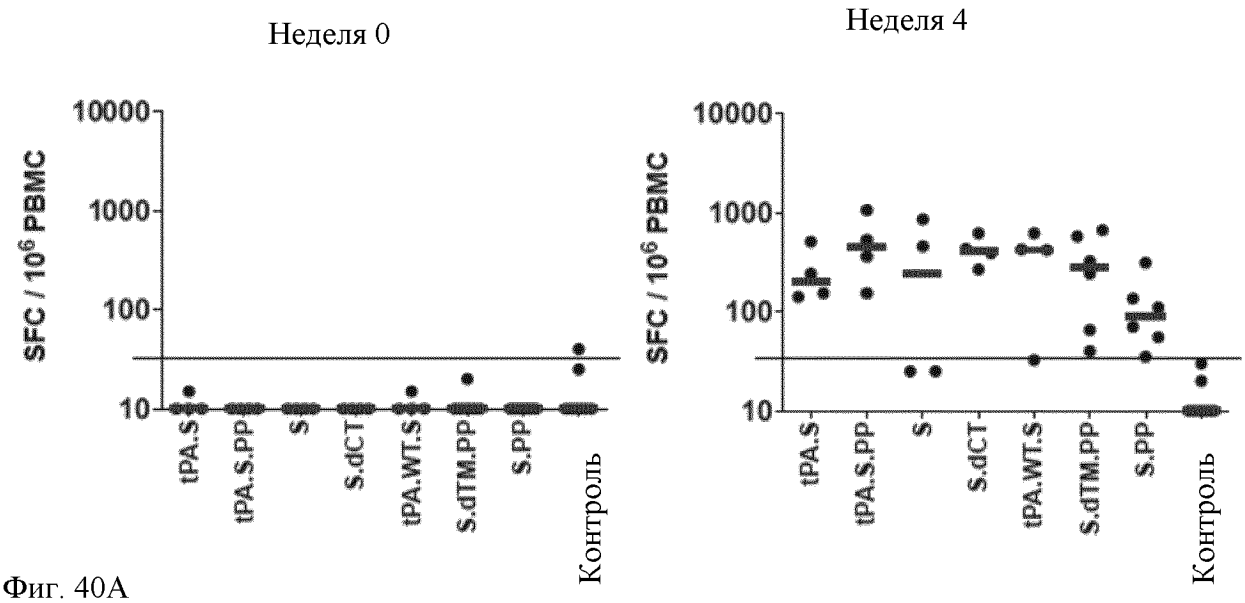
Фиг. 39C


tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль
Functions
Fc-array
0.5
0
0.5
1
ADNKA
ADNKA MIP1b S
S IgG1
IgG1 RBD
IgG2 S
IgG2 RBD
IgG3 S
IgG3 RBD
IgA S
IgA RBD
IgM S
IgM RBD
FcR2A1 S
FcR2A1 RBD
FcR2A2 S
FcR2A2 RBD
FcR2A3 S
FcR2A3 RBD
FcR2A4 S
FcR2A4 RBD
FcR2B S
FcR2B RBD
FcR3A S
FcR3A RBD
FcR3A RBD
ADNP S
ADNP RBD
ADCP S
ADCP RBD
ADCD S
ADCD RBD
ADNKA CD107a S

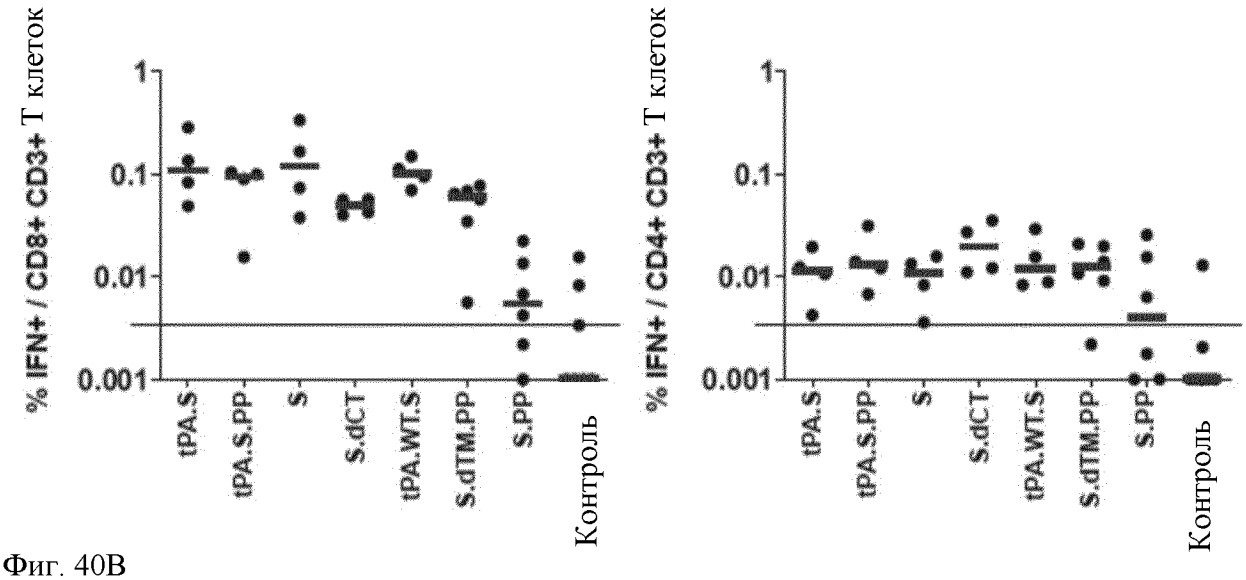
Фиг. 39D



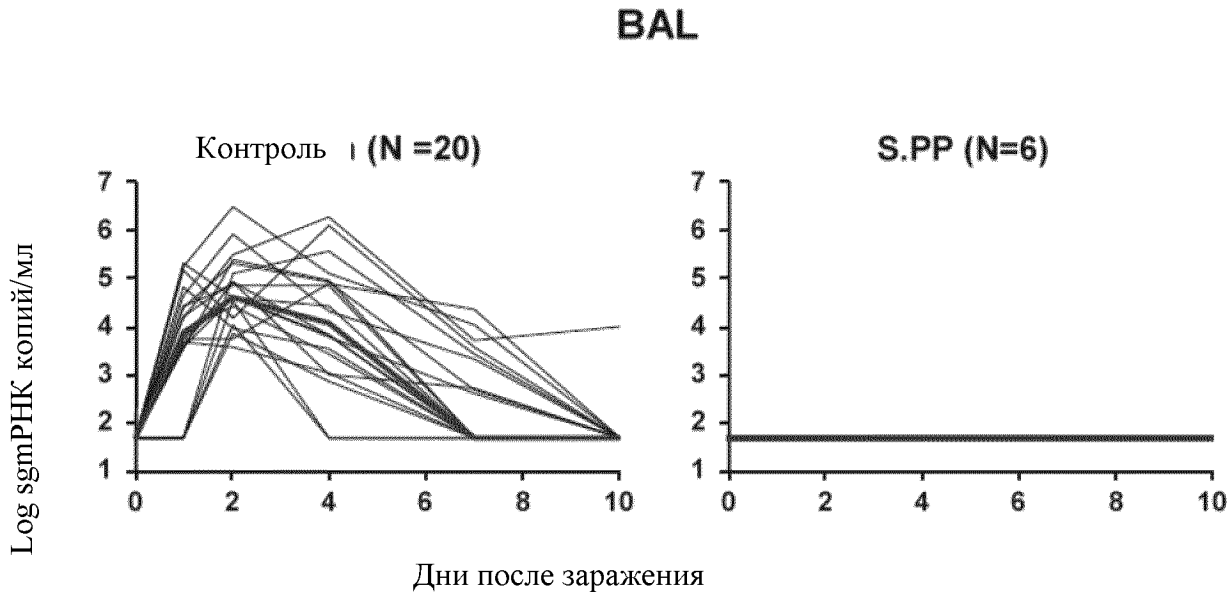
Фиг. 39D (продолжение)



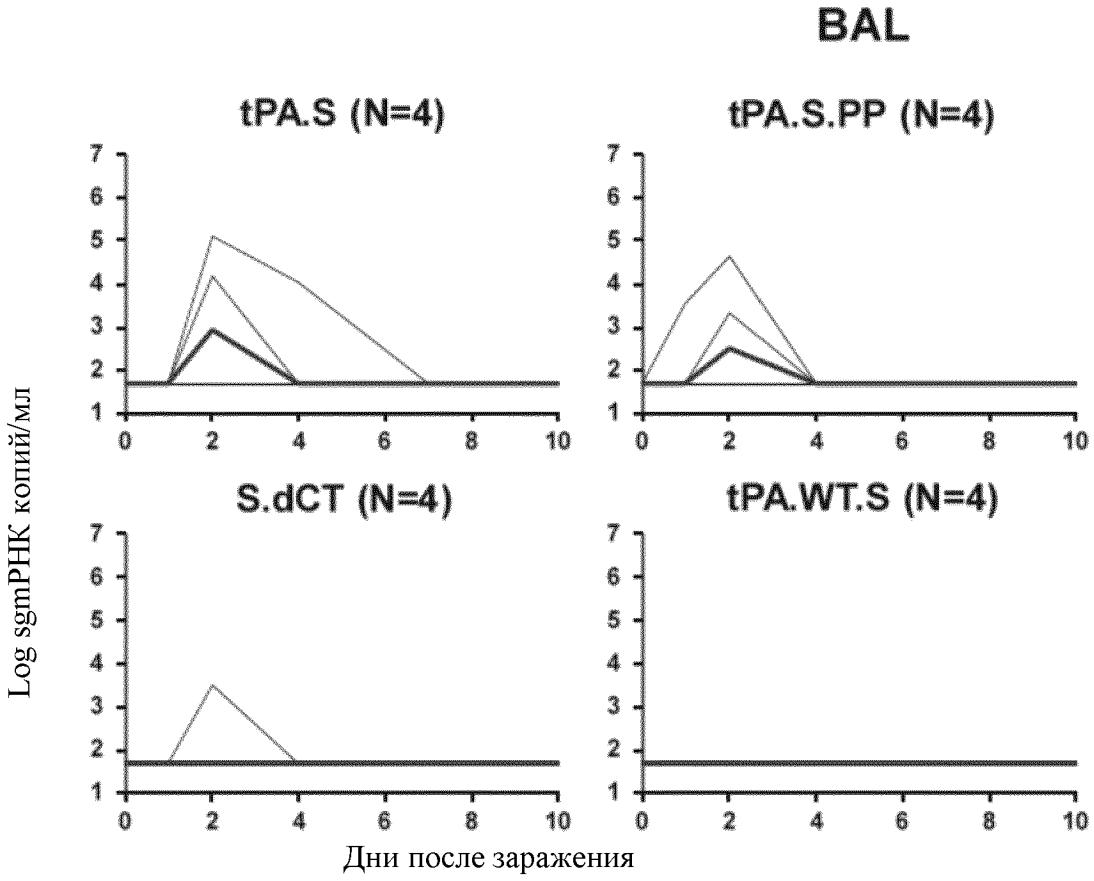
Фиг. 40A



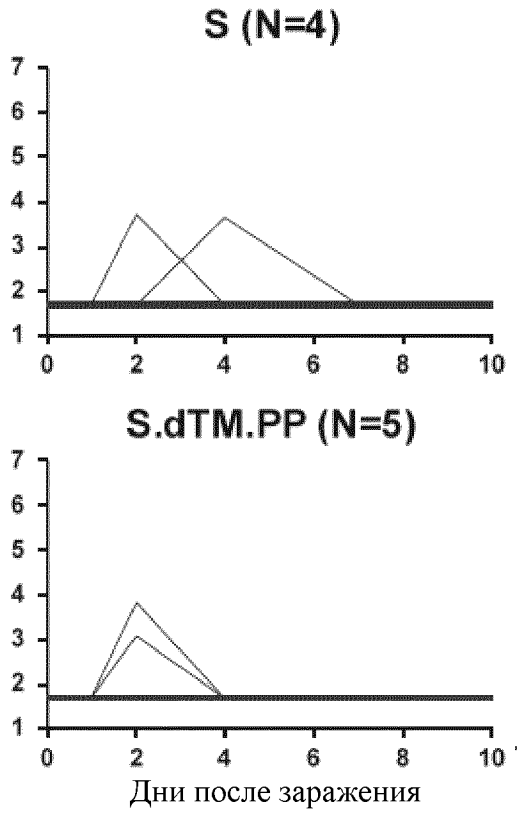
Фиг. 40B



Фиг. 41A

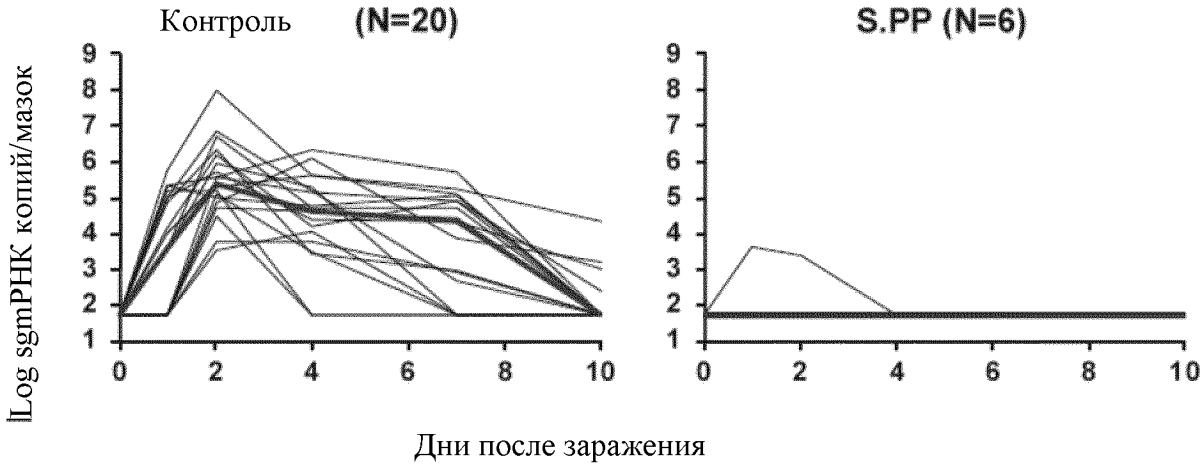


Фиг. 41B



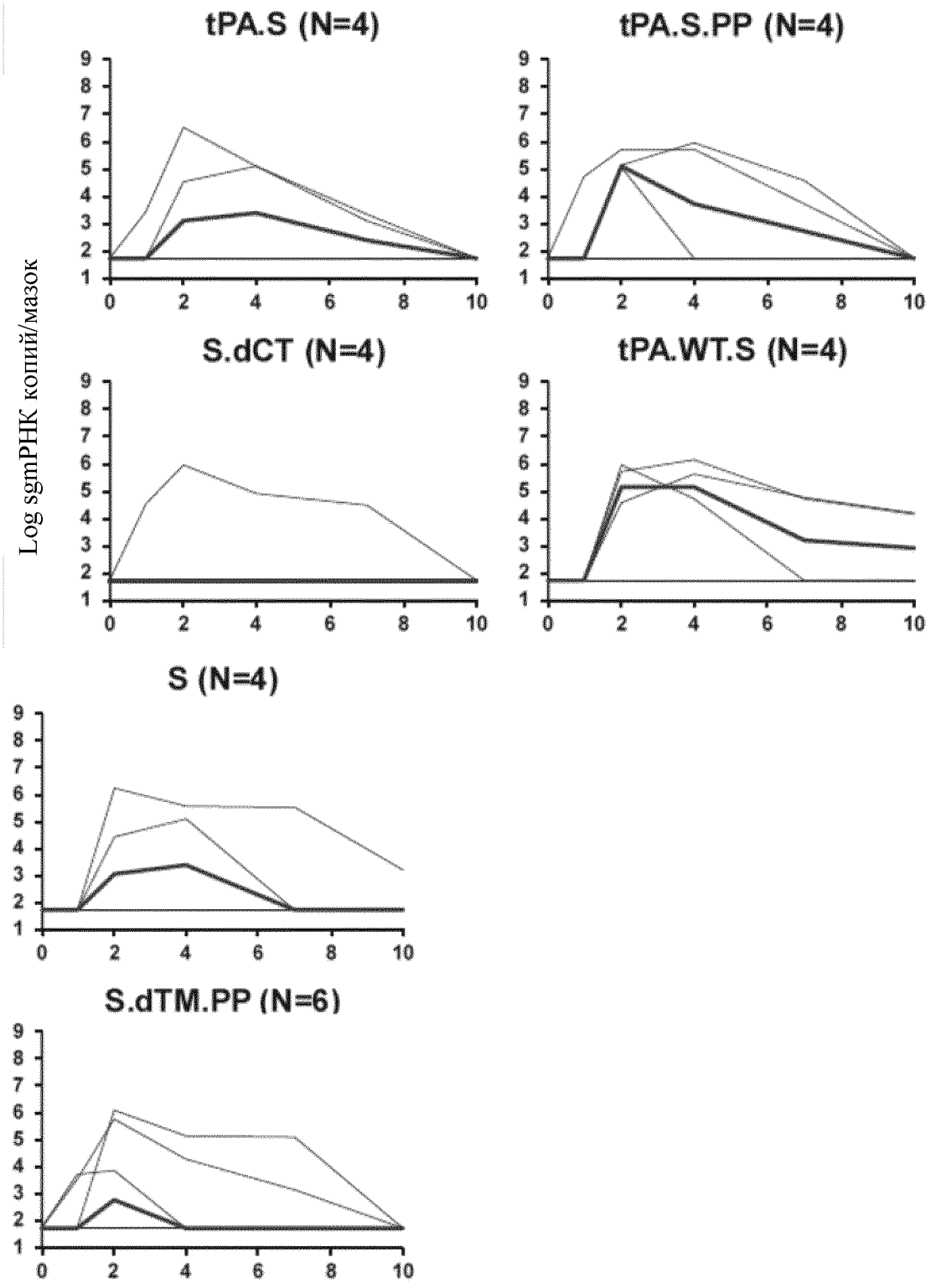
Фиг. 41B (продолжение)

Назальный мазок

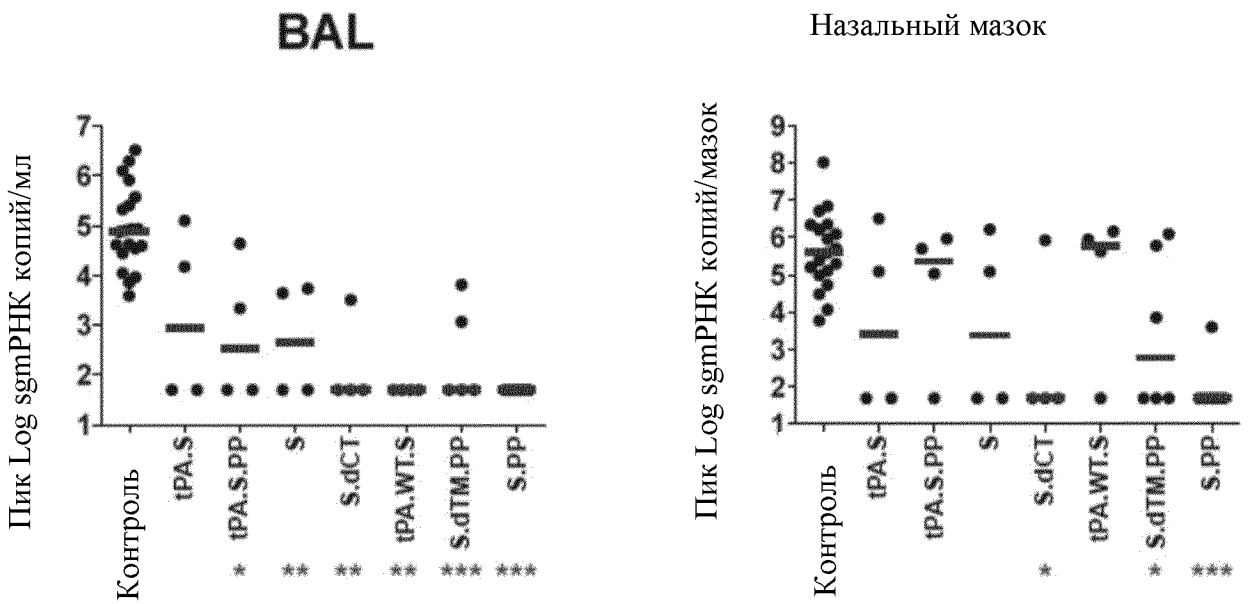


Фиг. 41C

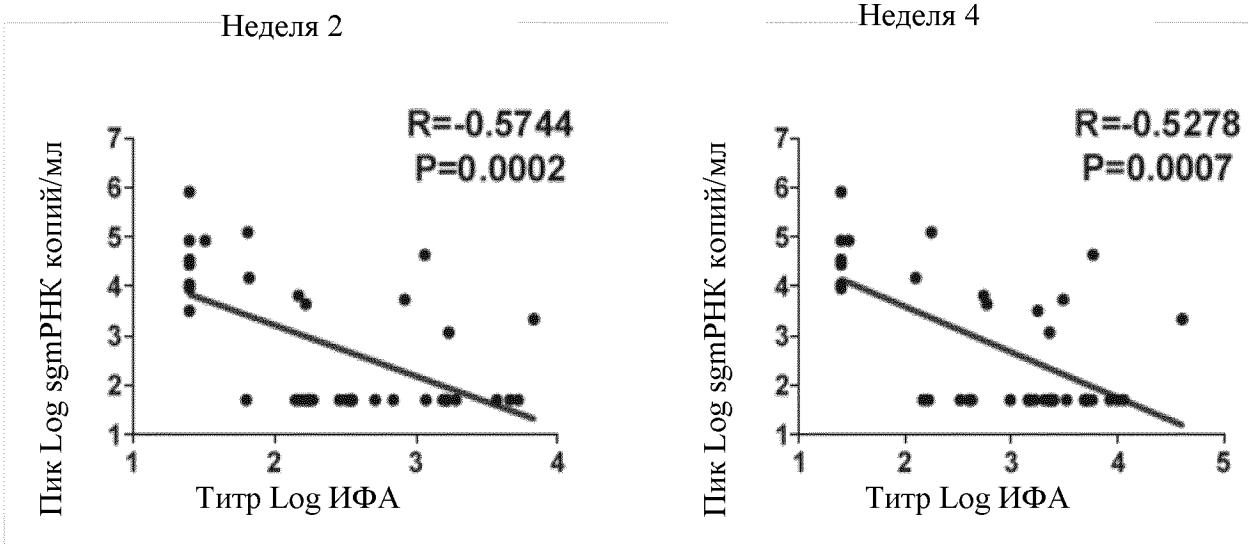
Назальный мазок



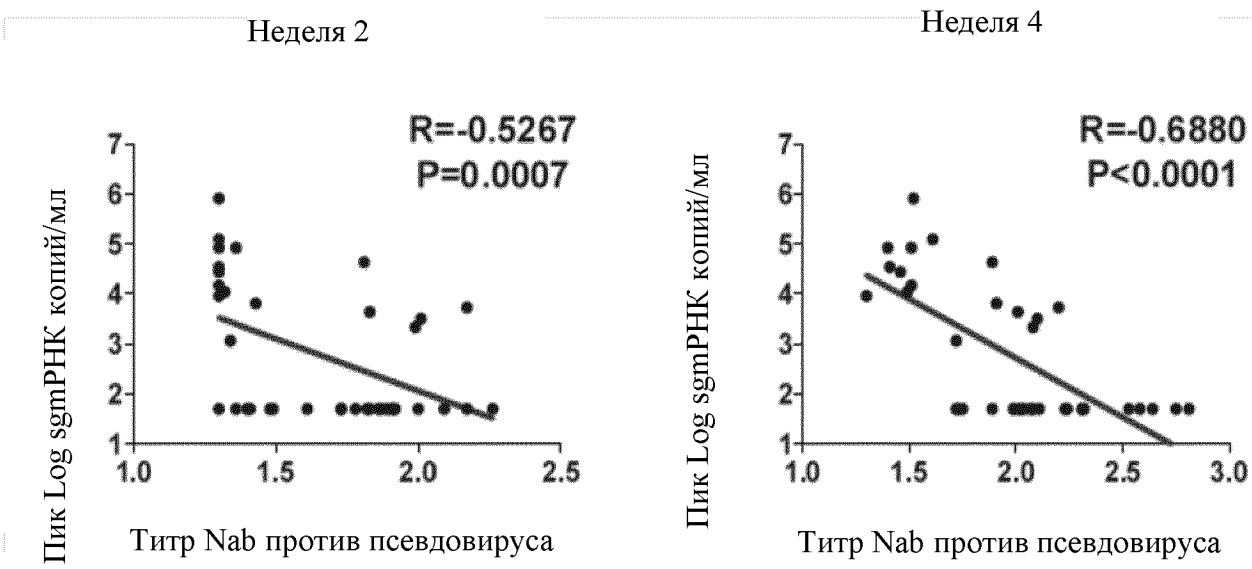
Фиг. 41D



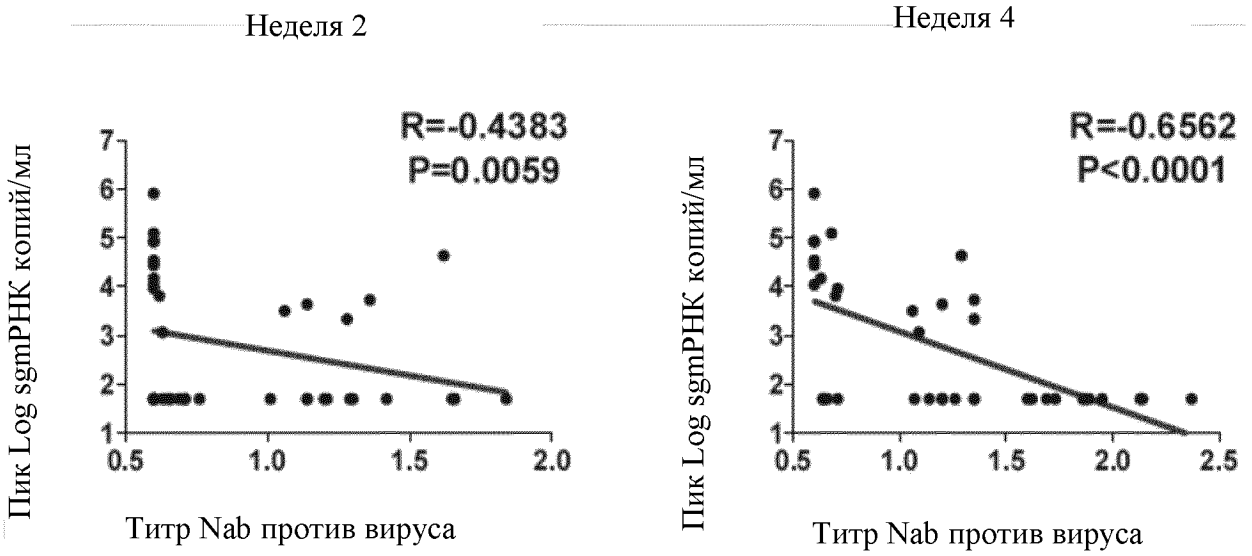
Фиг. 42



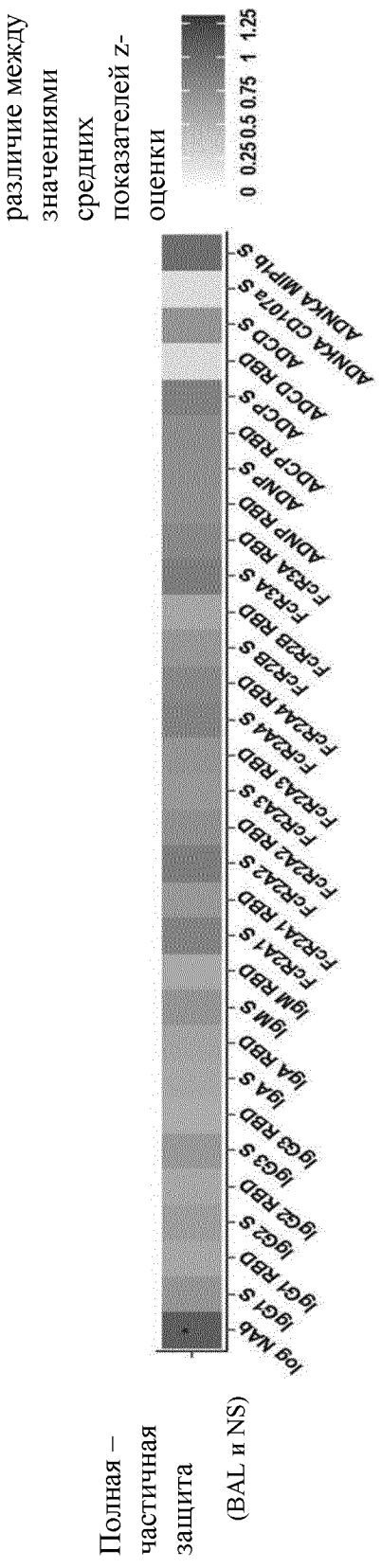
Фиг. 43A



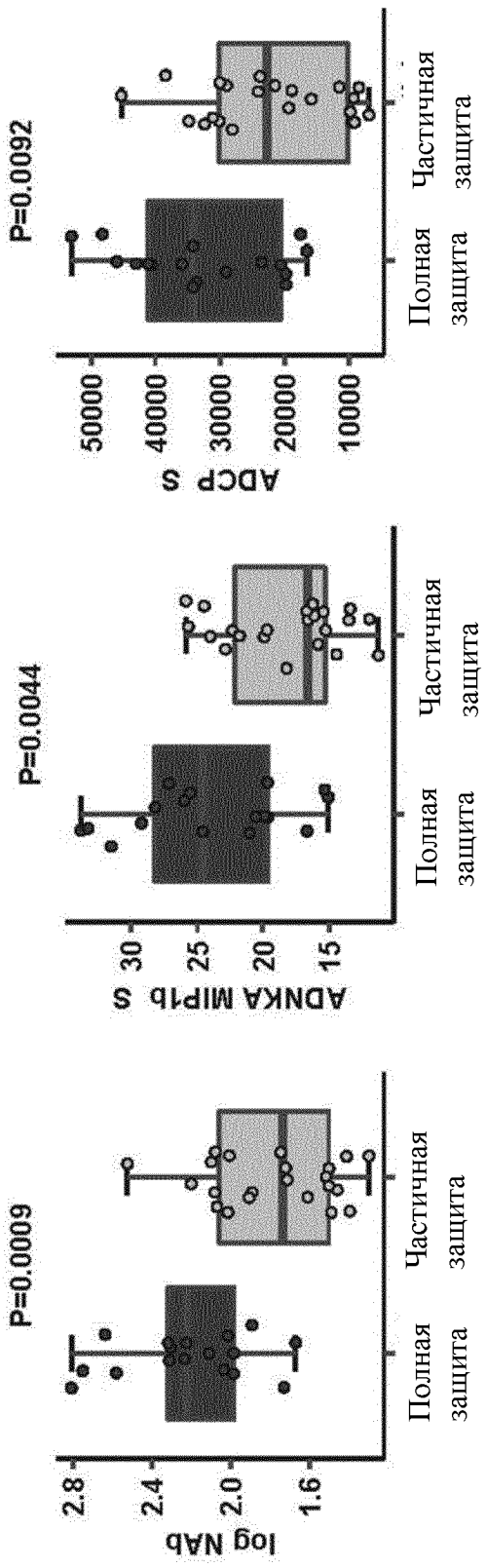
Фиг. 43B



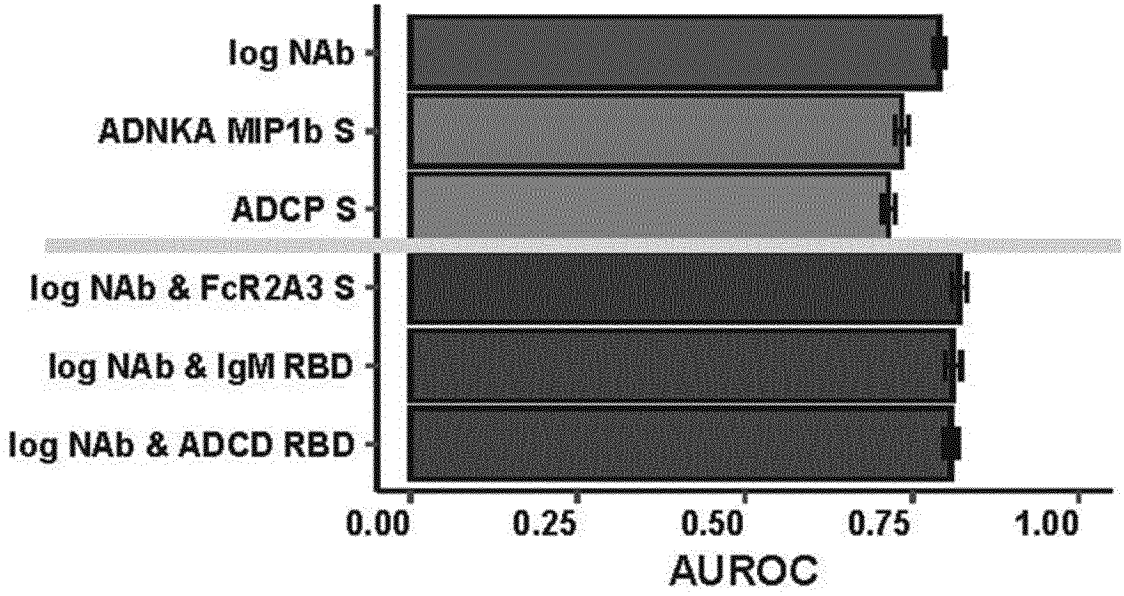
Фиг. 43C


различие между значениями средних показателей z-оценки
0 0.25 0.5 0.75 1 1.25
Полная – частичная защита
(BAL и NS)
log NAb
IgG1 S
IgG1 RBD
IgG2 S
IgG2 RBD
IgG3 S
IgG3 RBD
IgA S
IgA RBD
IgM S
IgM RBD
FcR2A1 S
FcR2A1 RBD
FcR2A2 S
FcR2A2 RBD
FcR2A3 S
FcR2A3 RBD
FcR2A4 S
FcR2A4 RBD
FcR2B S
FcR2B RBD
FcR3A S
FcR3A RBD
ADNP S
ADNP RBD
ADCP S
ADCP RBD
ADCD S
ADCD RBD
ADNKA CD-107a S
ADNKA MIP1b S

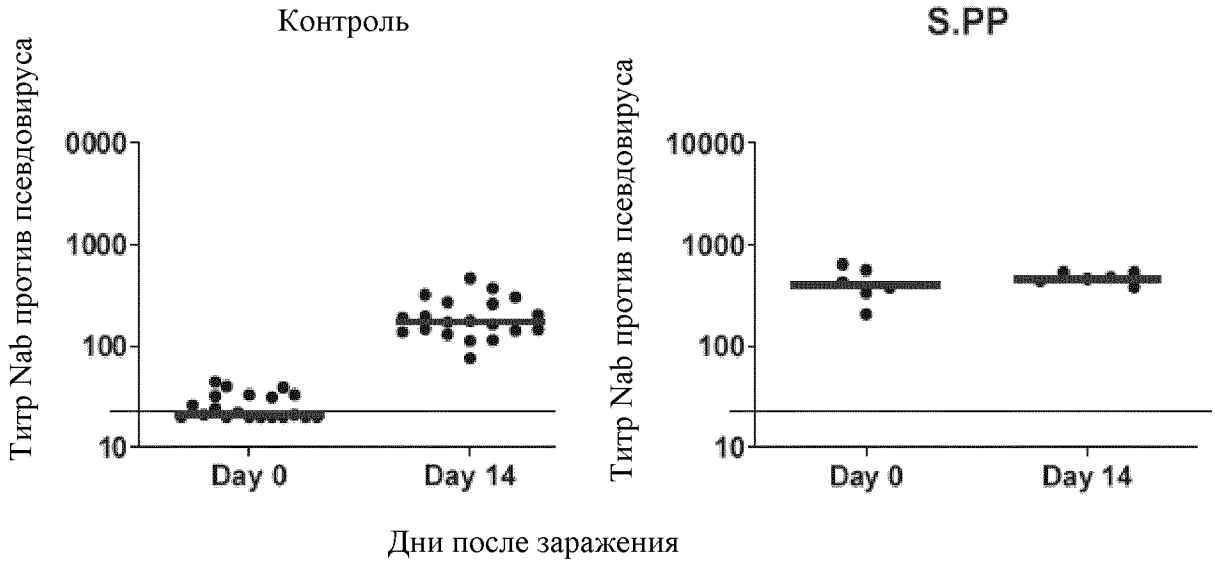
Фиг. 43D



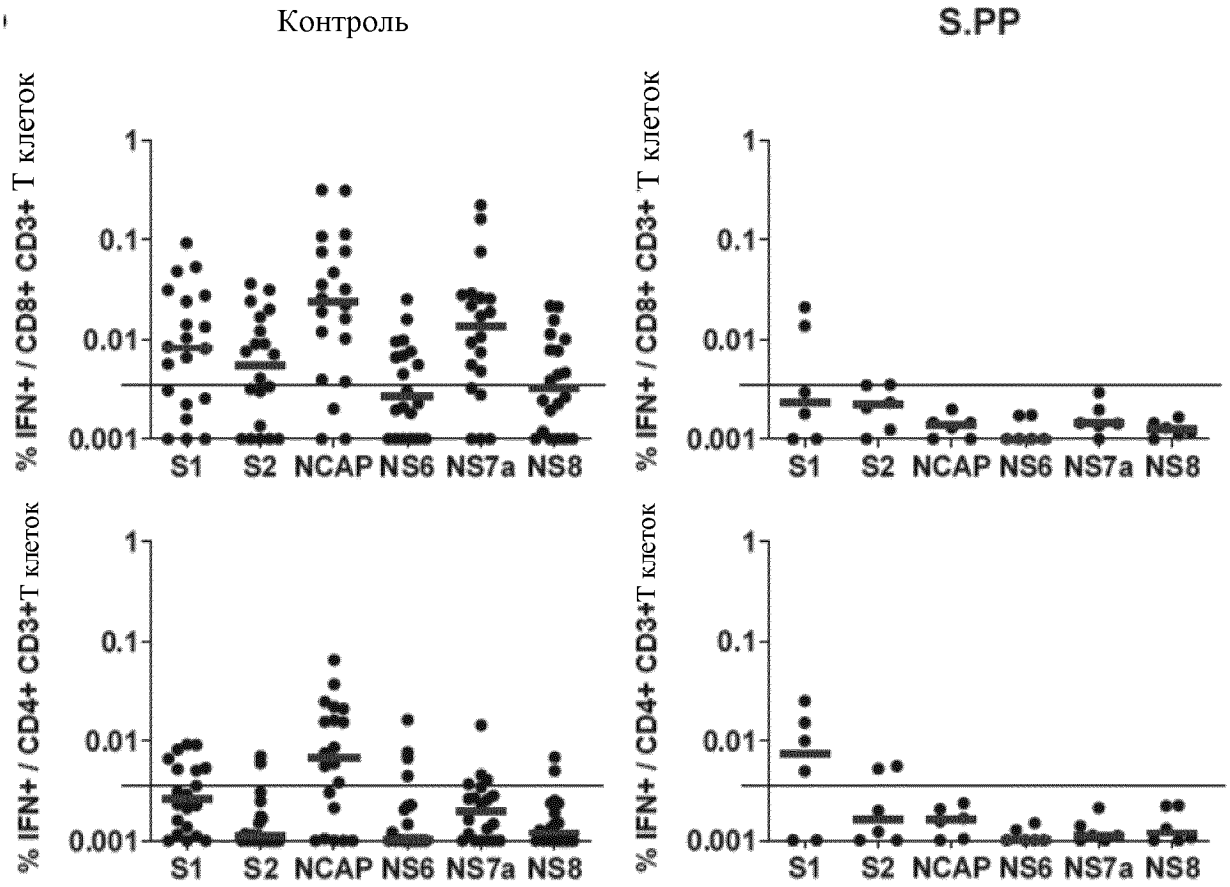
Фиг. 43D (продолжение)



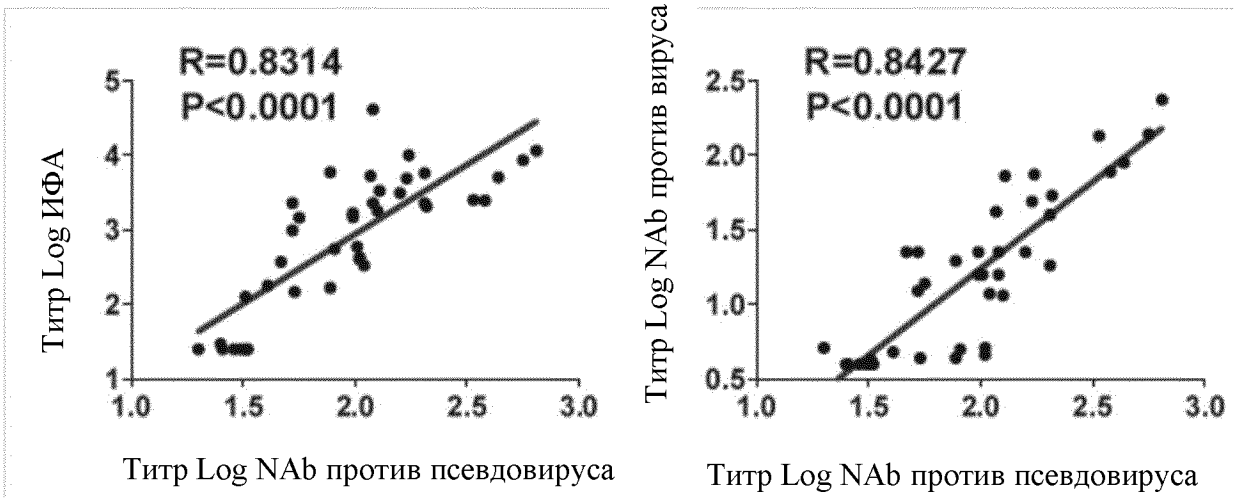
Фиг. 43D (продолжение)



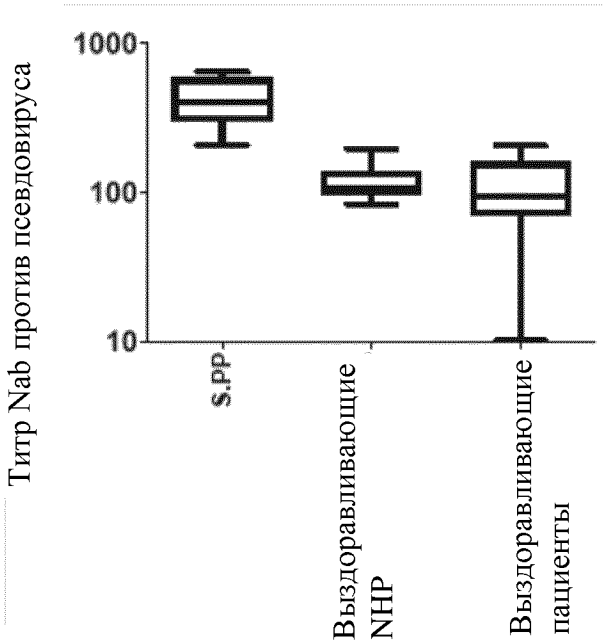
Фиг. 44A



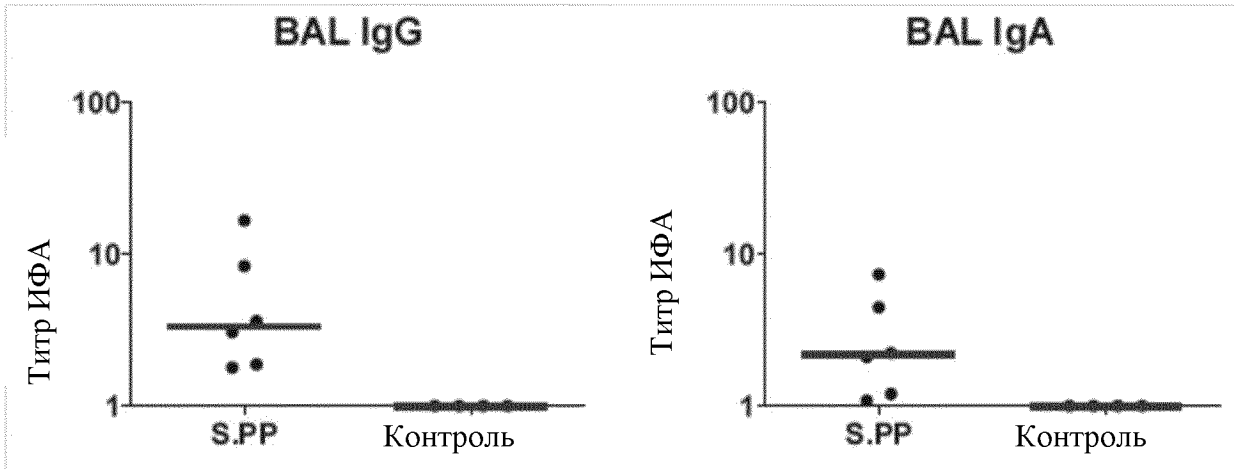
Фиг. 44B



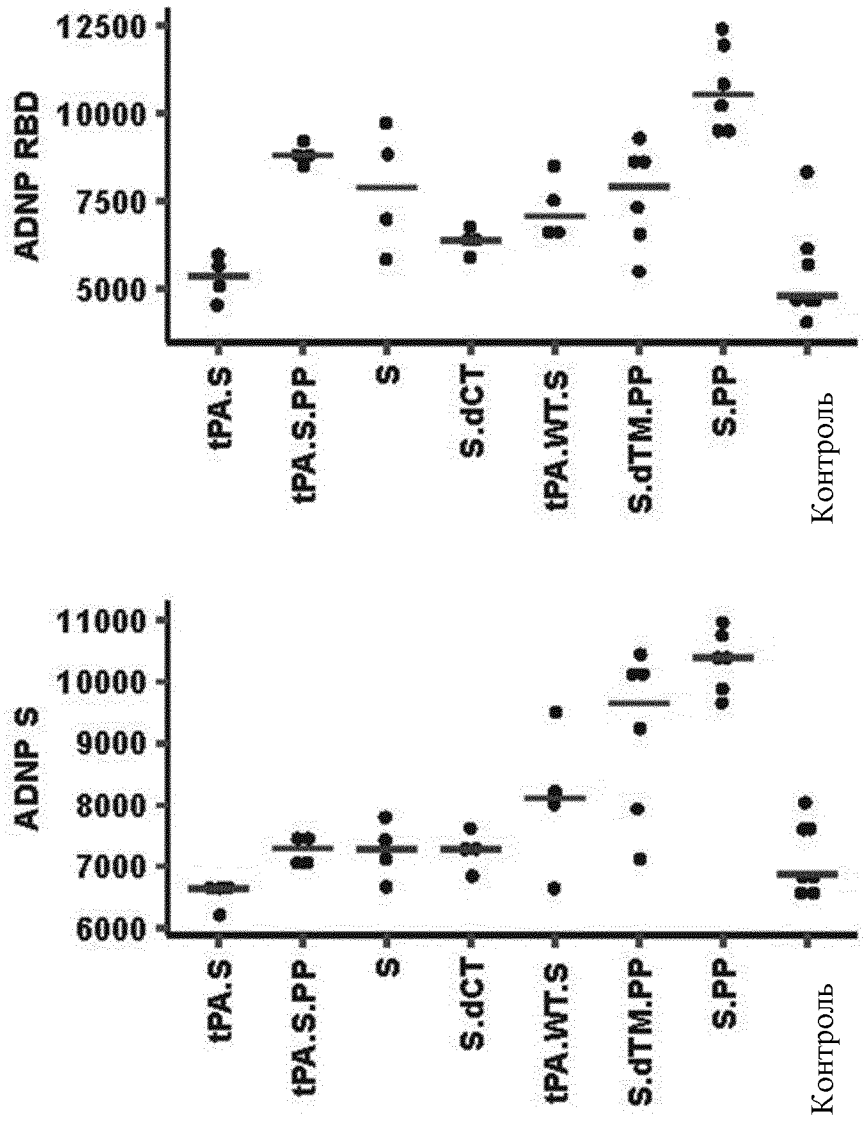
Фиг. 45


Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
S.PP
Выздоравливающие NHP
Выздоравливающие пациенты

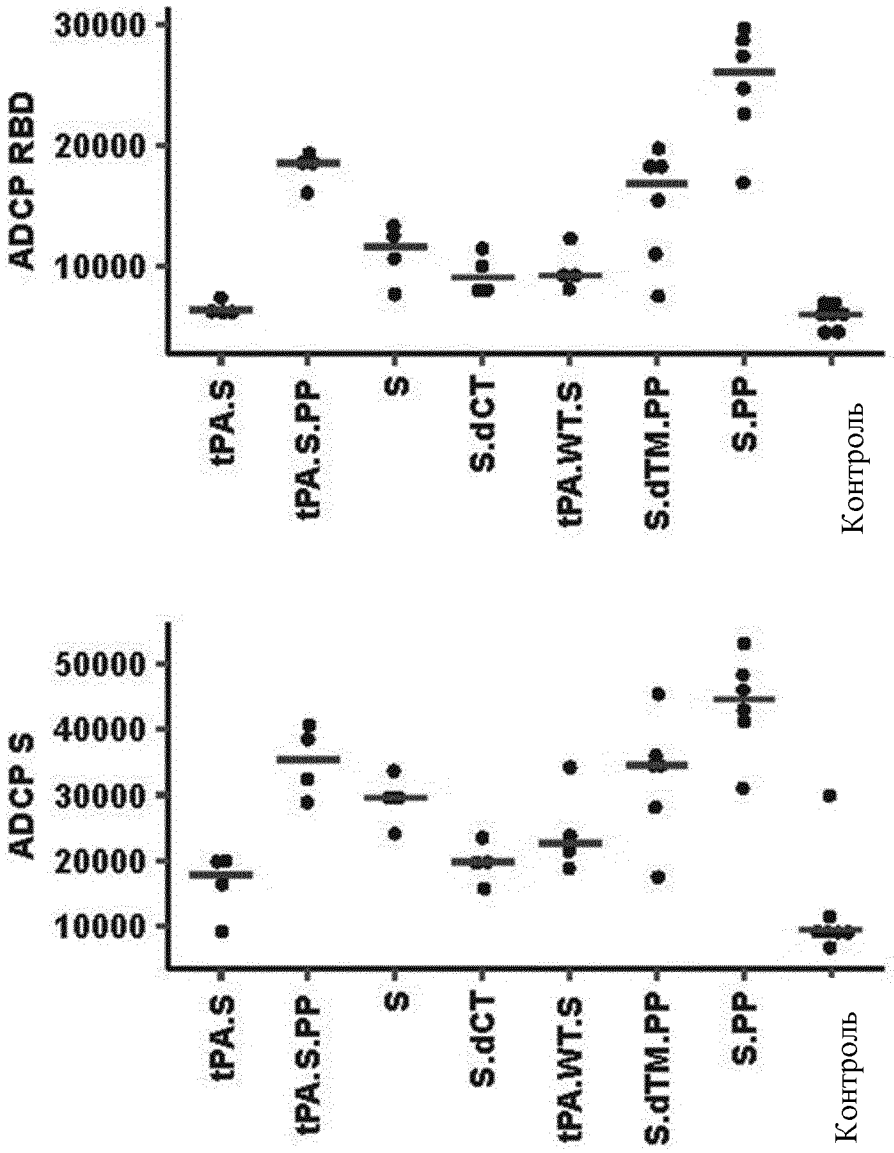
Фиг. 46


BAL IgG
BAL IgA
Титр ИФА
100
10
1
S.PP
Контроль

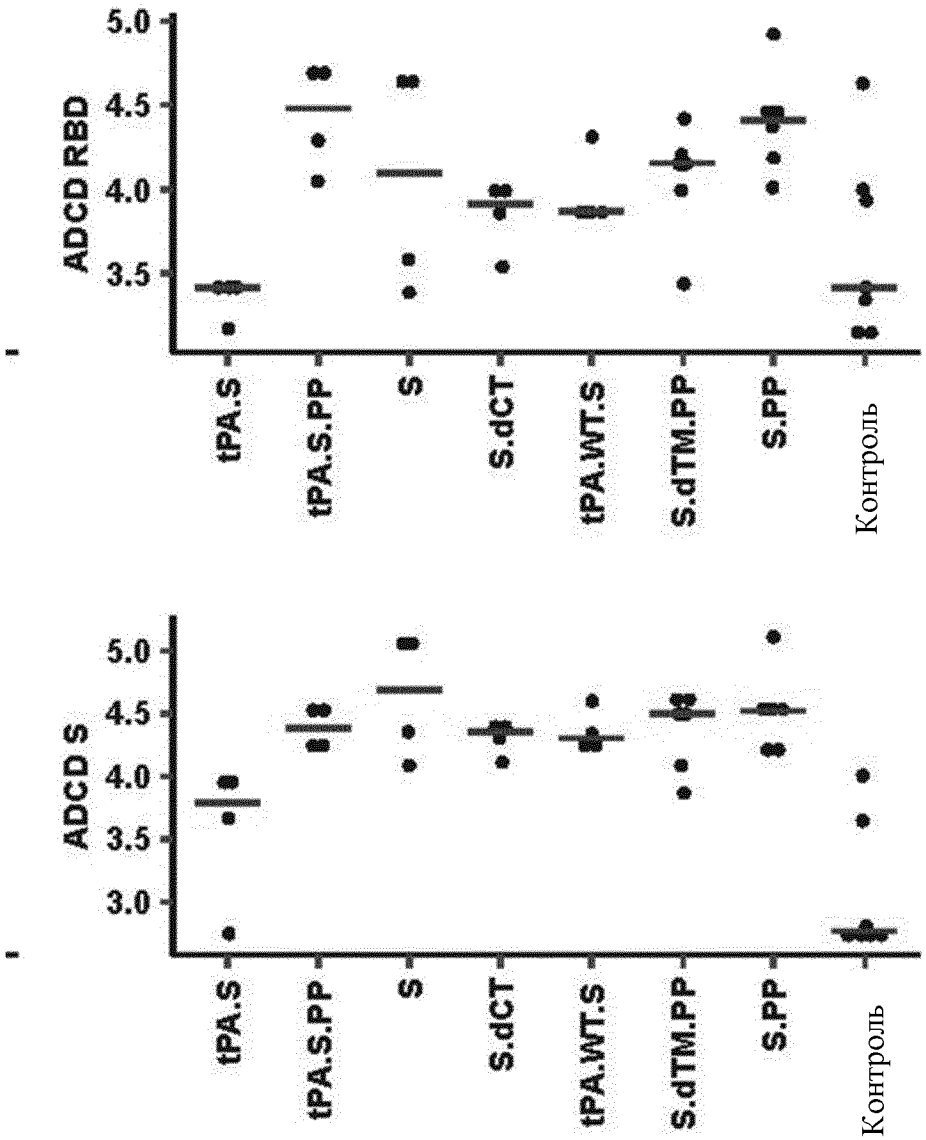
Фиг. 47


ADNP RBD
12500
10000
7500
5000
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль
ADNP S
11000
10000
9000
8000
7000
6000
tPA.S
tPA.S.PP
S
S.dCT
tPA.WT.S
S.dTM.PP
S.PP
Контроль

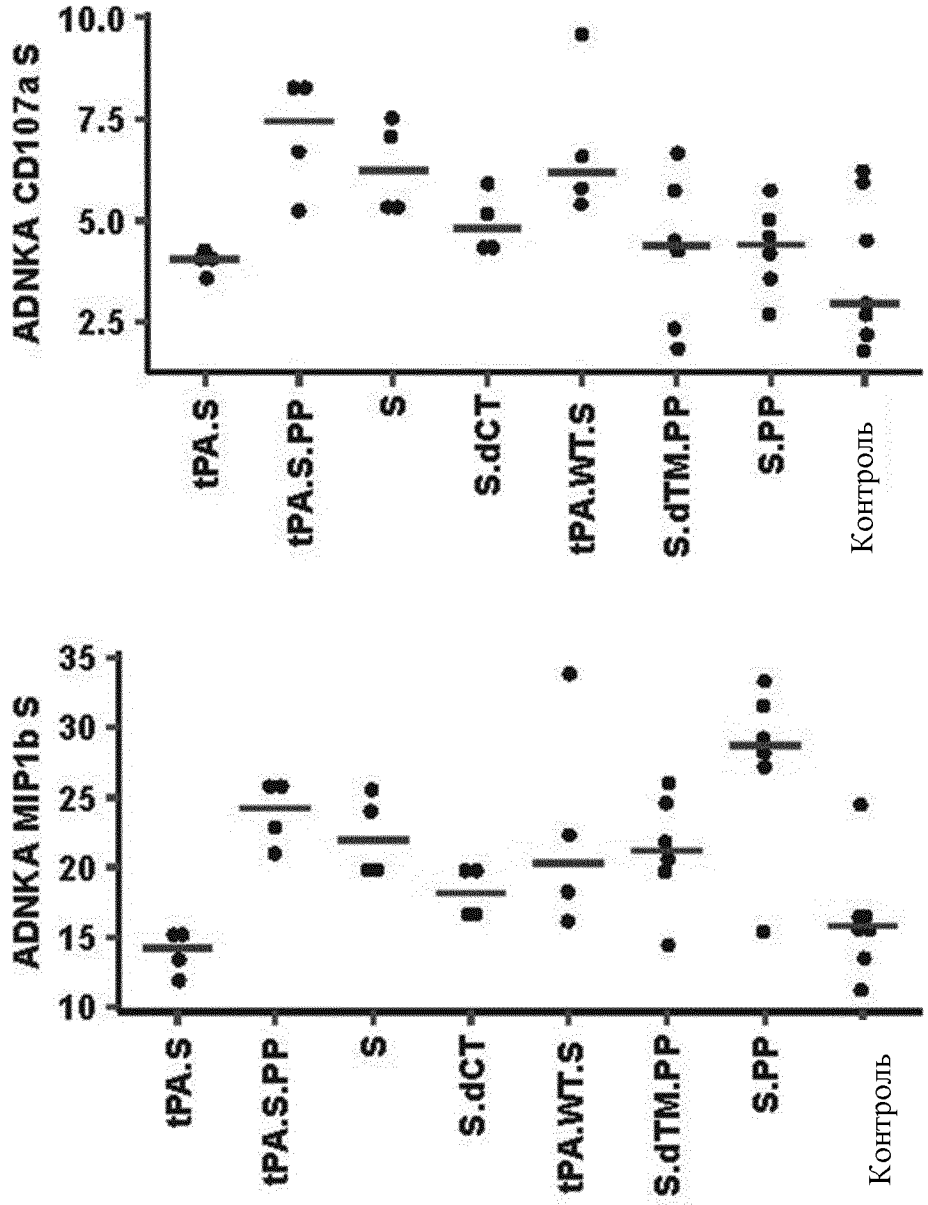
Фиг. 48



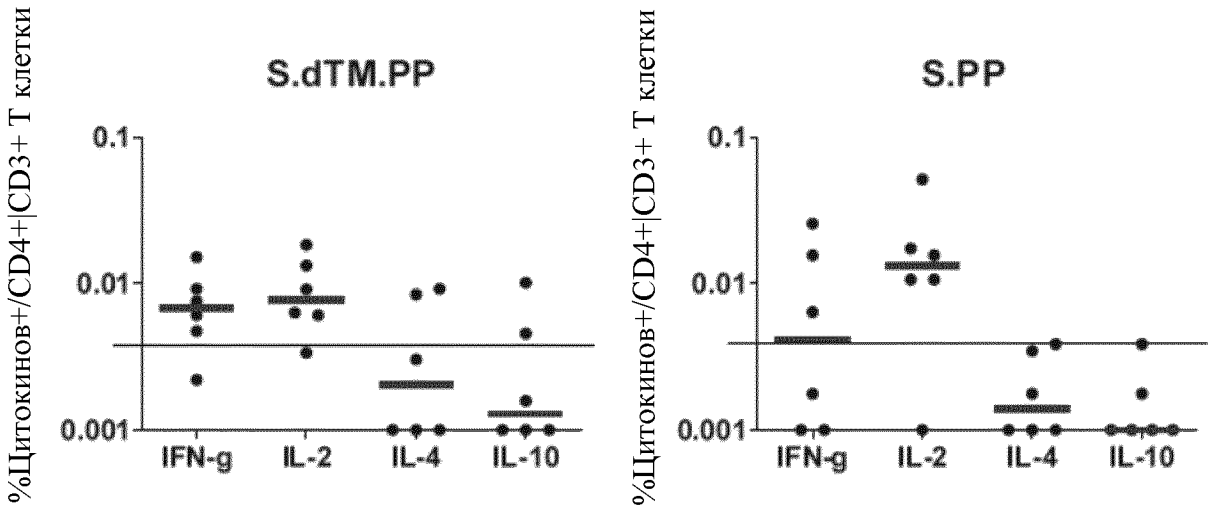
Фиг. 48 (продолжение)



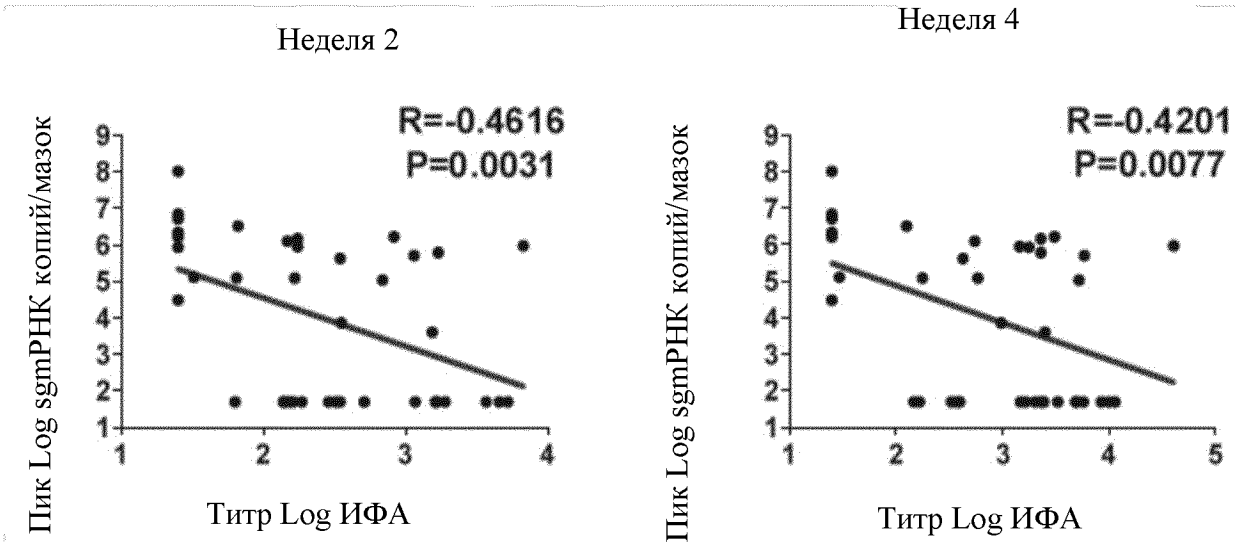
Фиг. 48 (продолжение)



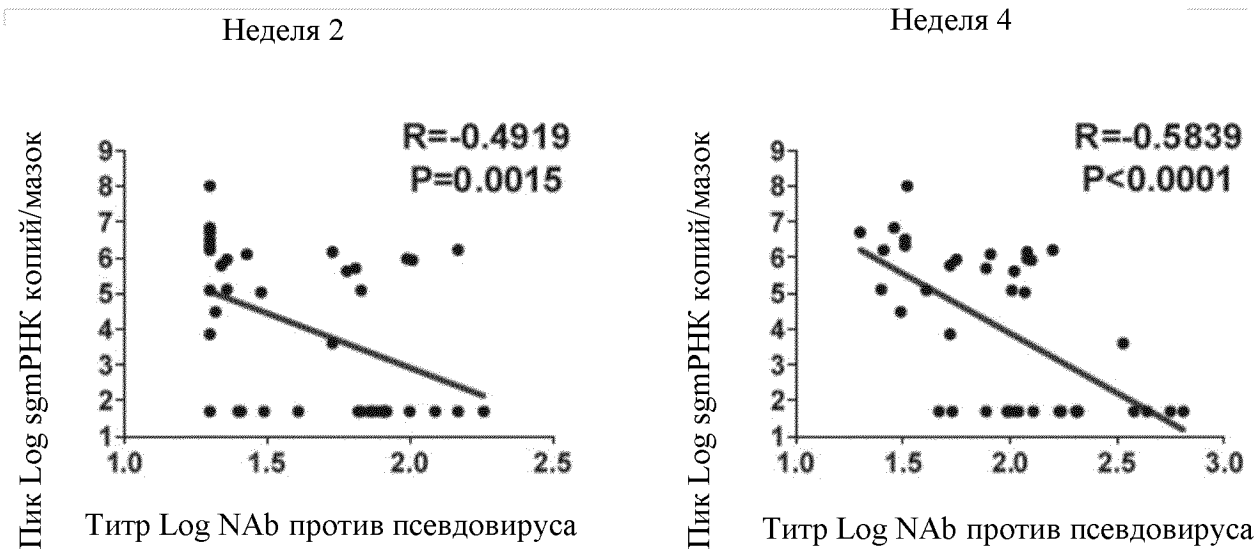
Фиг. 48 (продолжение)


%Цитокинов+/CD4+|CD3+ Т клетки
S.dTM.PP
0.1
0.01
0.001
IFN-g
IL-2
IL-4
IL-10
%Цитокинов+/CD4+|CD3+ Т клетки
S.PP
0.1
0.01
0.001
IFN-g
IL-2
IL-4
IL-10

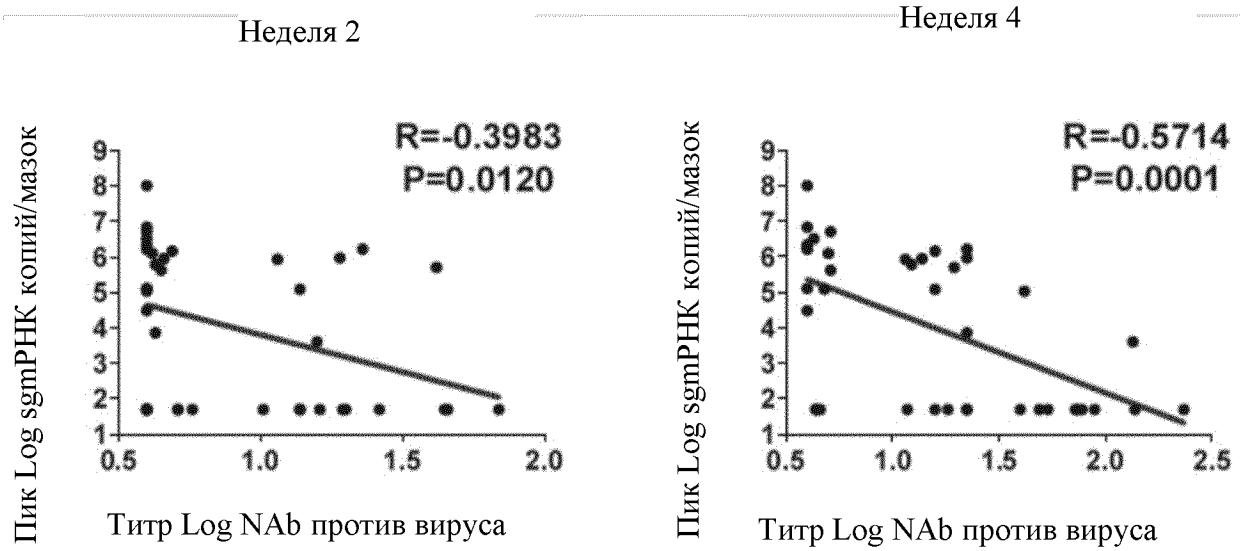
Фиг. 49


Неделя 2
Пик Log sgmPHK копий/мазок
R=-0.4616
P=0.0031
Титр Log ИФА
Неделя 4
Пик Log sgmPHK копий/мазок
R=-0.4201
P=0.0077
Титр Log ИФА

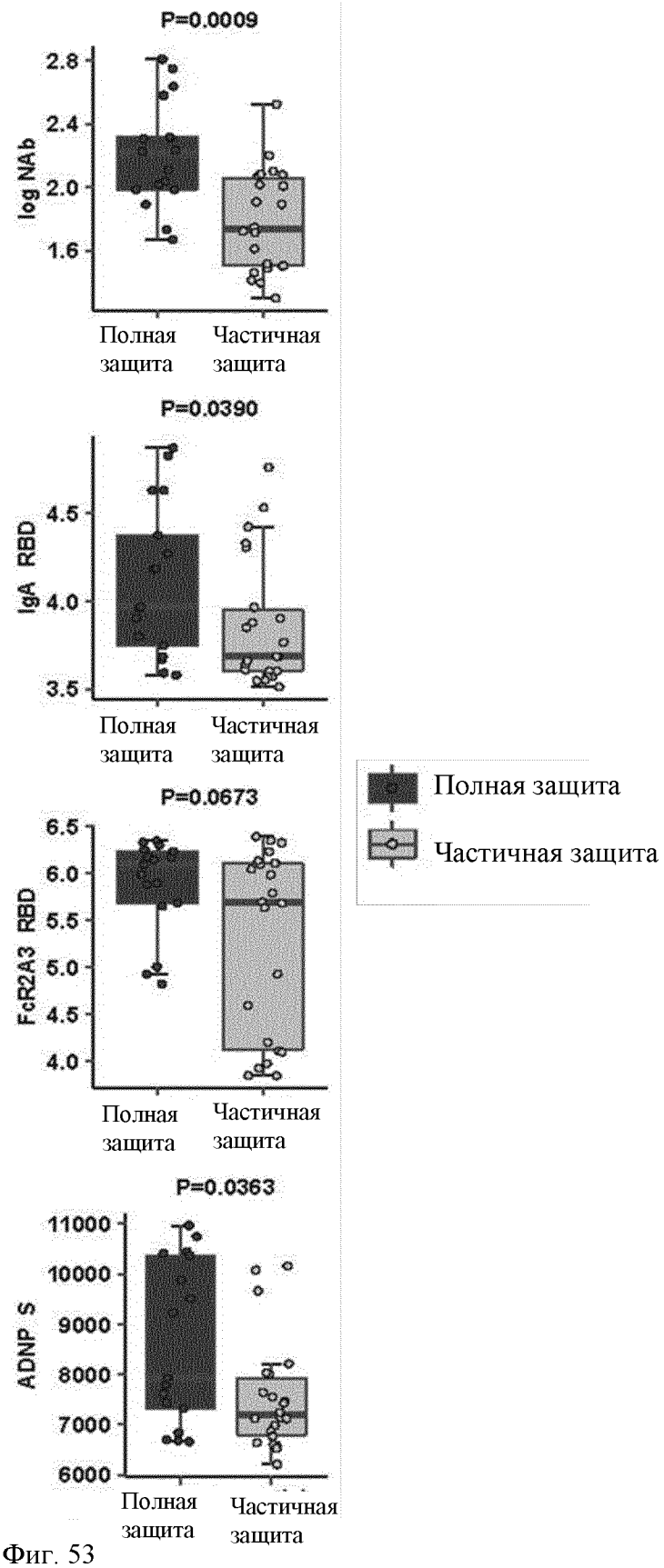
Фиг. 50


Неделя 2
Неделя 4
R=-0.4919
P=0.0015
R=-0.5839
P<0.0001
Пик Log sgmPHK копий/мазок
Титр Log NAb против псевдовируса
Титр Log NAb против псевдовируса

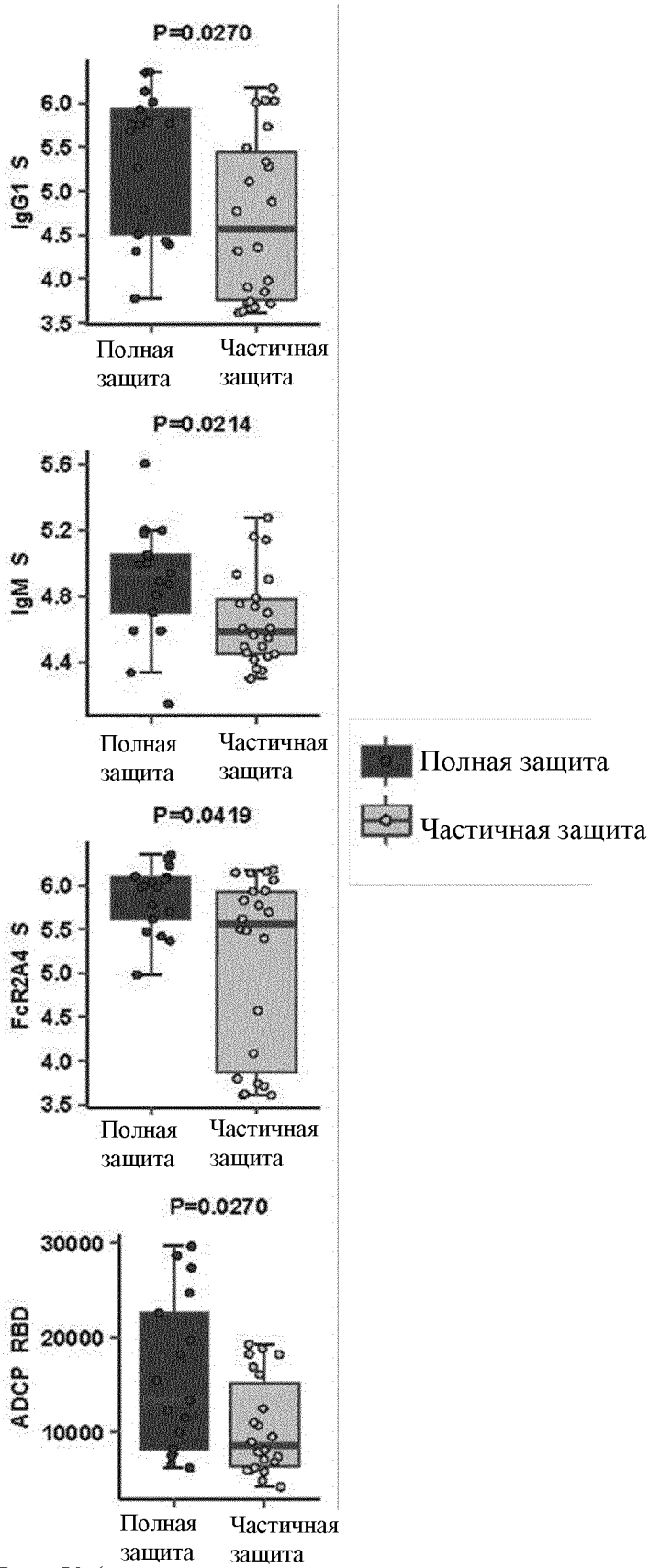
Фиг. 51


Неделя 2
Неделя 4
R=-0.3983
P=0.0120
R=-0.5714
P=0.0001
Пик Log sgmPHK копий/мазок
Титр Log NAb против вируса
Титр Log NAb против вируса

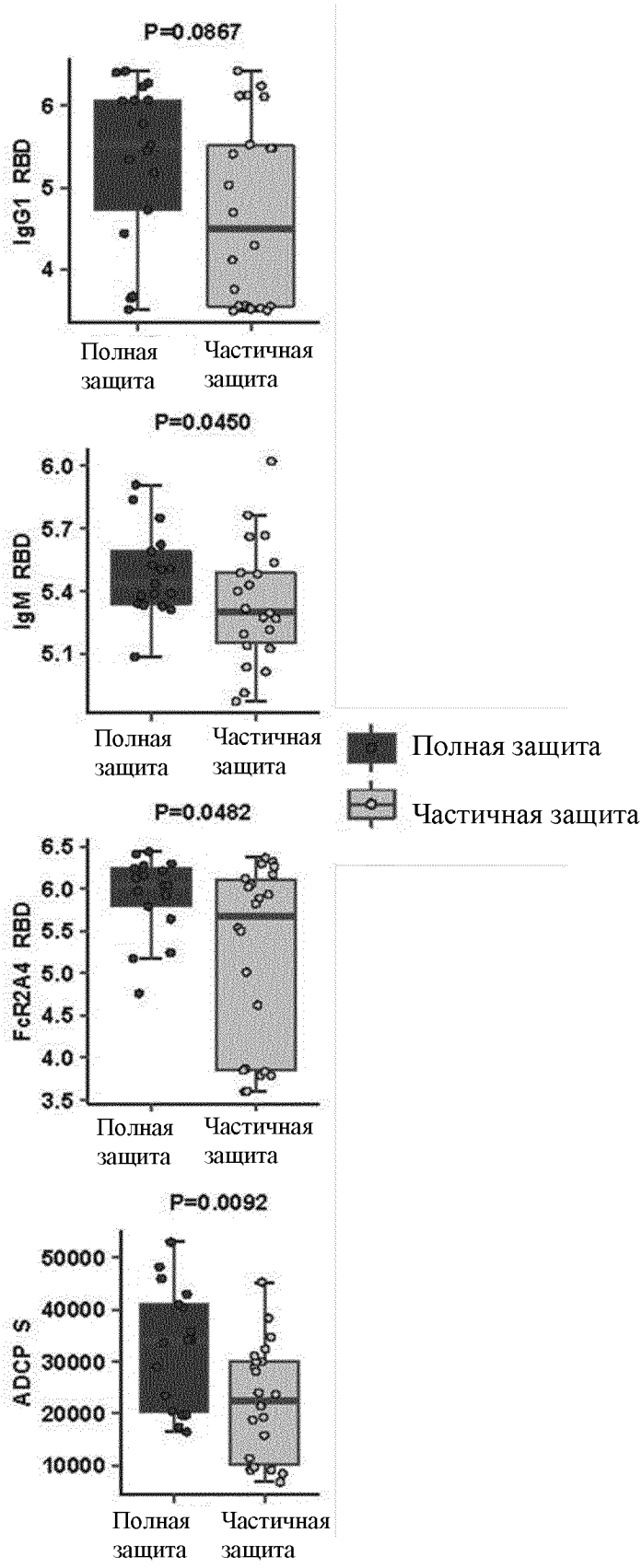
Фиг. 52


P=0.0009
log NAb
2.8
2.4
2.0
1.6
Полная защита
Частичная защита
P=0.0390
IgA RBD
4.5
4.0
3.5
Полная защита
Частичная защита
P=0.0673
FcR2A3 RBD
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
Полная защита
Частичная защита
P=0.0363
ADNP S
11000
10000
9000
8000
7000
6000
Полная защита
Частичная защита
Полная защита
Частичная защита

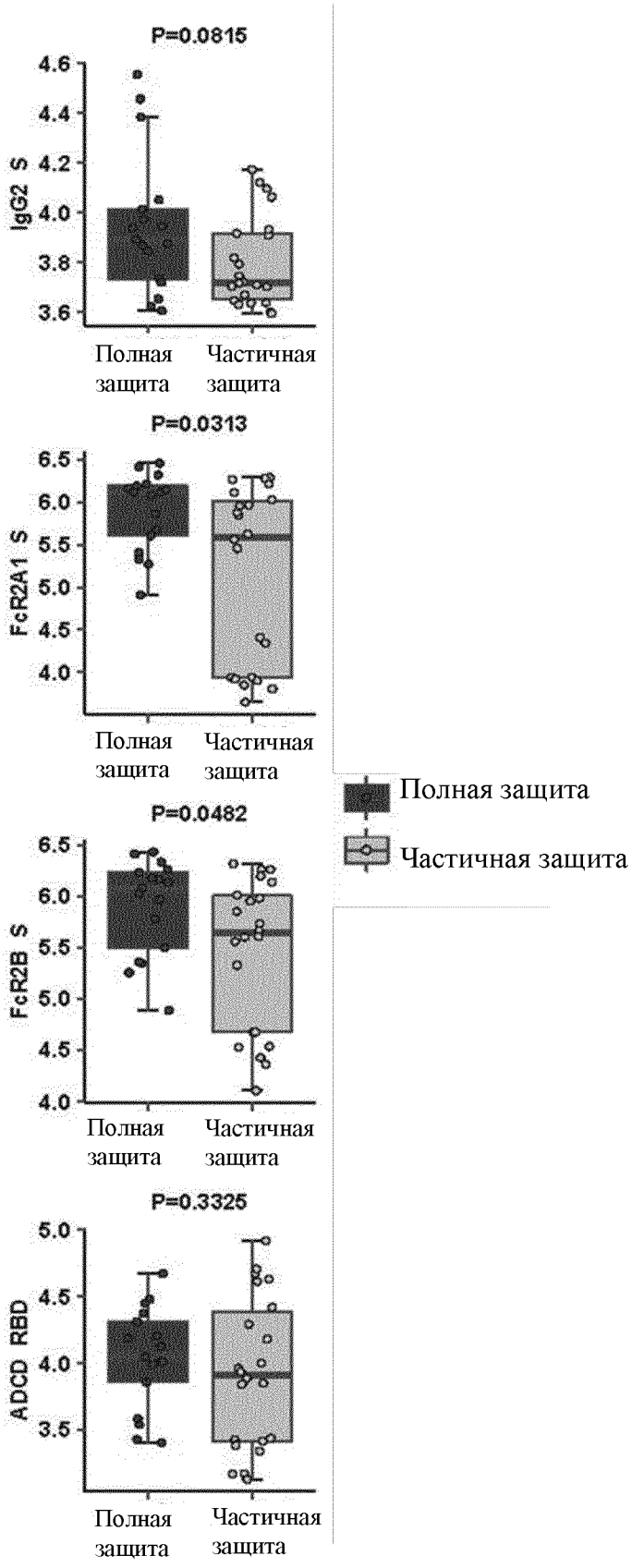
Фиг. 53



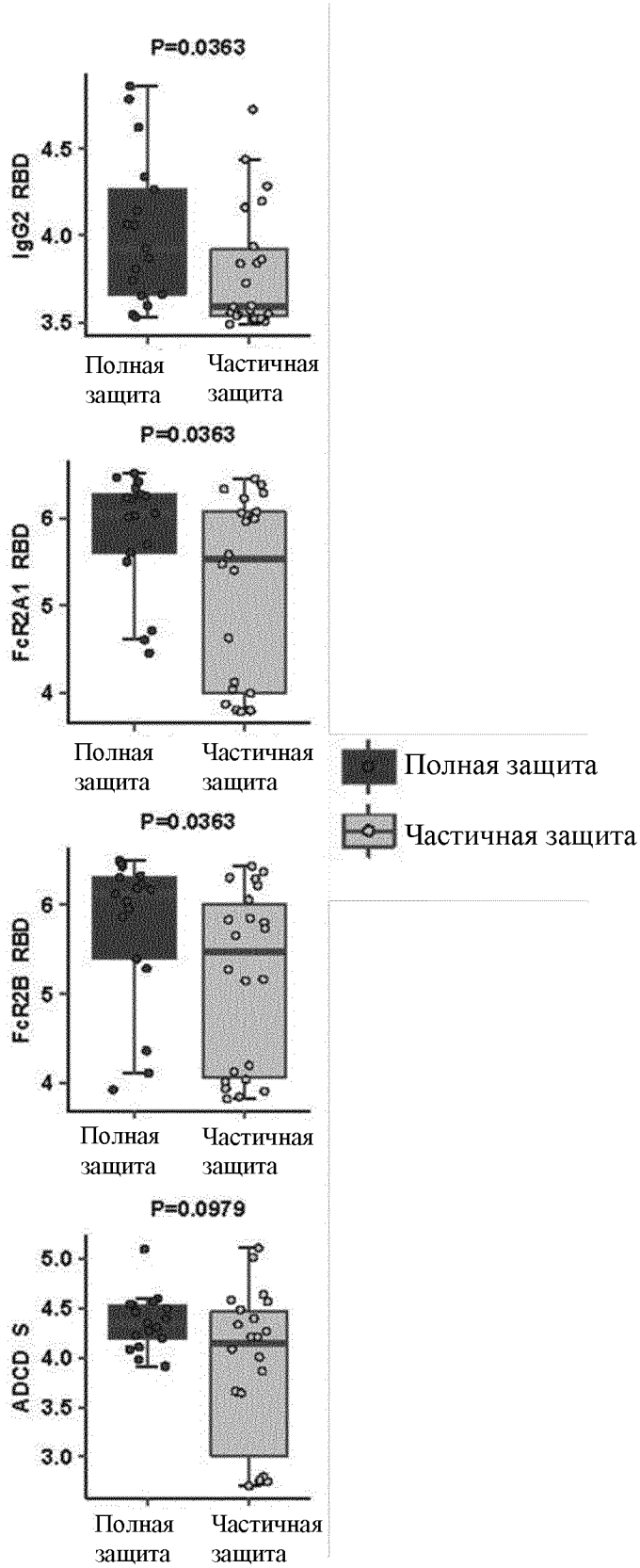
Фиг. 53 (продолжение)



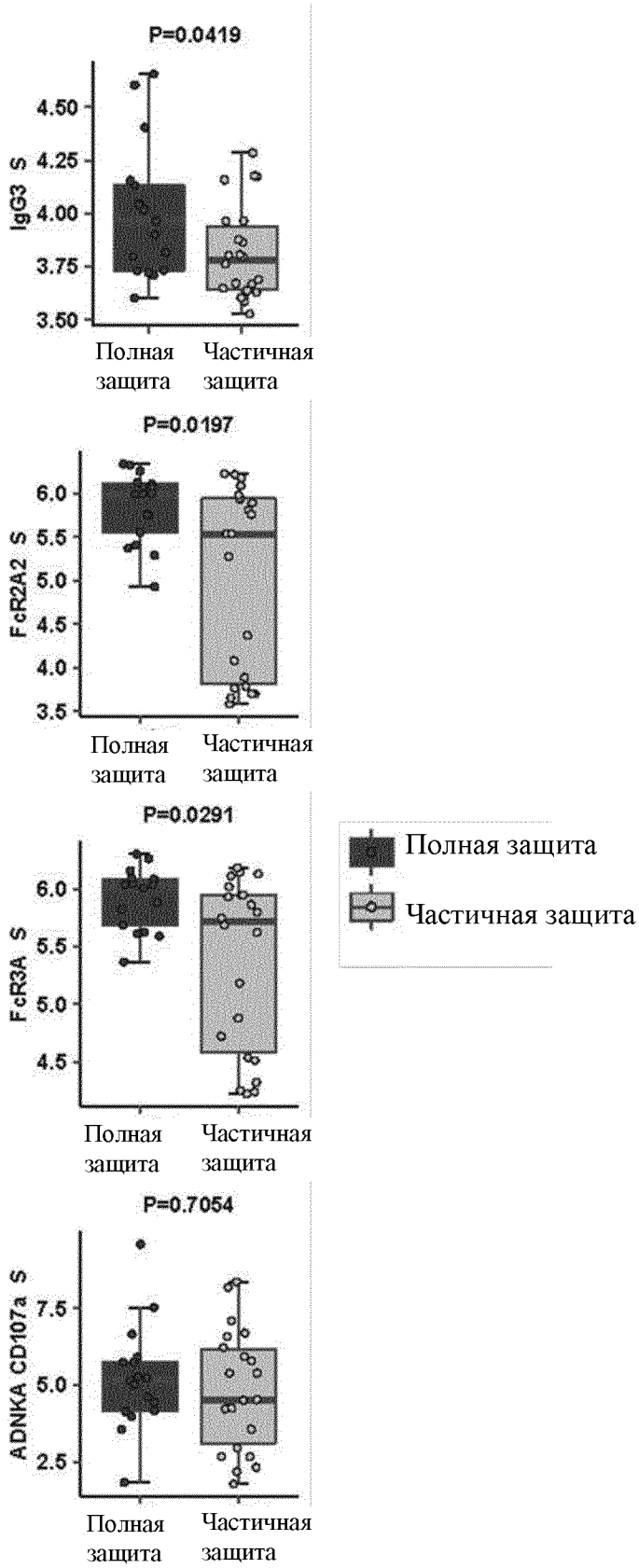
Фиг. 53 (продолжение)



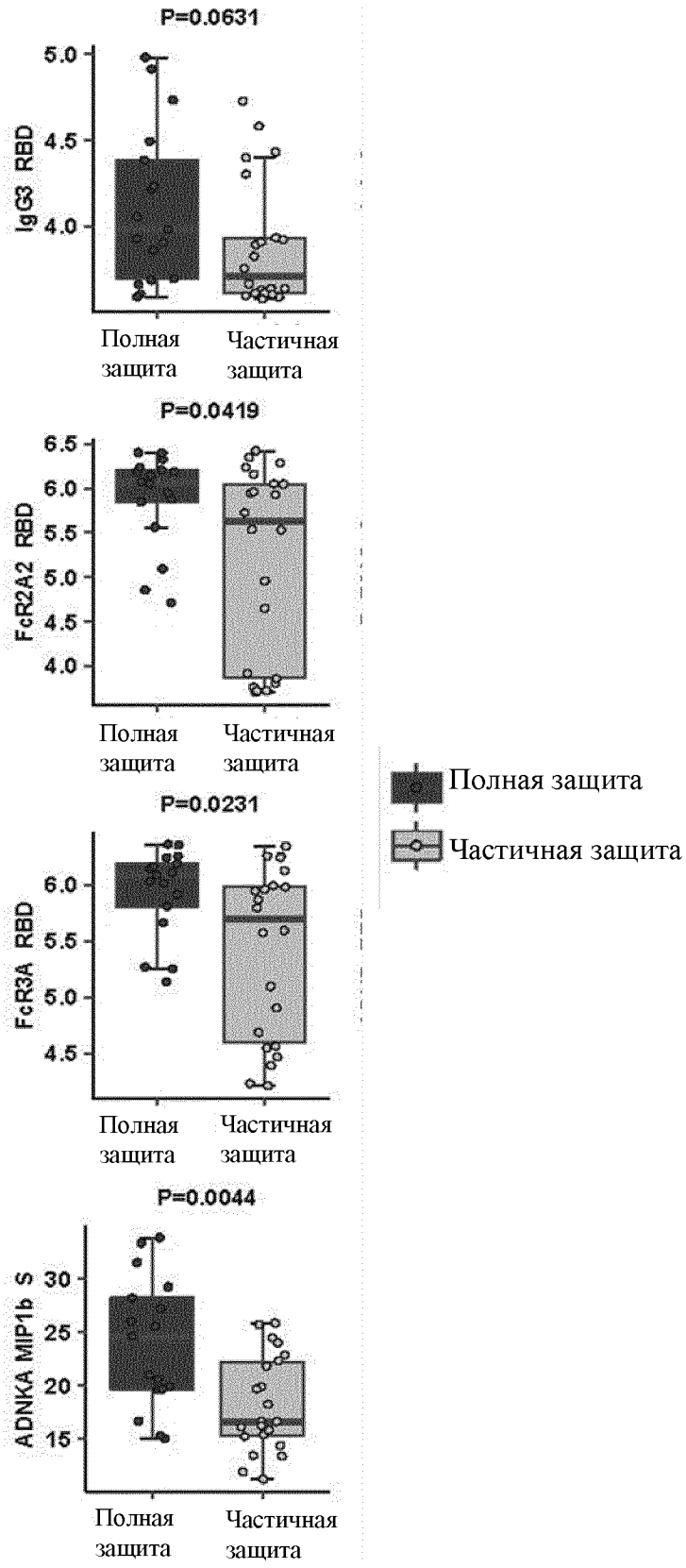
Фиг. 53 (продолжение)



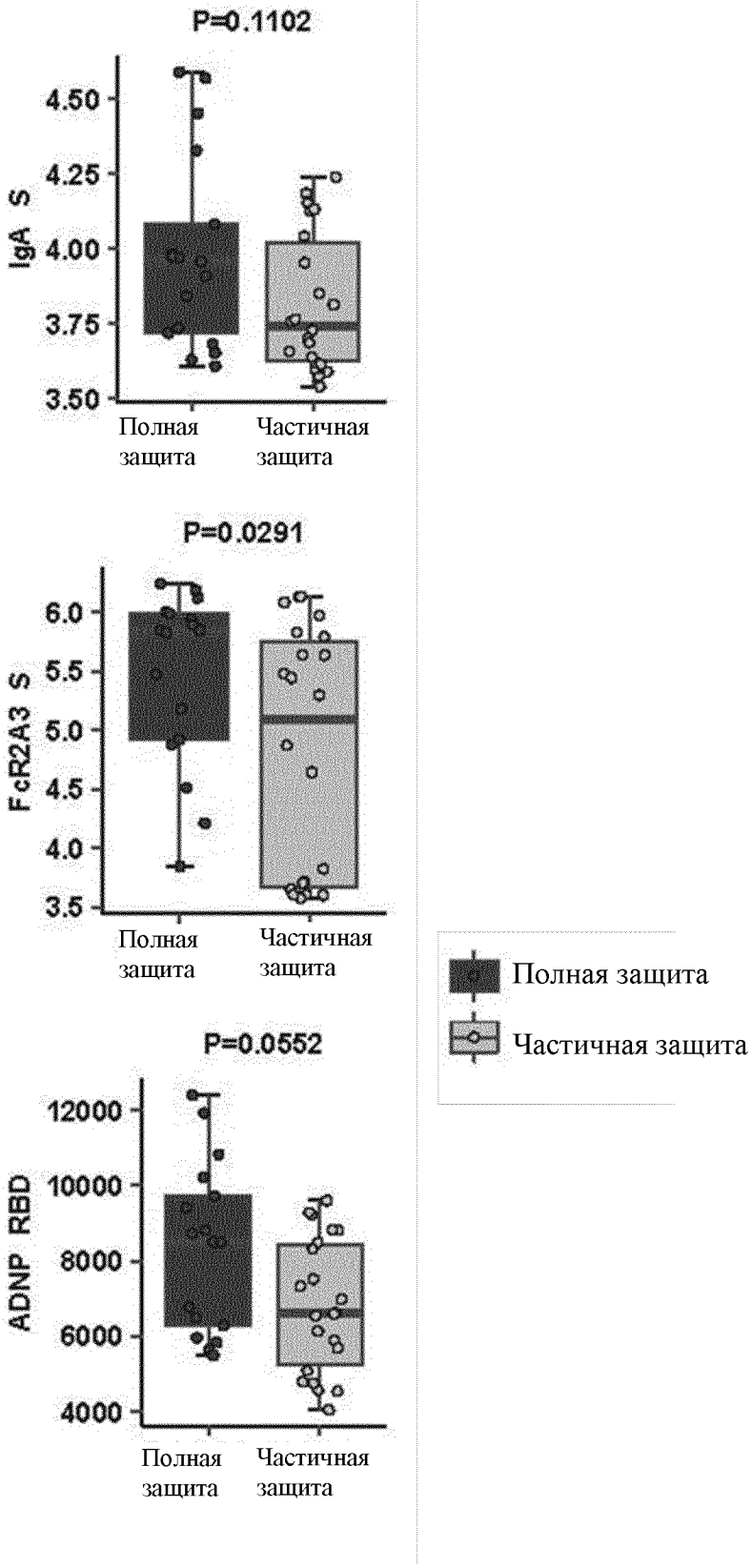
Фиг. 53 (продолжение)



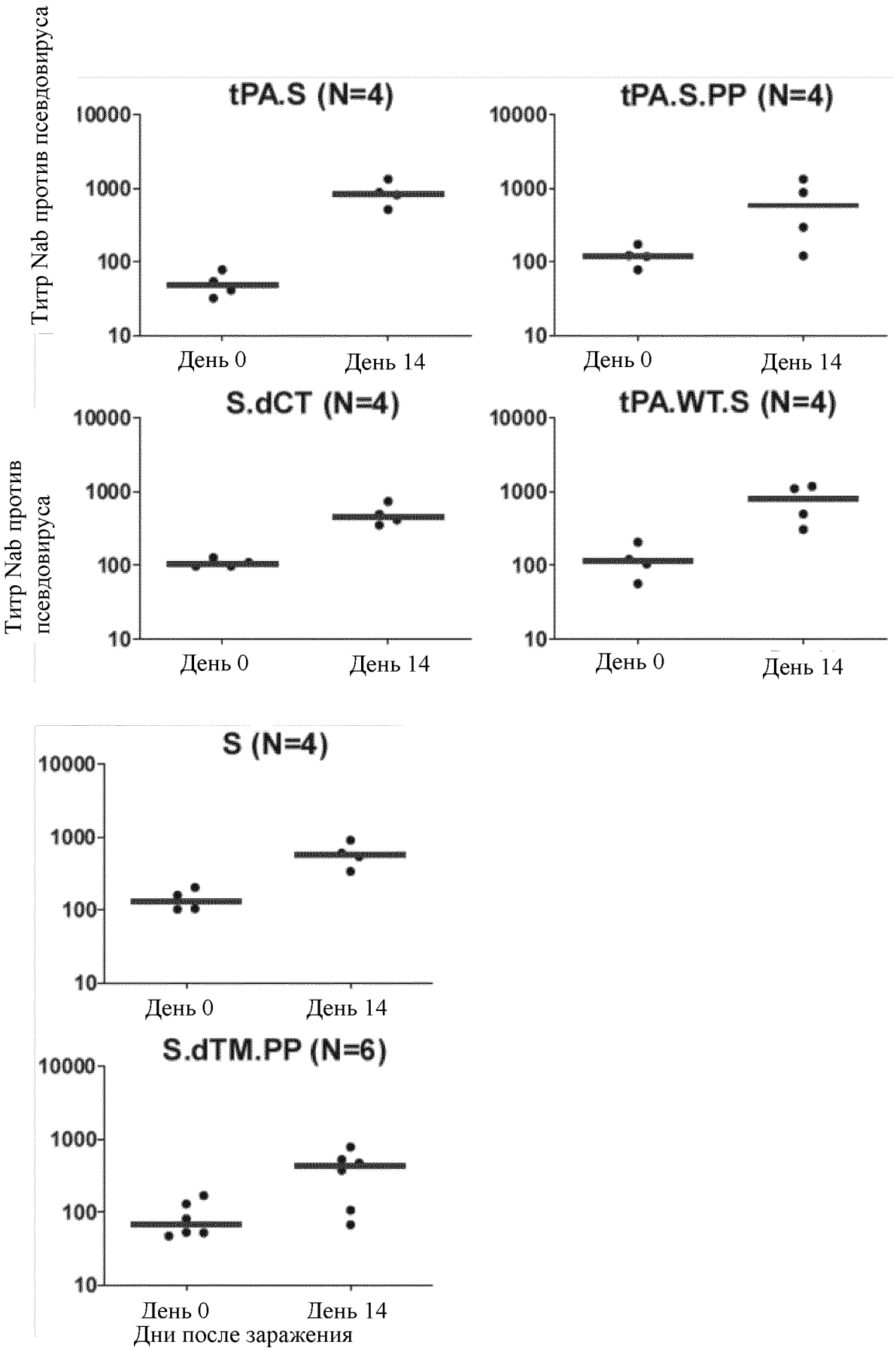
Фиг. 53 (продолжение)



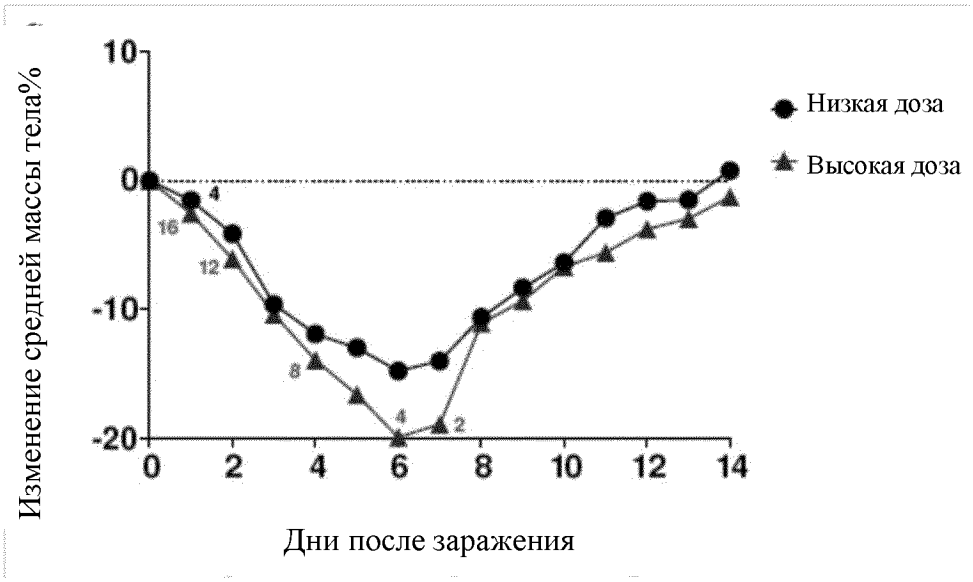
Фиг. 53 (продолжение)



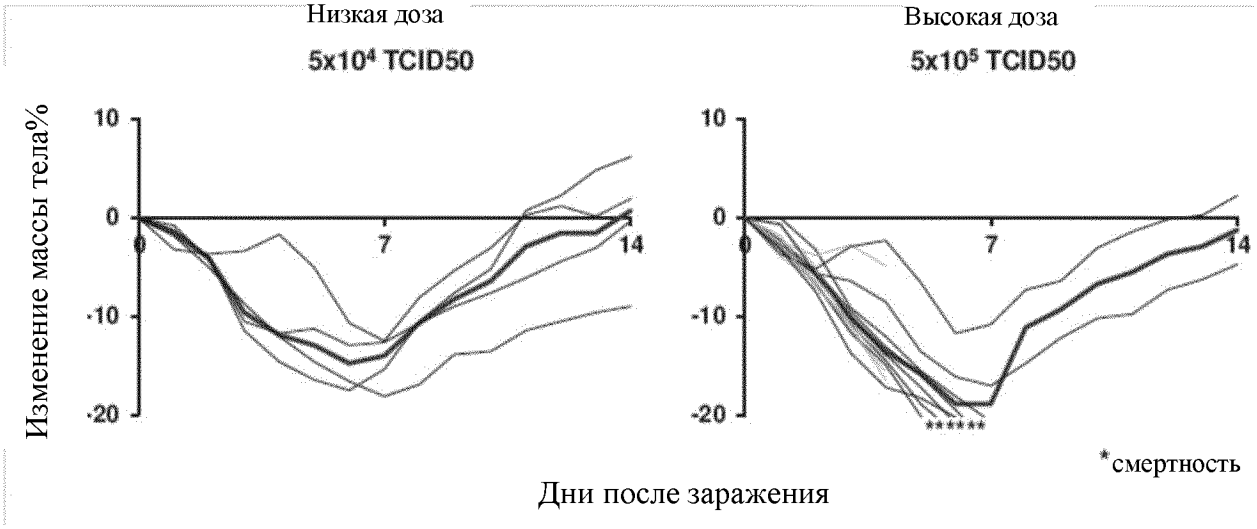
Фиг. 53 (продолжение)


Титр Nab против псевдовируса
tPA.S (N=4)
tPA.S.PP (N=4)
S.dCT (N=4)
tPA.WT.S (N=4)
S (N=4)
S.dTM.PP (N=6)
10000
1000
100
10
День 0
День 14
Дни после заражения

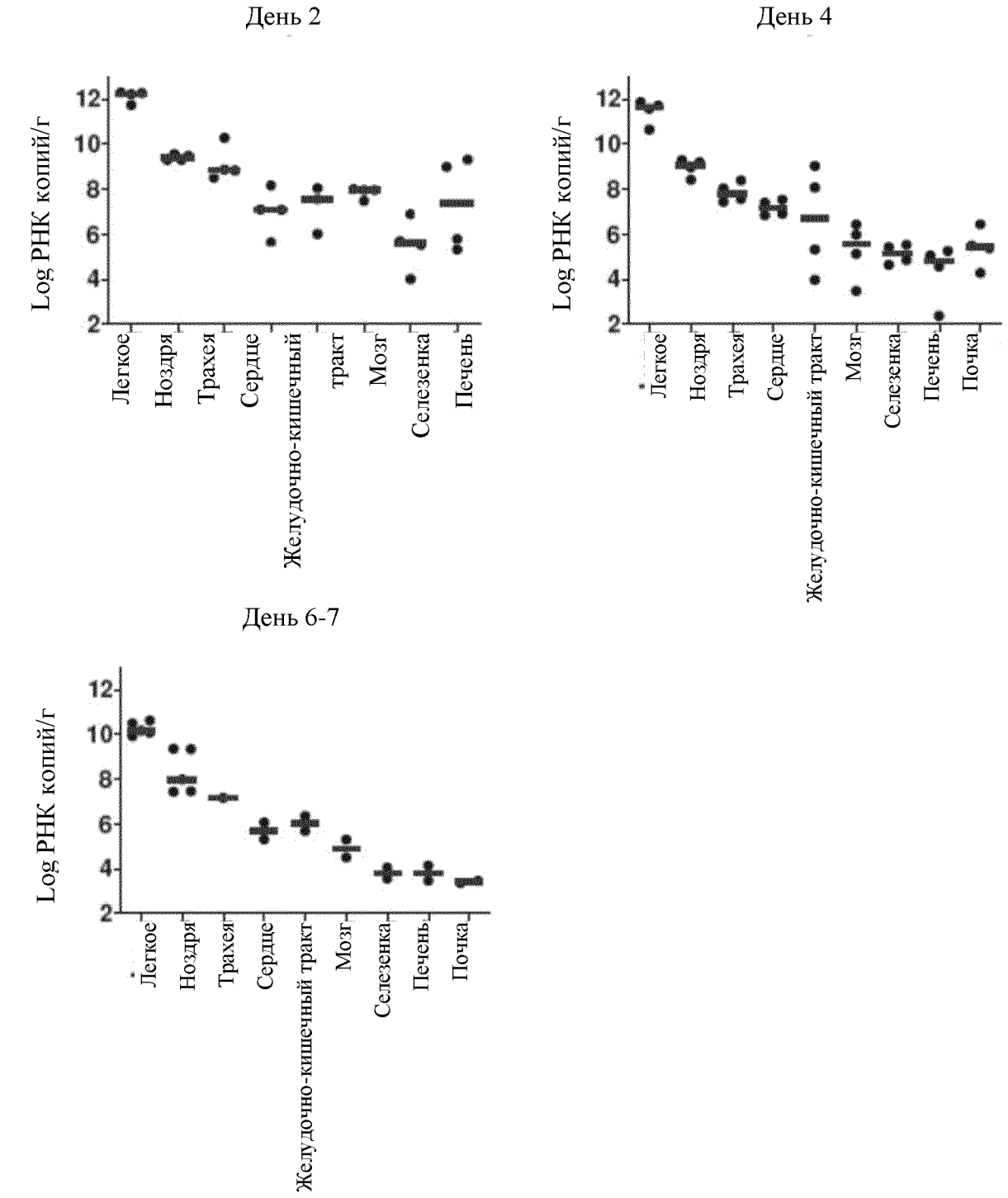
Фиг. 54



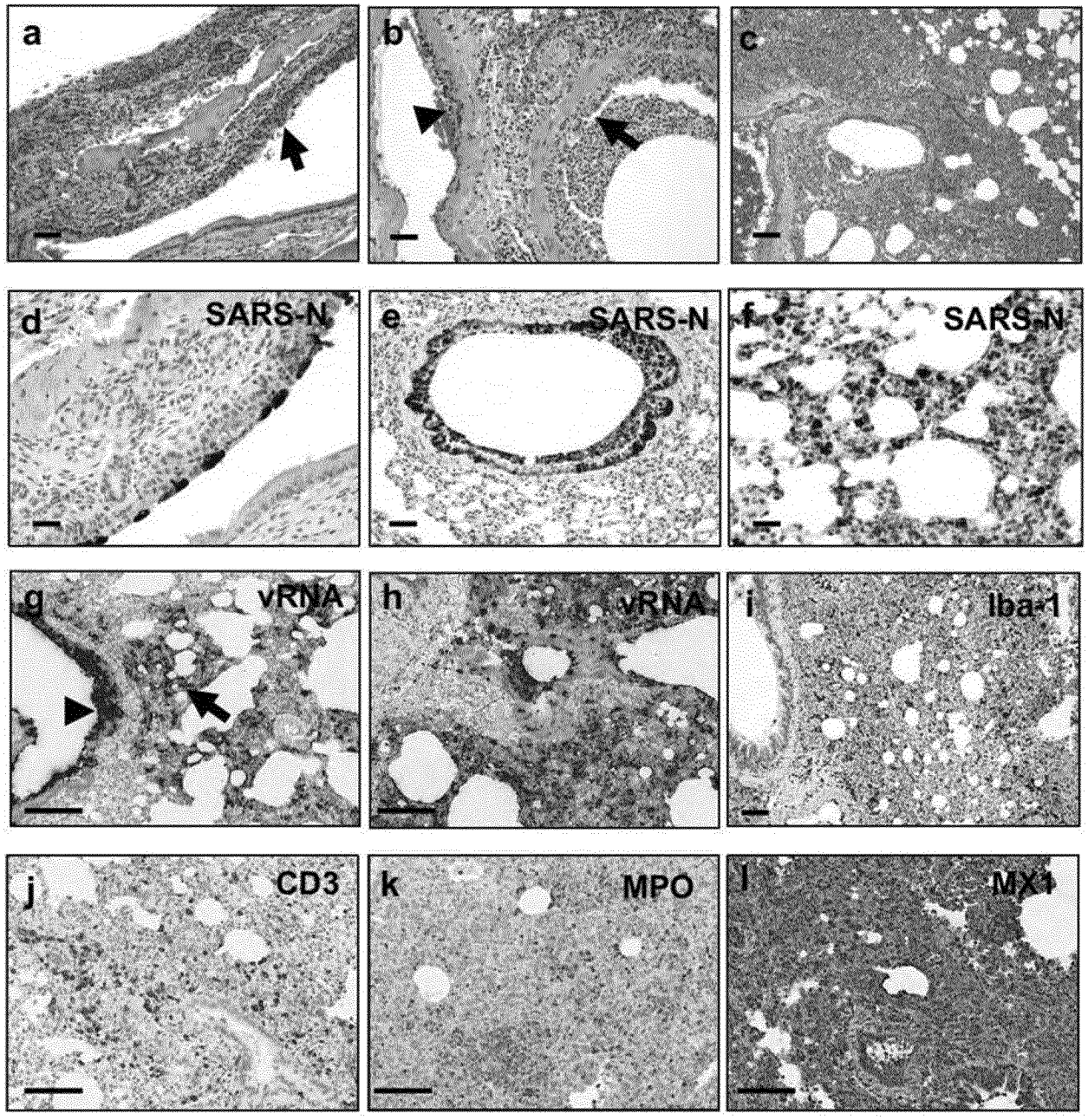
Фиг. 55A



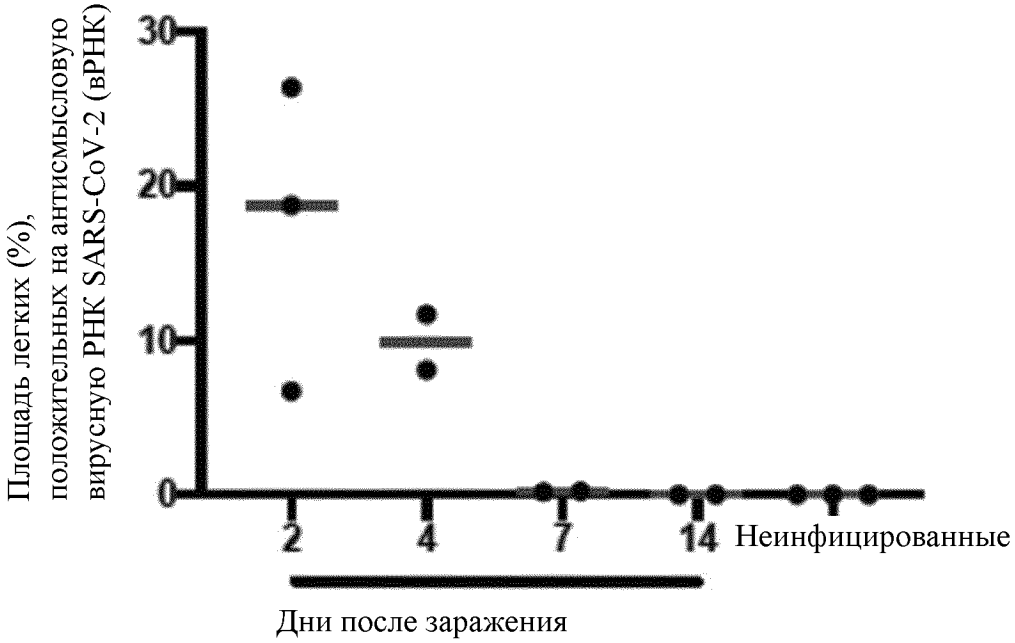
Фиг. 55B


День 2
Log РНК копий/г
12
10
8
6
4
2
Легкое
Ноздря
Трахея
Сердце
Желудочно-кишечный тракт
Мозг
Селезенка
Печень
День 4
Log РНК копий/г
12
10
8
6
4
2
Легкое
Ноздря
Трахея
Сердце
Желудочно-кишечный тракт
Мозг
Селезенка
Печень
Почка
День 6-7
Log РНК копий/г
12
10
8
6
4
2
Легкое
Ноздря
Трахея
Сердце
Желудочно-кишечный тракт
Мозг
Селезенка
Печень
Почка

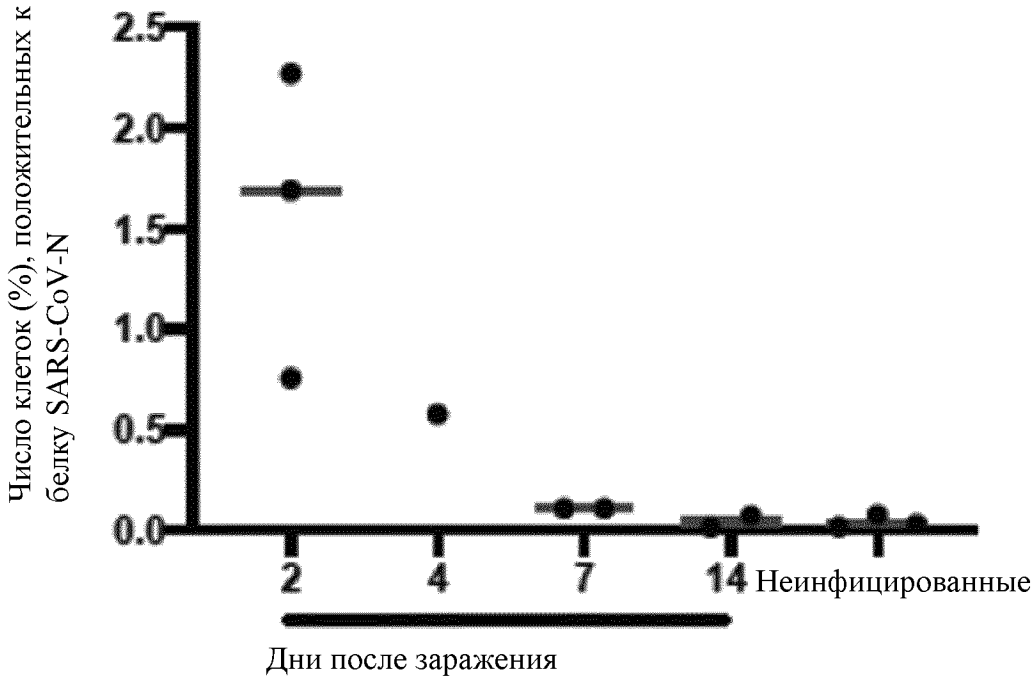
Фиг. 55C



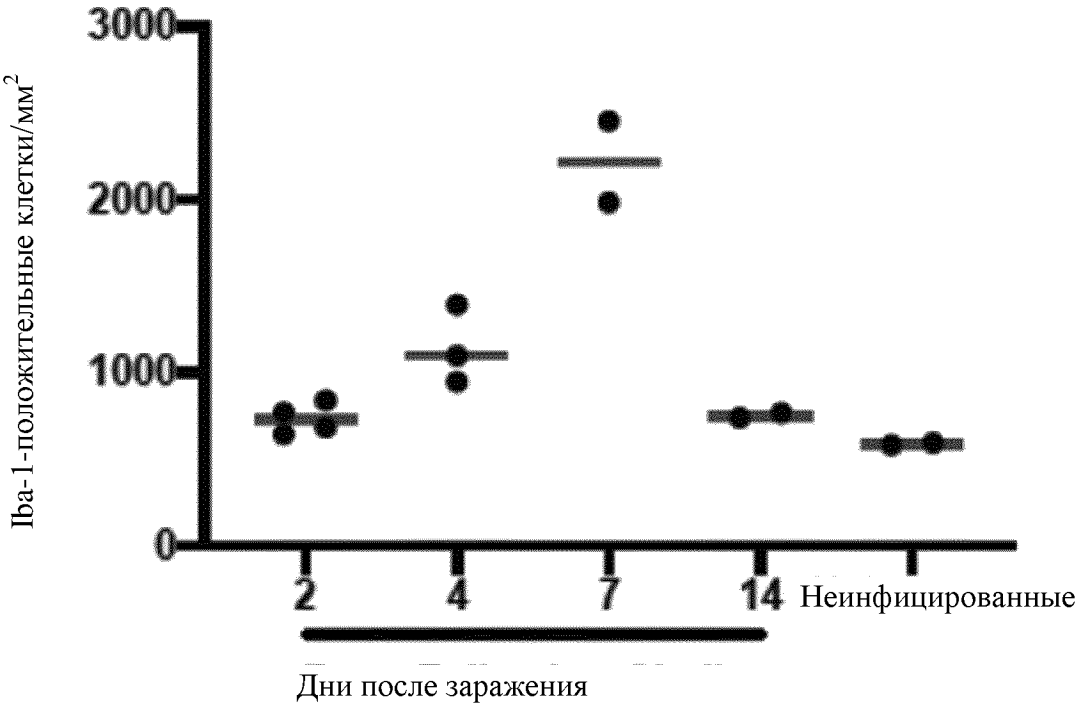
Фиг. 55A-55L



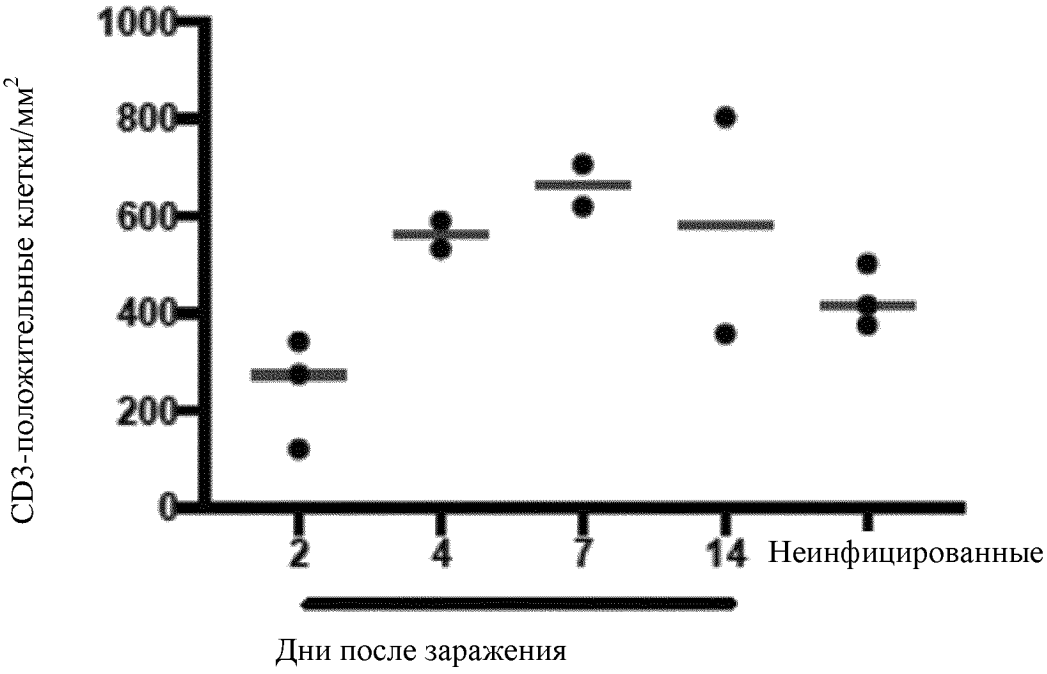
Фиг. 57A



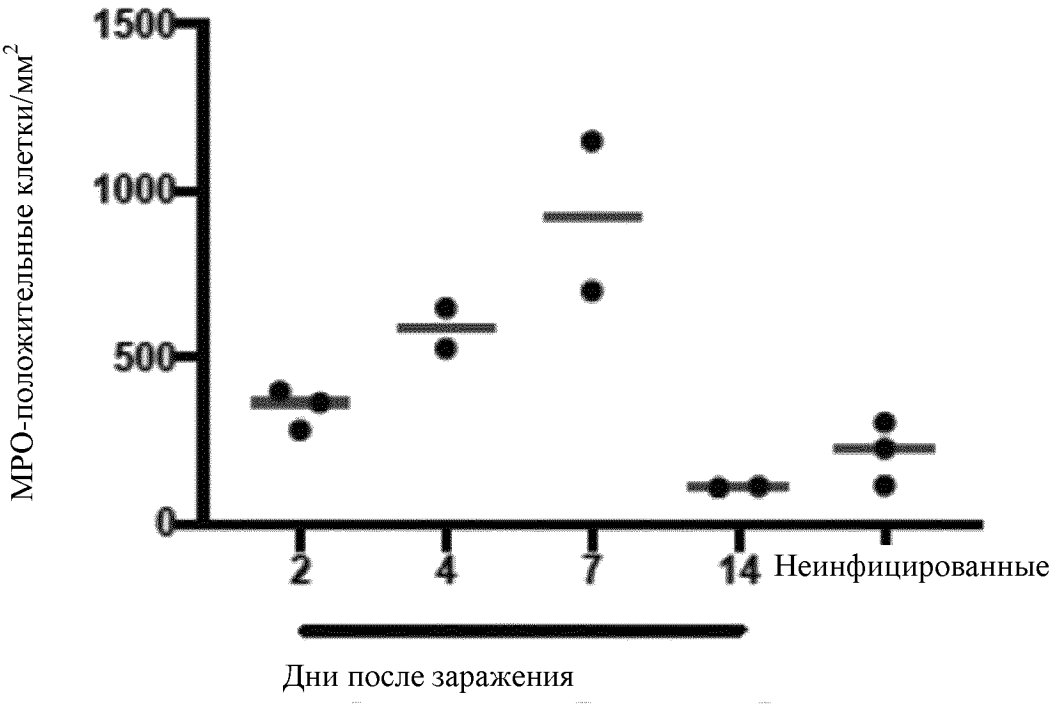
Фиг. 57B



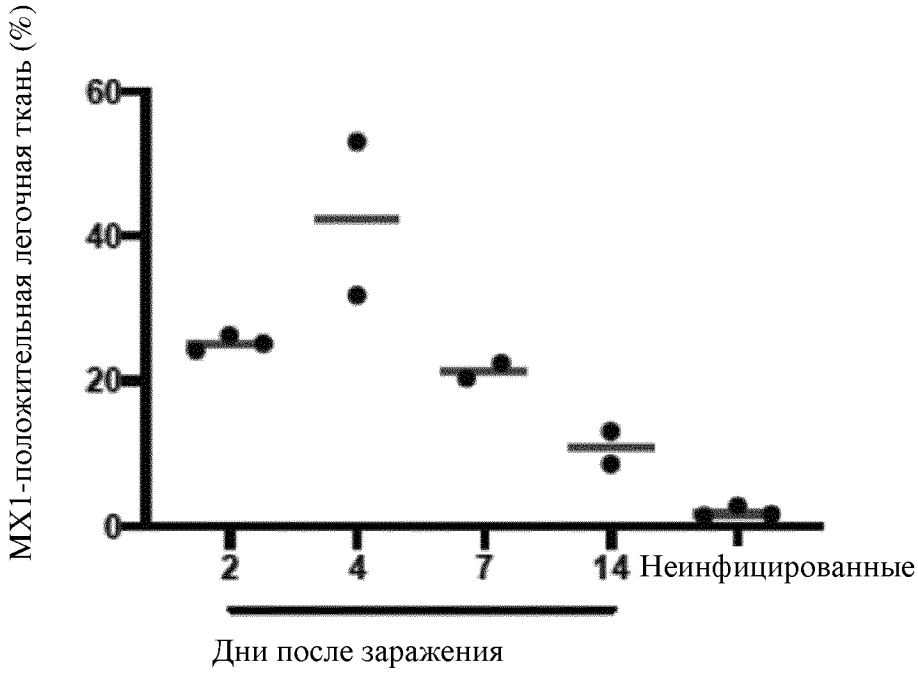
Фиг. 57C



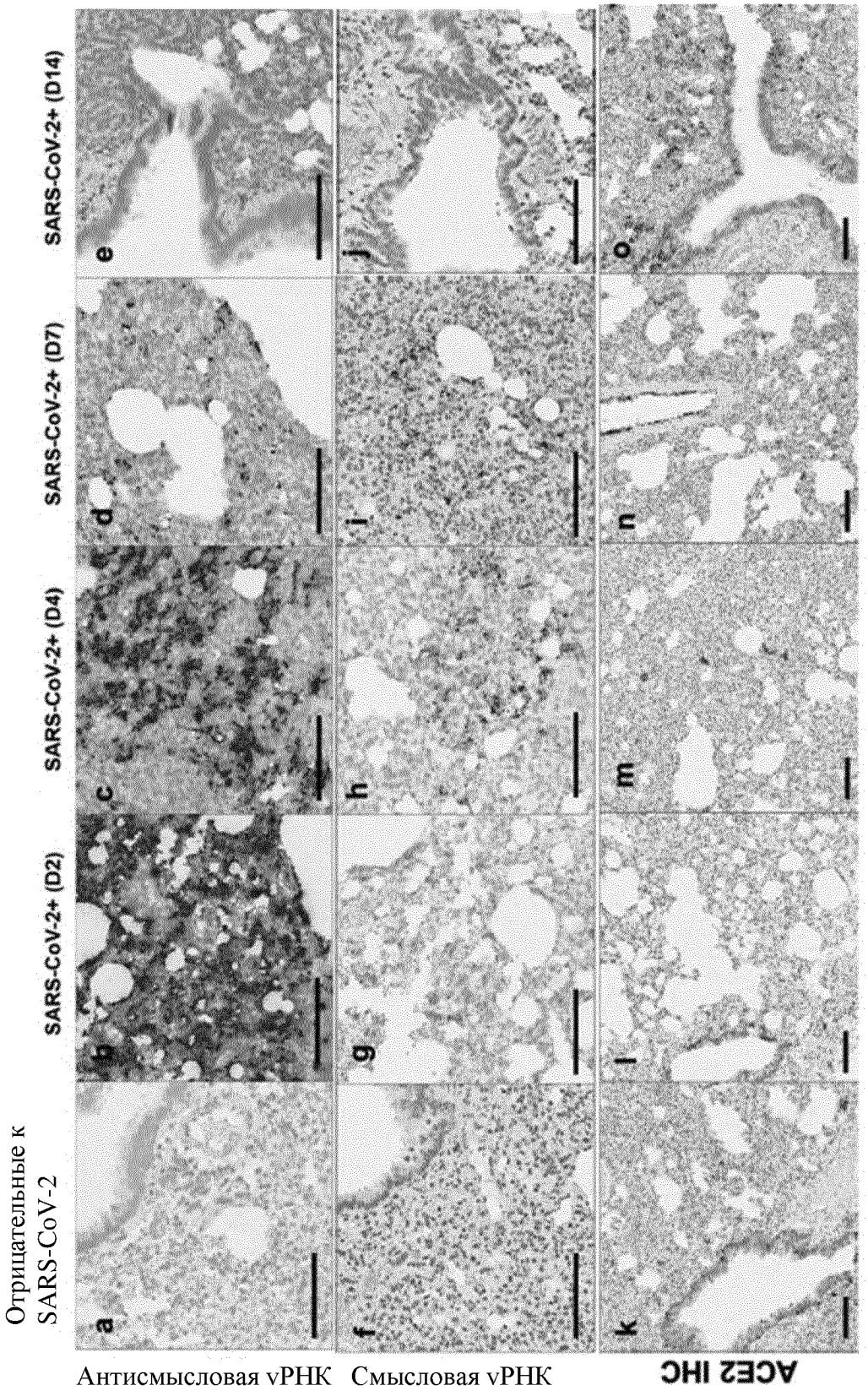
Фиг. 57D



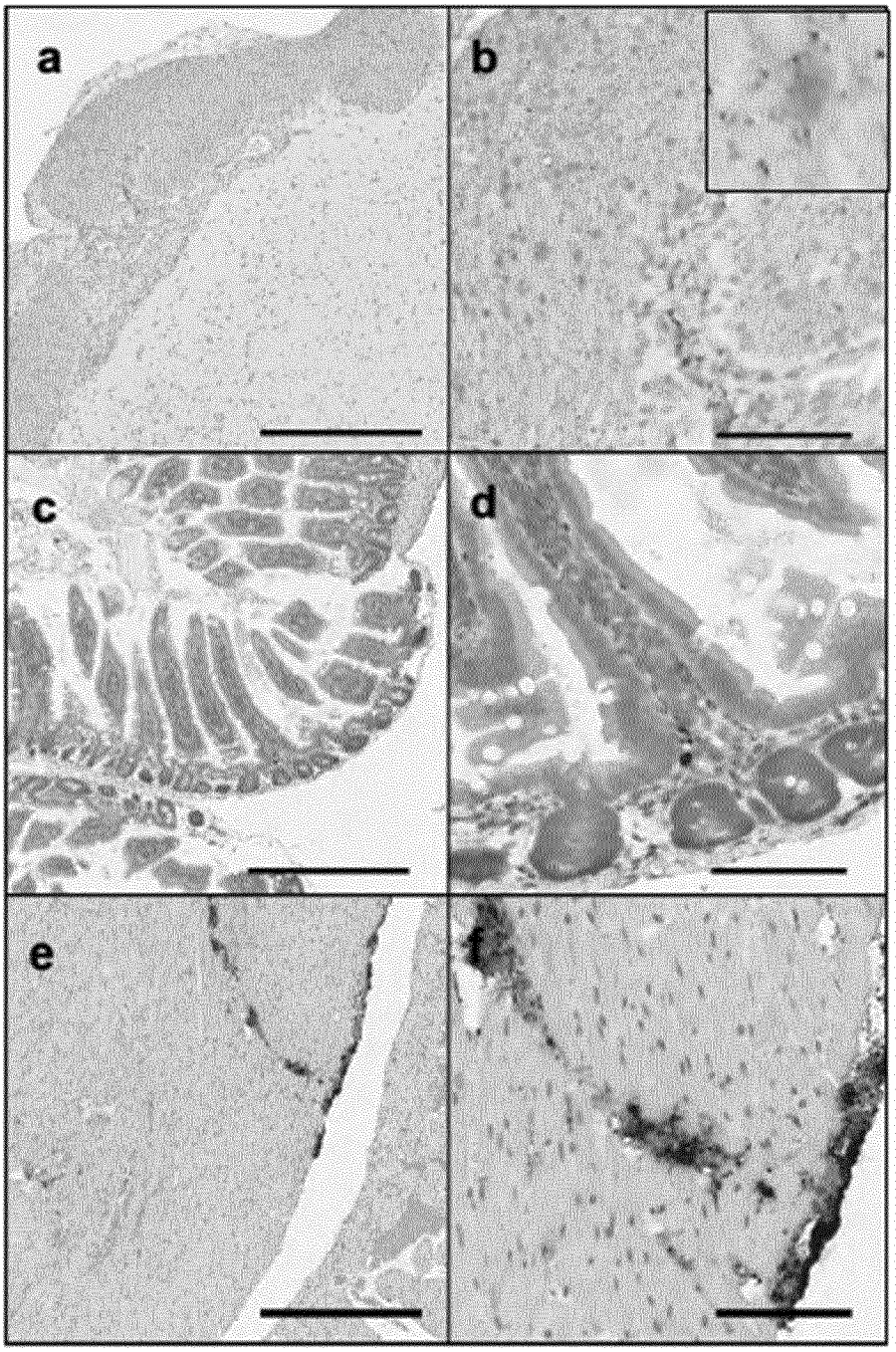
Фиг. 57E



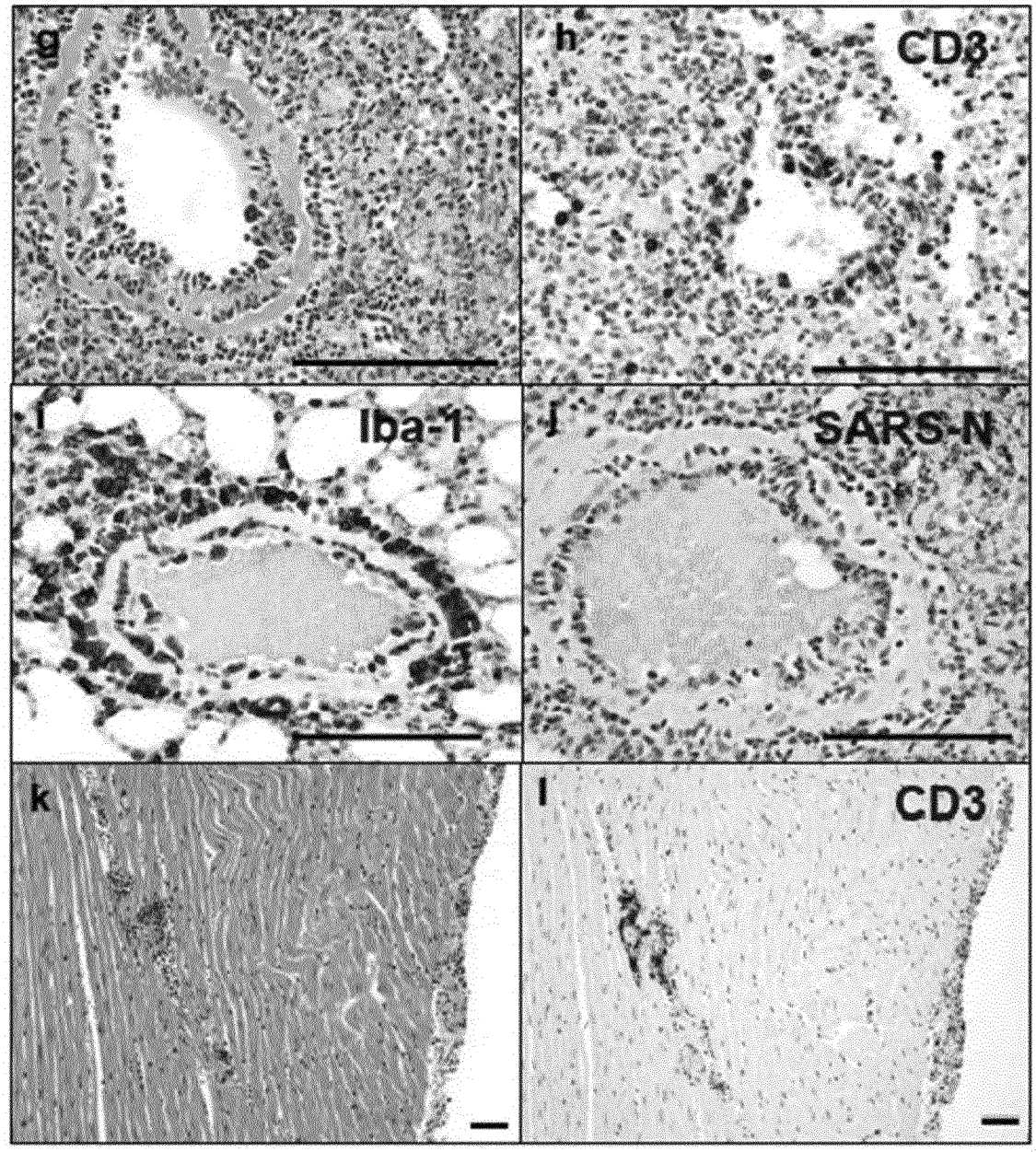
Фиг. 57F


Отрицательные к SARS-CoV-2
SARS-CoV-2+ (D2)
SARS-CoV-2+ (D4)
SARS-CoV-2+ (D7)
SARS-CoV-2+ (D14)
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
Антисмысловая vРНК
Смысловая vРНК
ACE2 IHC

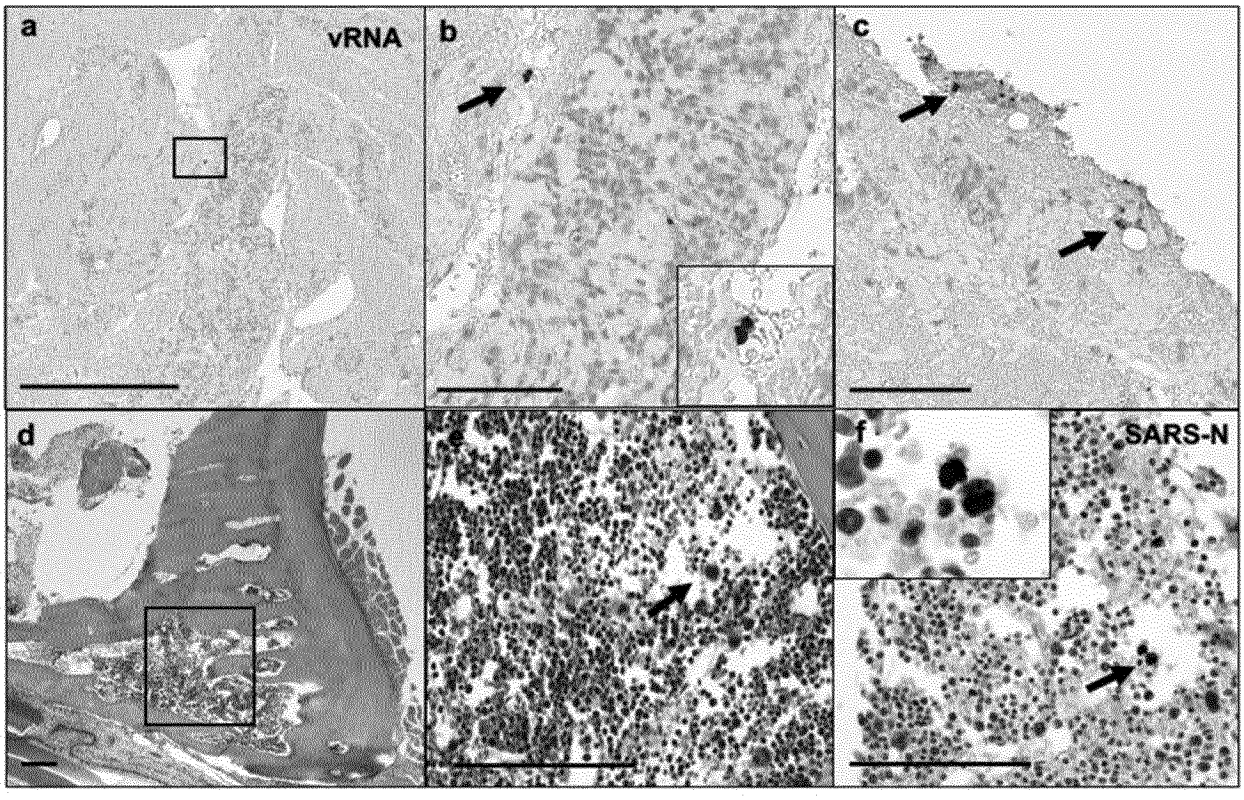
Фиг. 58A-58O



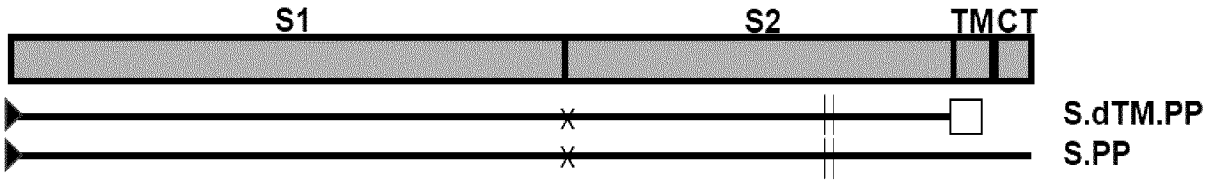
Фиг. 59A-59F



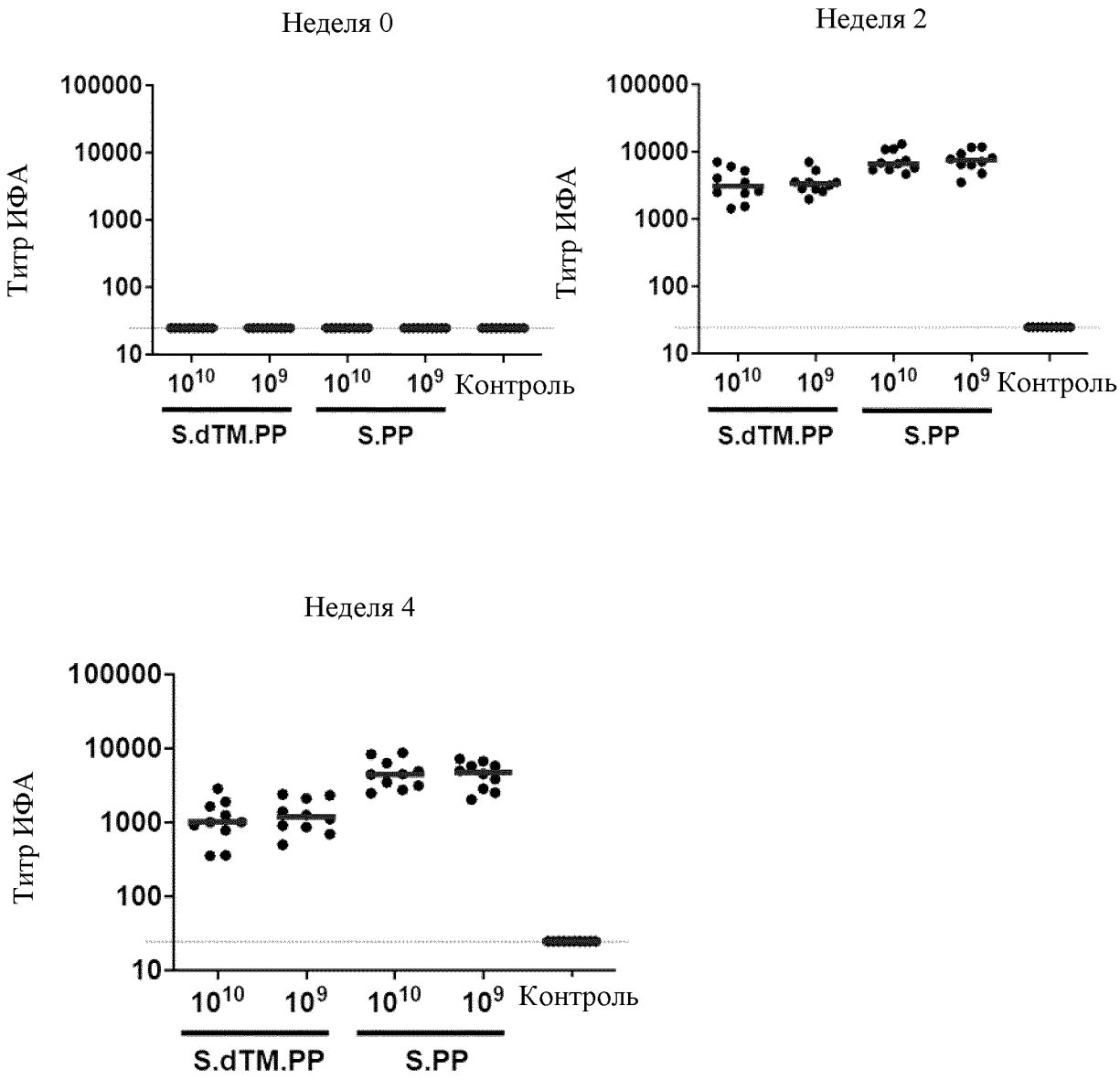
Фиг. 59G-59L



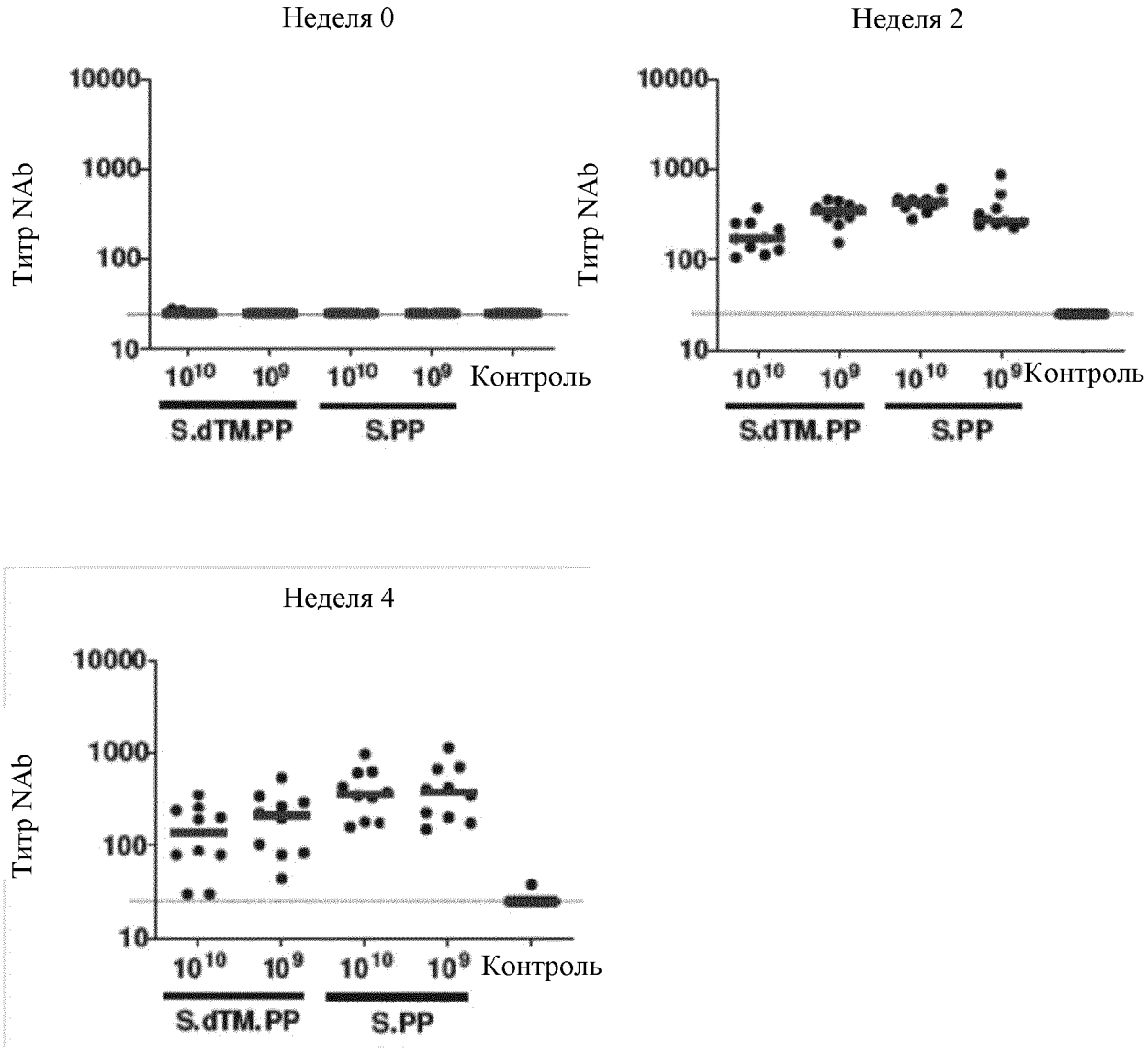
Фиг. 60A-60F



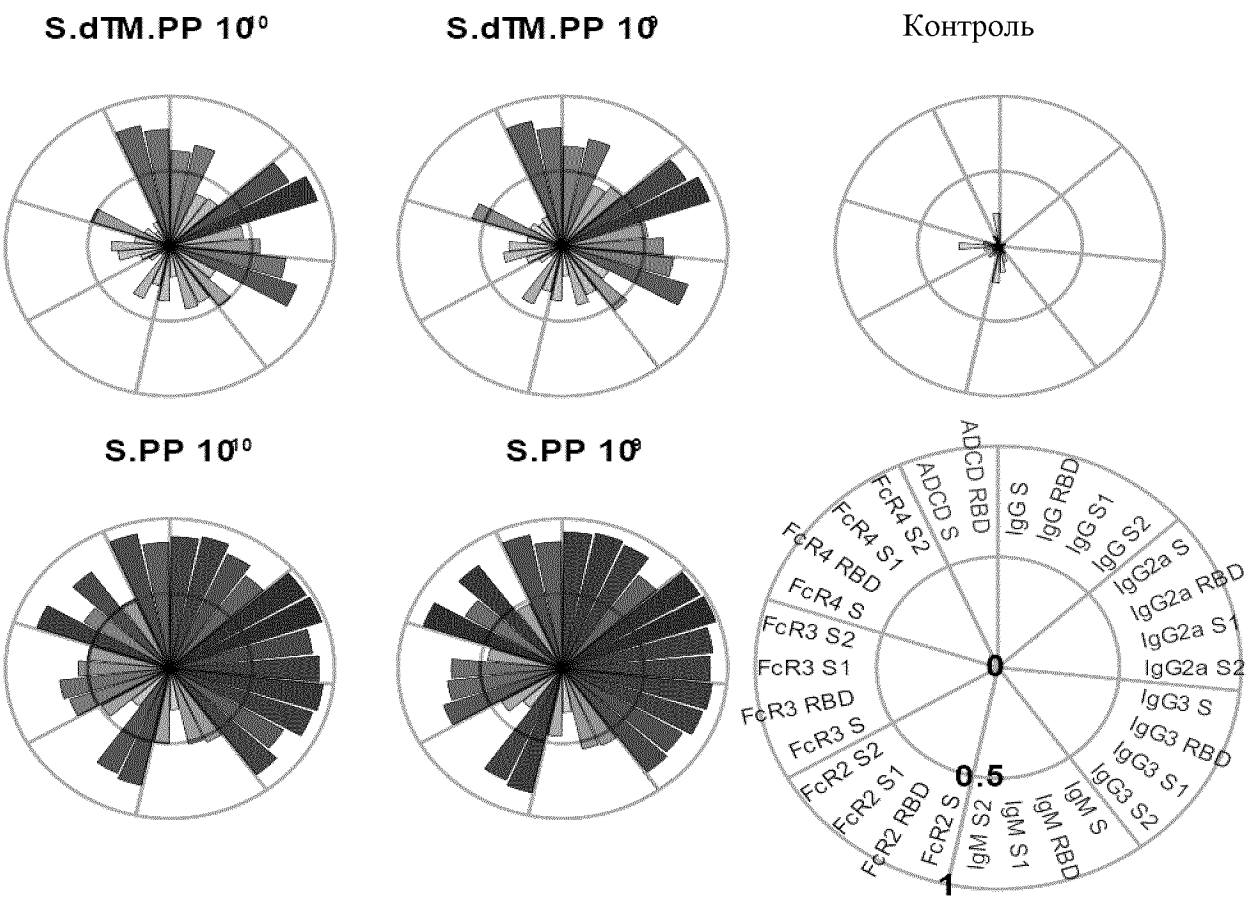
Фиг. 61A


Неделя 0
Неделя 2
Неделя 4
Титр ИФА
100000
10000
1000
100
10
10^{10}
10^{9}
Контроль
S.dTM.PP
S.PP

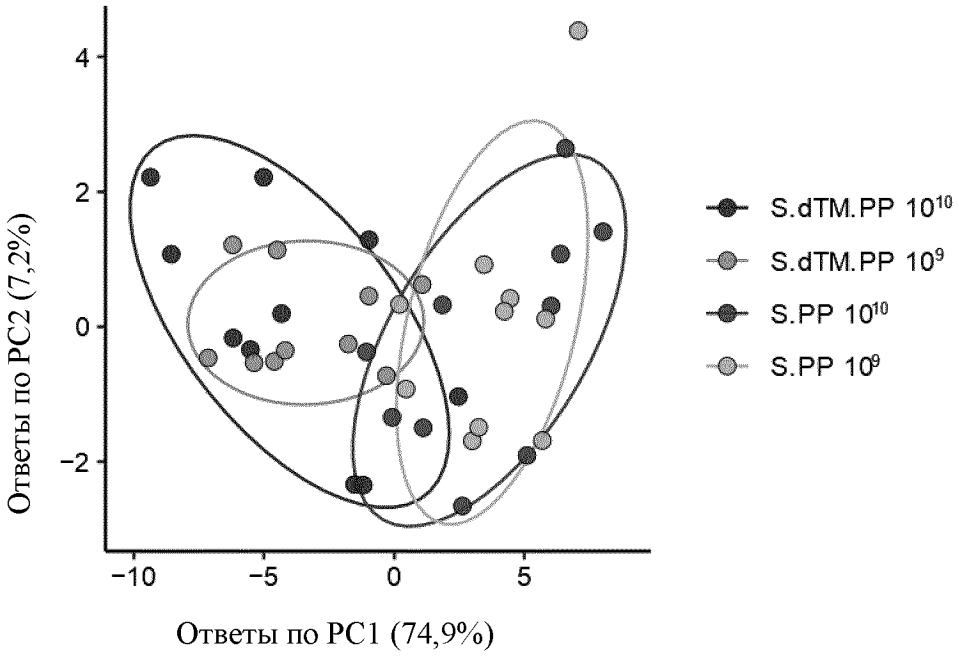
Фиг. 61B


Неделя 0
Неделя 2
Неделя 4
Титр NAb
10000
1000
100
10
10^{10}
10^{9}
Контроль
S.dTM.PP
S.PP

Фиг. 61C

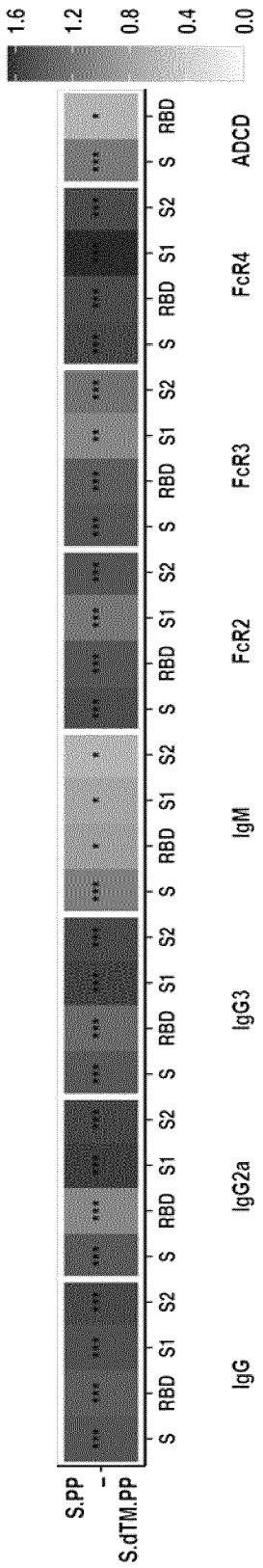


Фиг. 61D

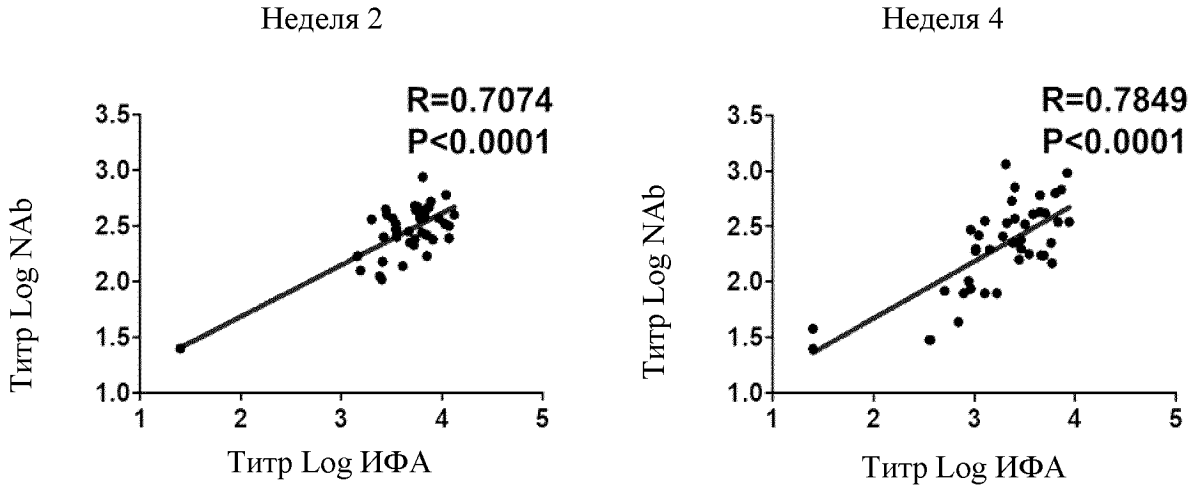


Фиг. 61E

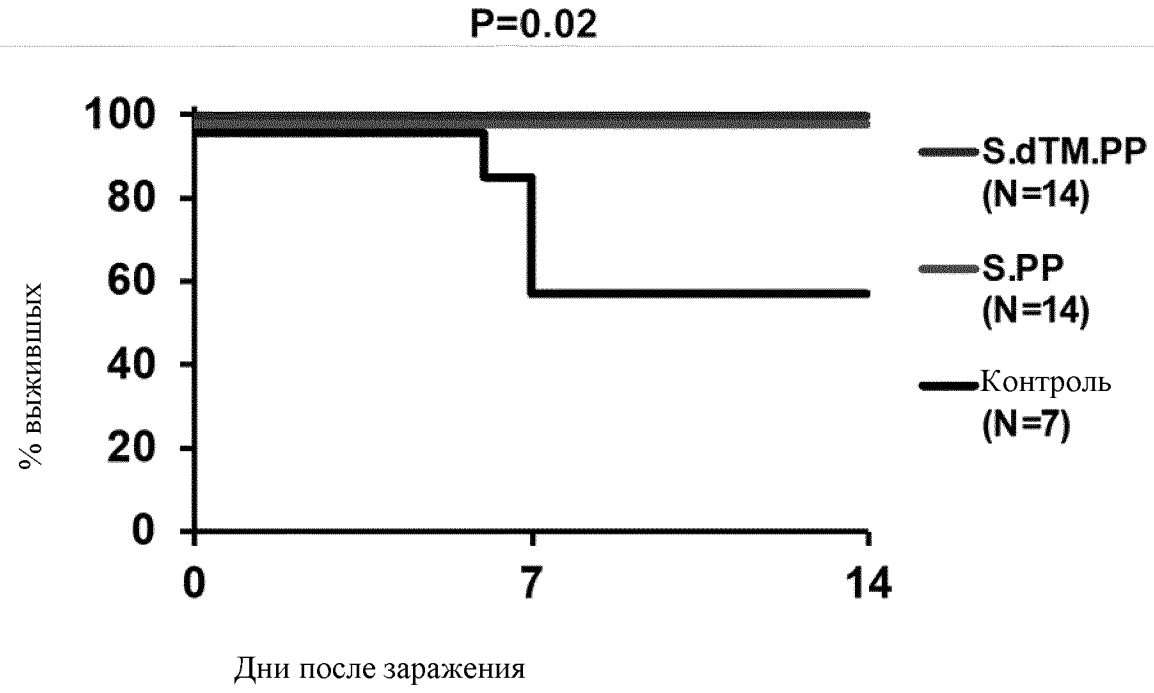
различия в средних
показателях z-значений



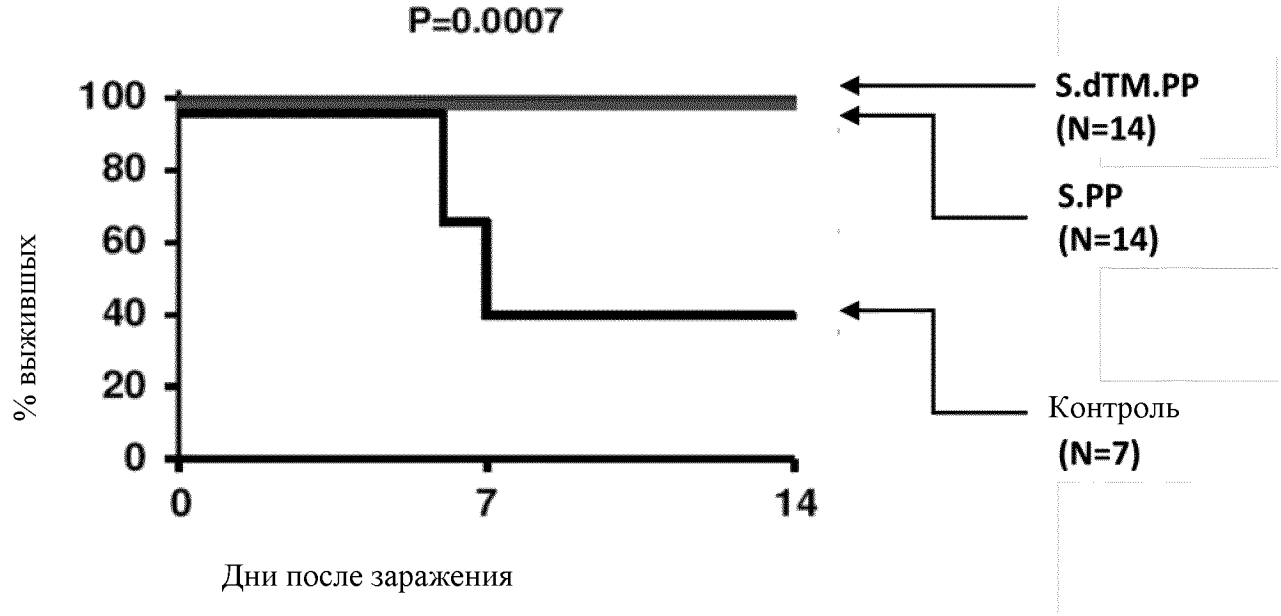
Фиг. 61F



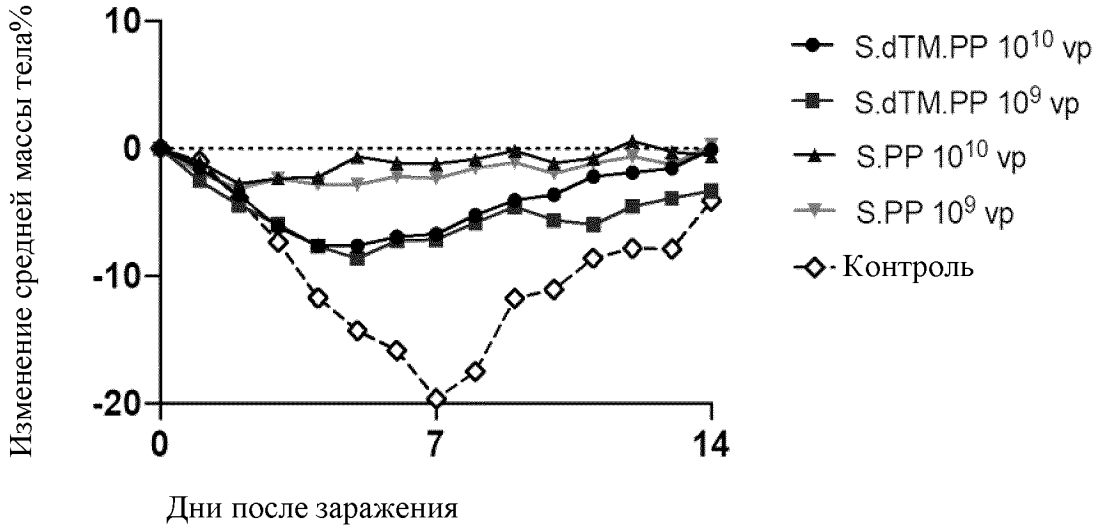
Фиг. 62A



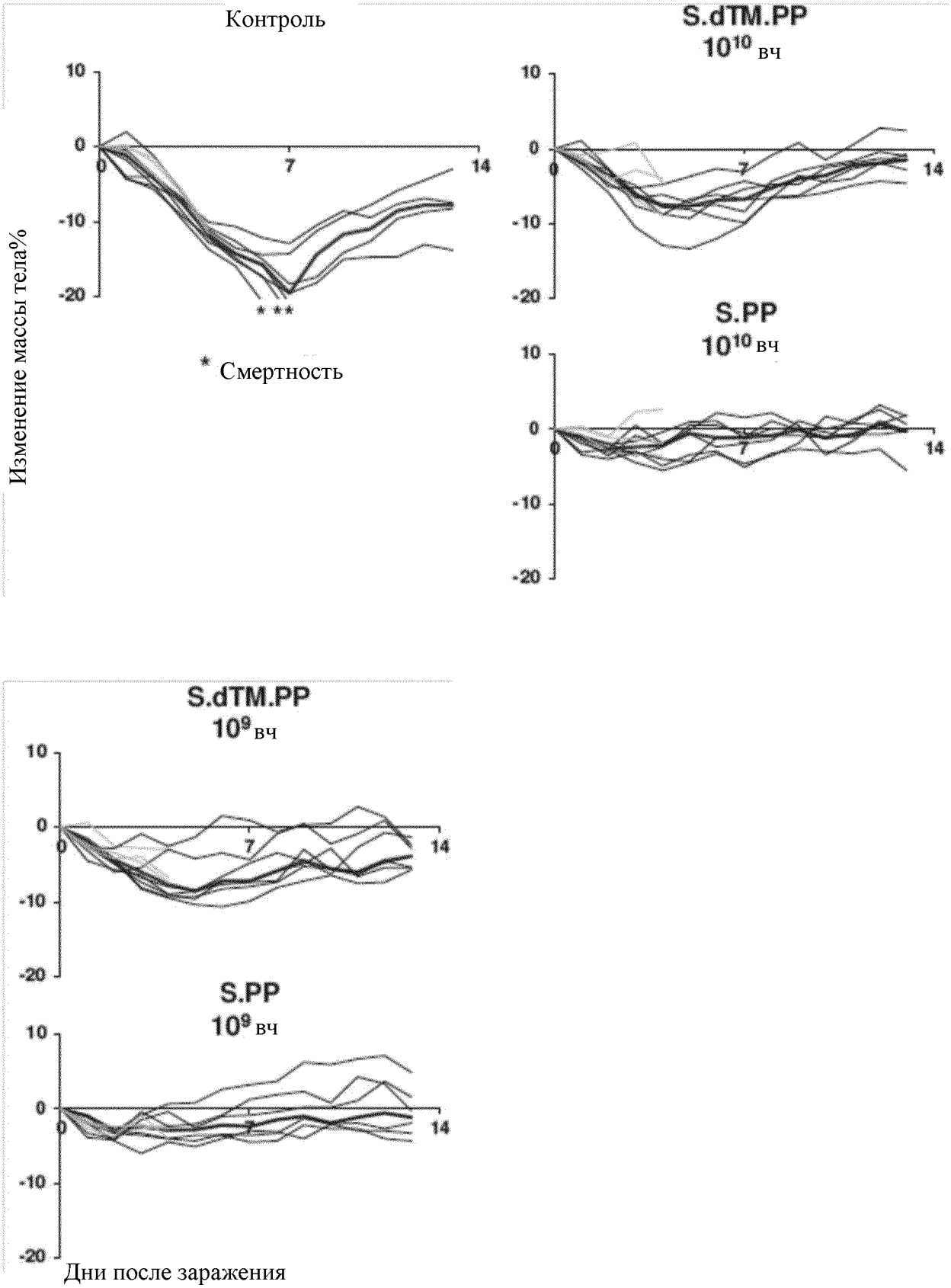
Фиг. 62B



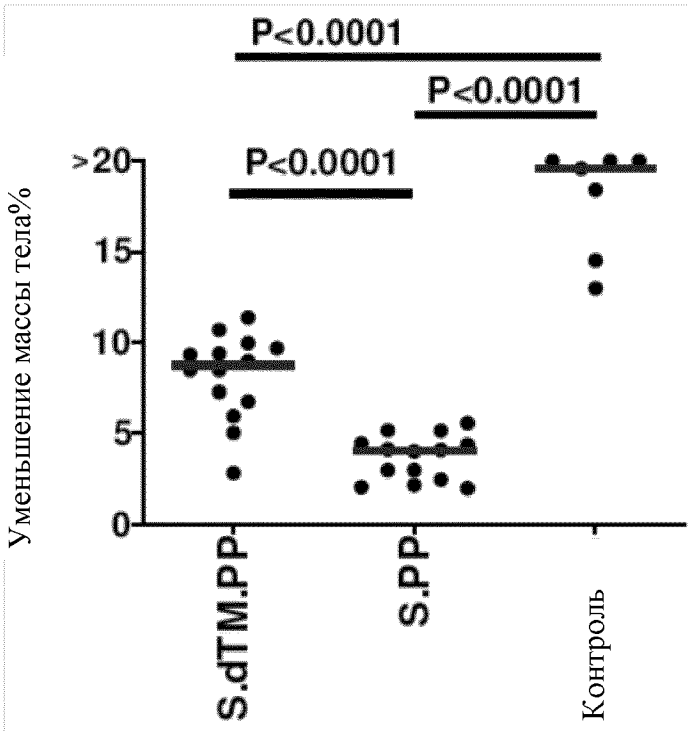
Фиг. 62C



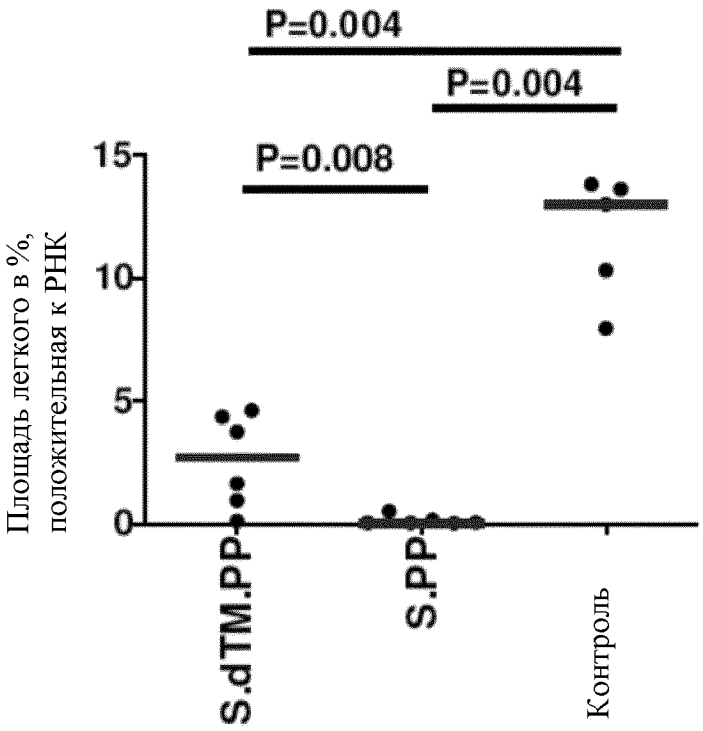
Фиг. 63A


Контроль
S.dTM.PP
10^10 вч
S.PP
10^10 вч
S.dTM.PP
10^9 вч
S.PP
10^9 вч
Изменение массы тела%
* Смертность
Дни после заражения

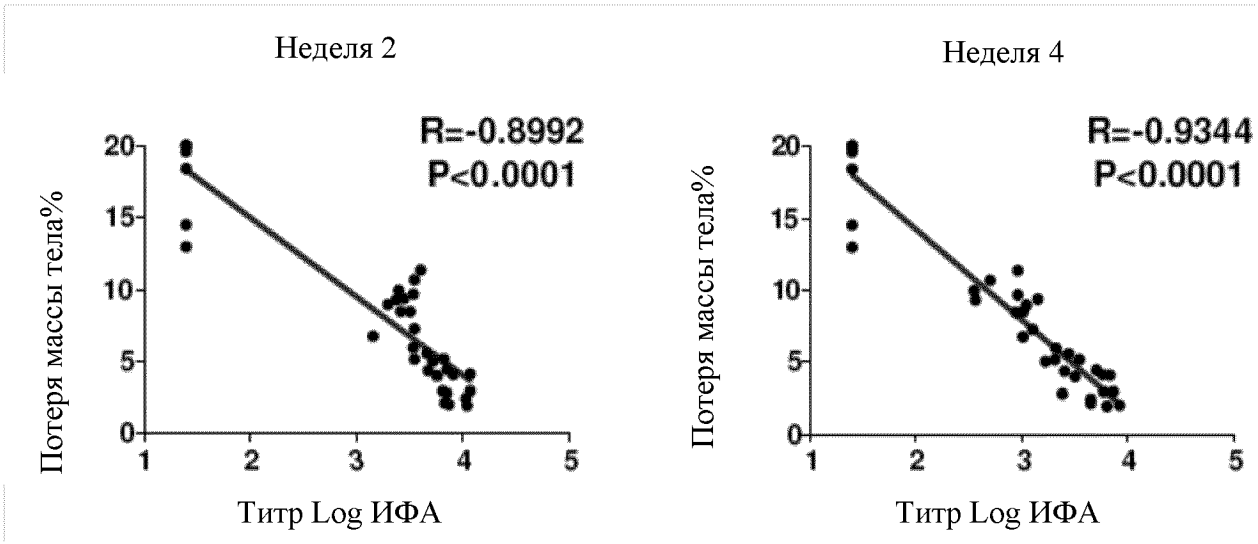
Фиг. 63B



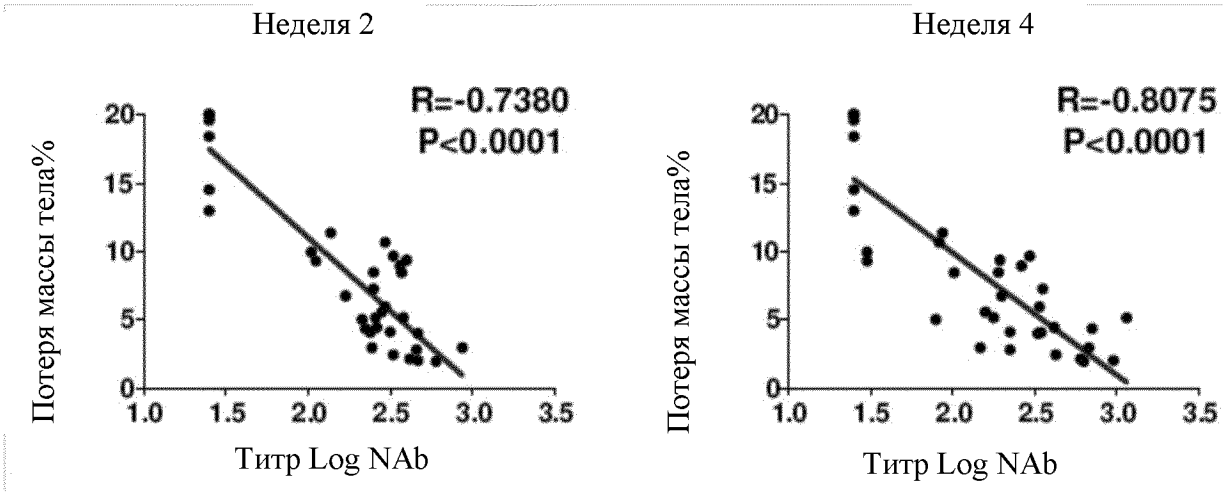
Фиг. 63C



Фиг. 63D

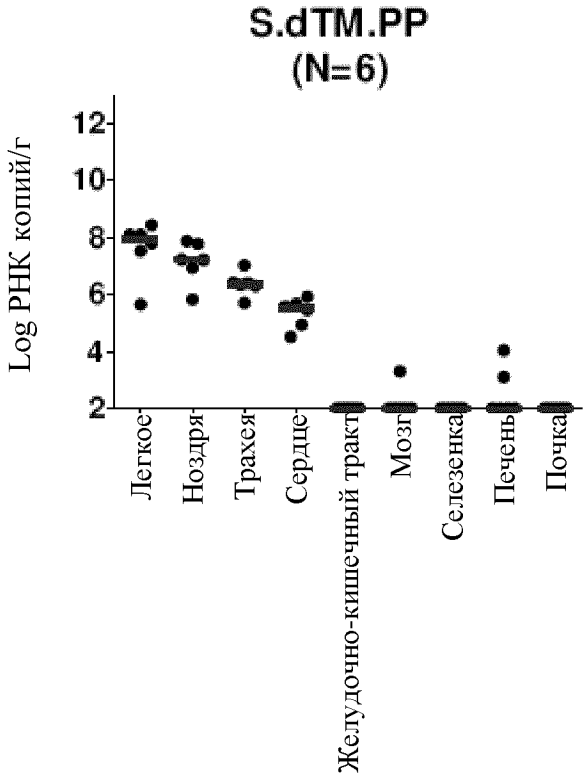


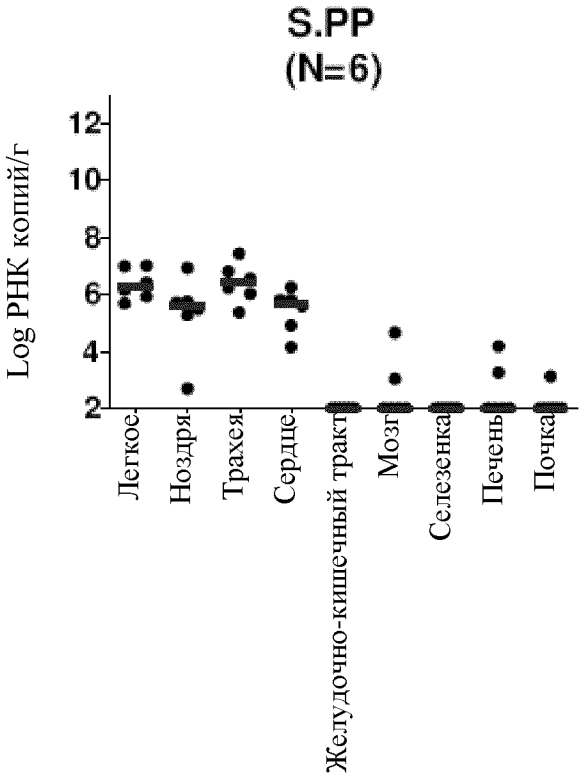
Фиг. 64A



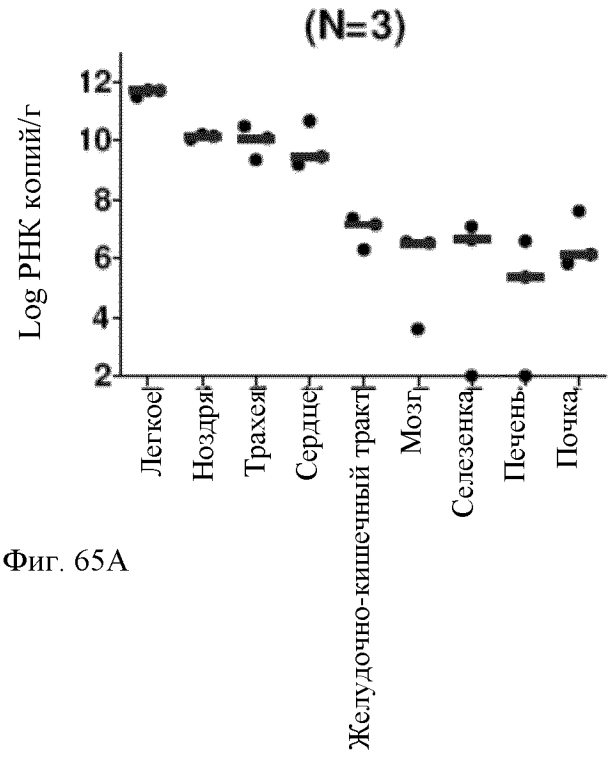
Фиг. 64B

День 4

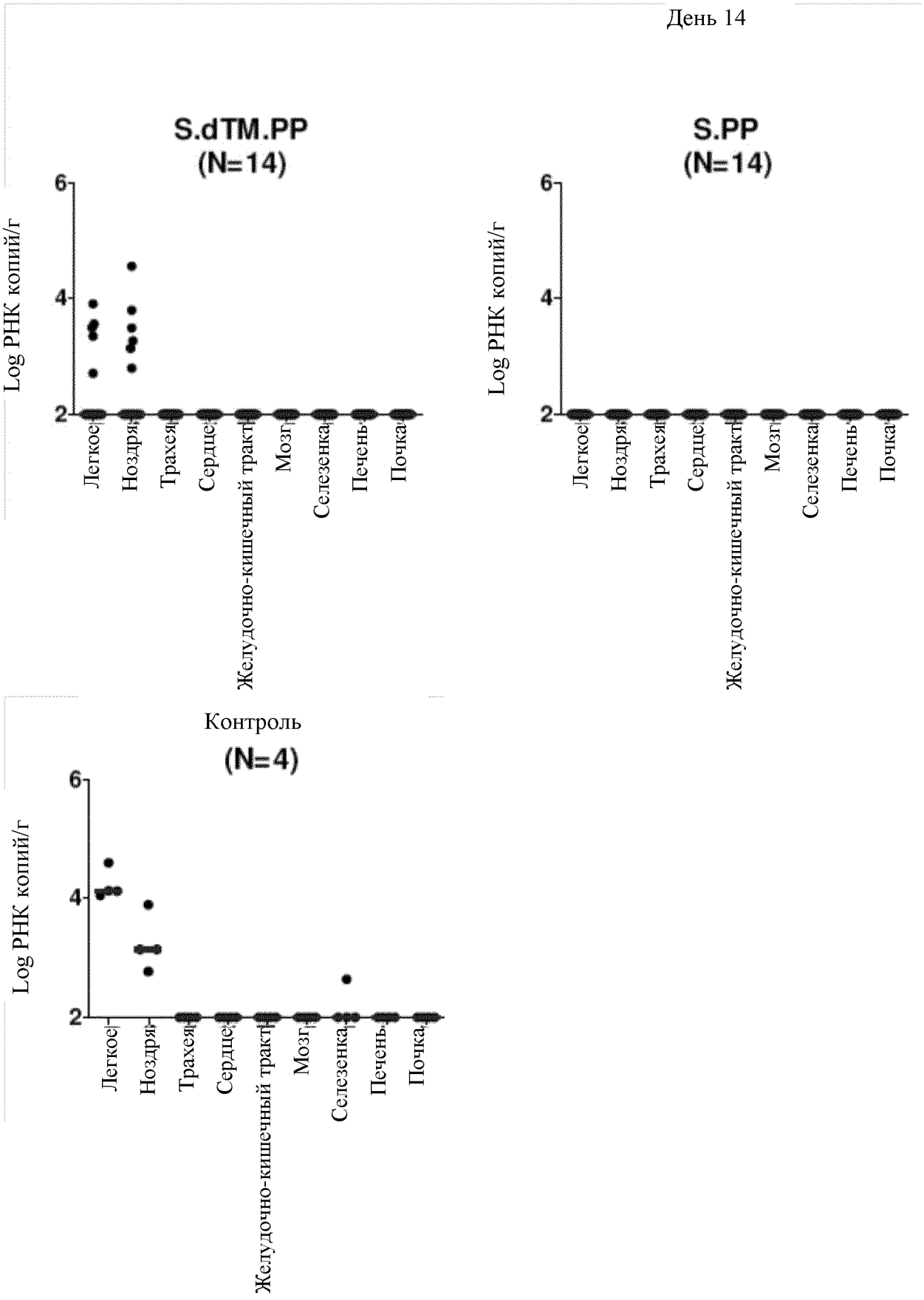




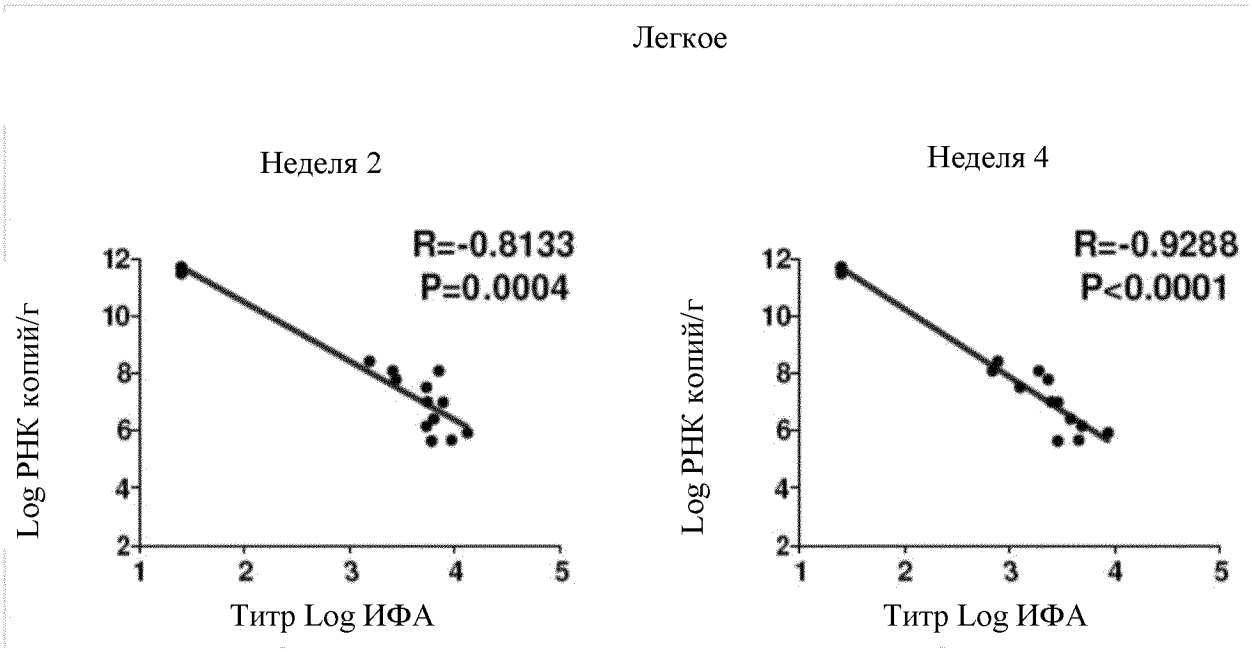
Контроль



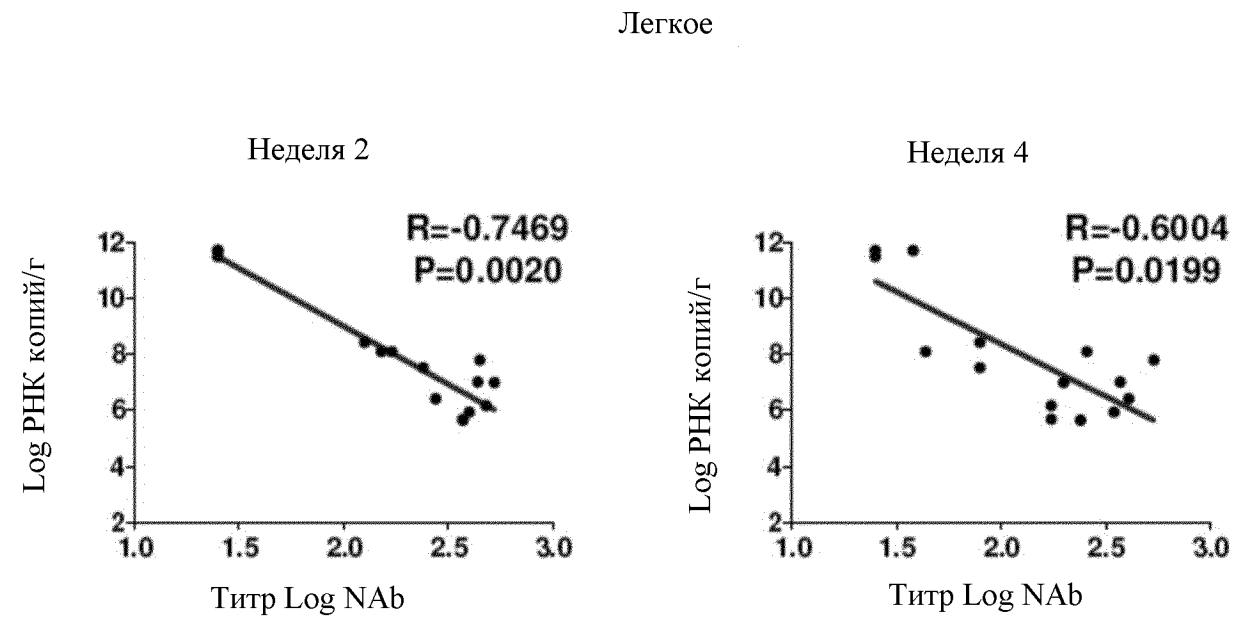
Фиг. 65А


День 14
S.dTM.PP
(N=14)
S.PP
(N=14)
Log РНК копий/г
6
4
2
Легкое
Ноздря
Трахея
Сердце
Желудочно-кишечный тракт
Мозг
Селезенка
Печень
Почка
Контроль
(N=4)

Фиг. 65B



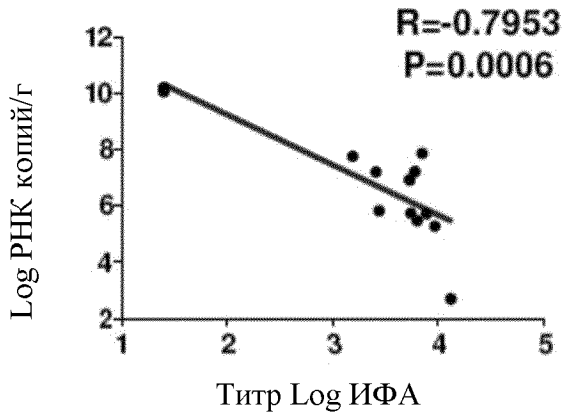
Фиг. 66A



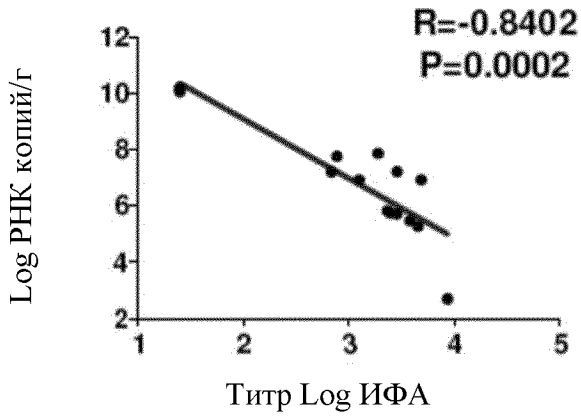
Фиг. 66B

Ноздря

Неделя 2



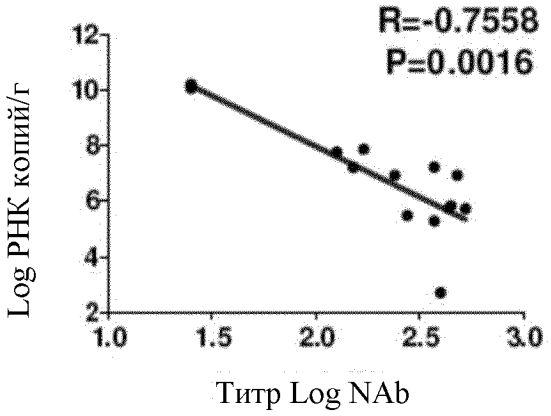
Неделя 4



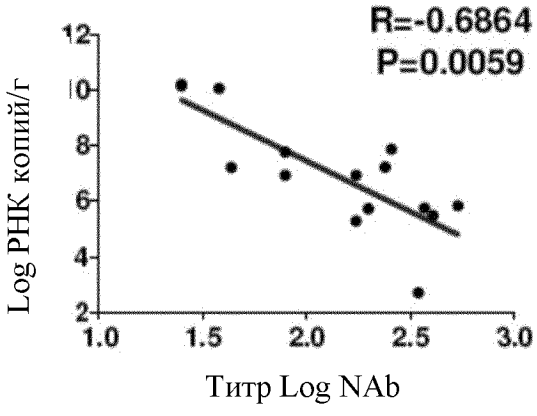
Фиг. 66C

Ноздря

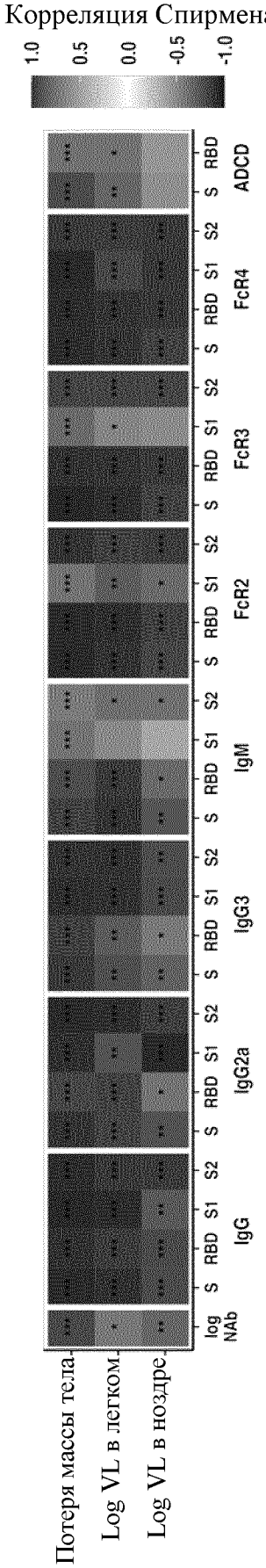
Неделя 2



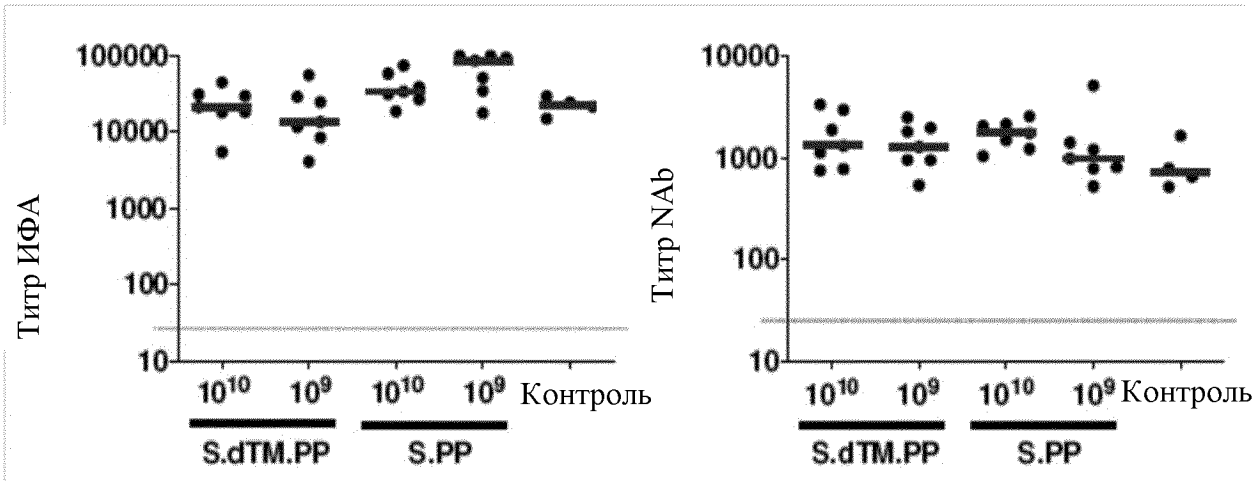
Неделя 4



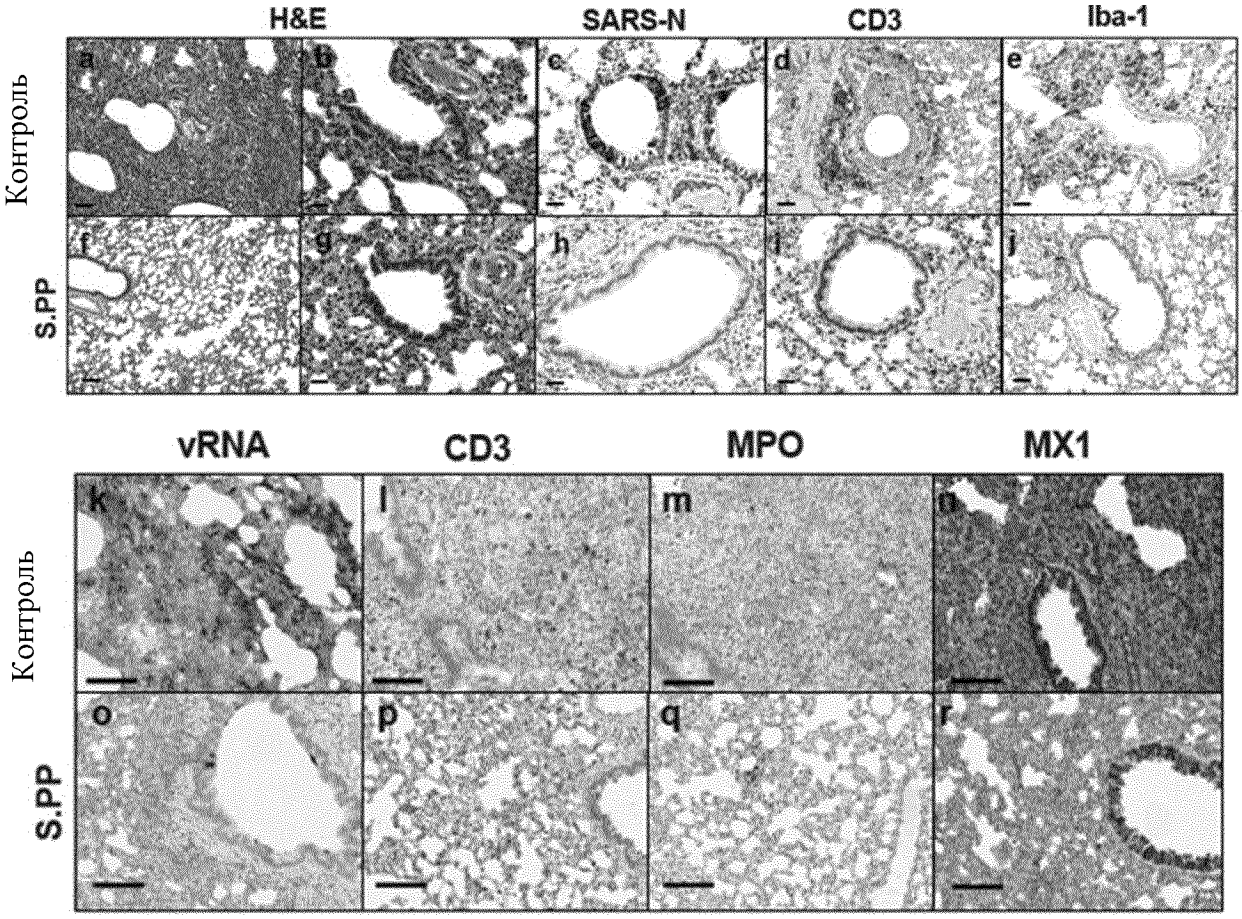
Фиг. 66D


Корреляция Спирмена
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
Потеря массы тела
Log VL в легком
Log VL в ноздре
log NAb
S
RBD
S1
S2
IgG
IgG2a
IgG3
IgM
FcR2
FcR3
FcR4
ADCD

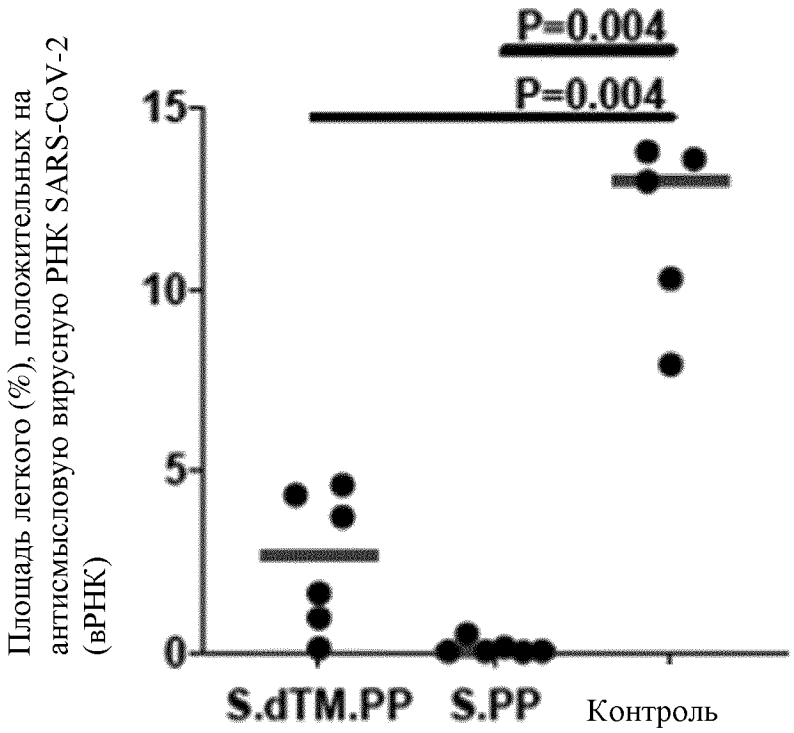
Фиг. 67A



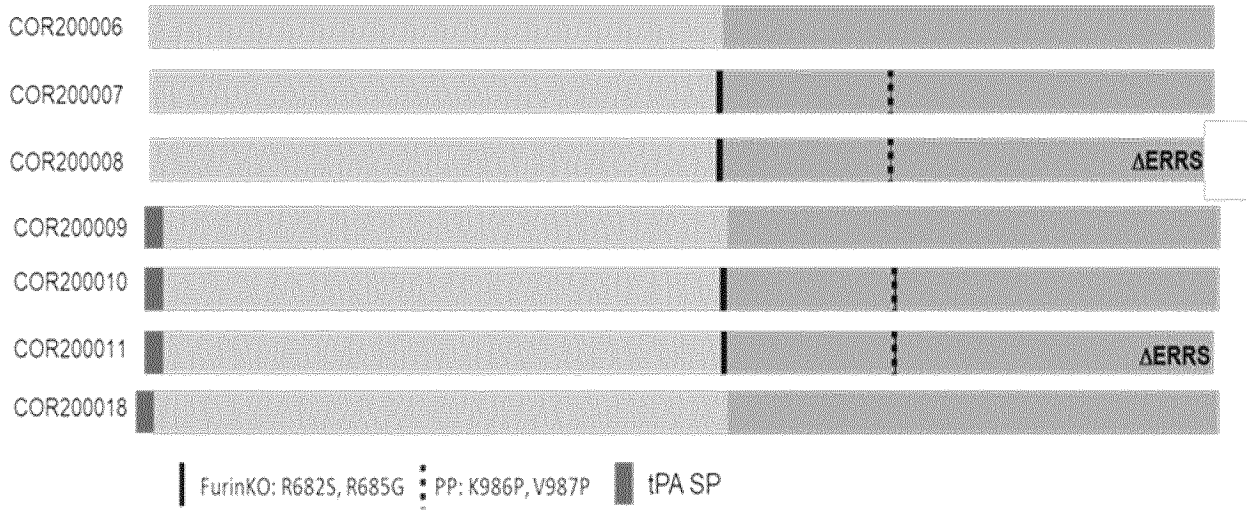
Фиг. 67B



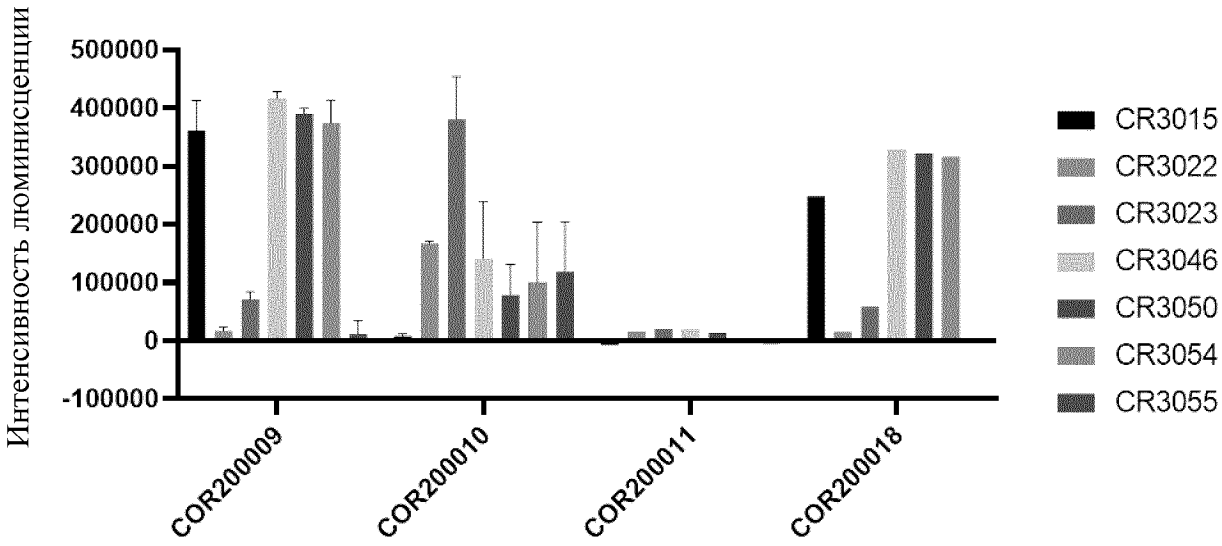
Фиг. 68A-68R


P=0.004
P=0.004
15
10
5
0
Площадь легкого (%), положительных на антисмысловую вирусную РНК SARS-CoV-2 (вРНК)
S.dTM.PP
S.PP
Контроль

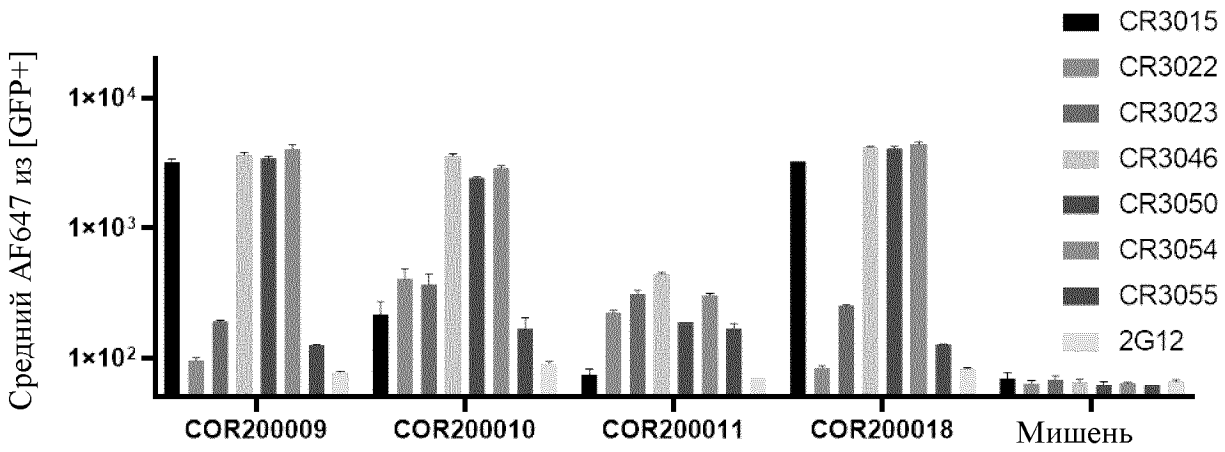
Фиг. 68S


COR200006
COR200007
COR200008
ΔERRS
COR200009
COR200010
COR200011
ΔERRS
COR200018
FurinKO: R682S, R685G
PP: K986P, V987P
tPA SP

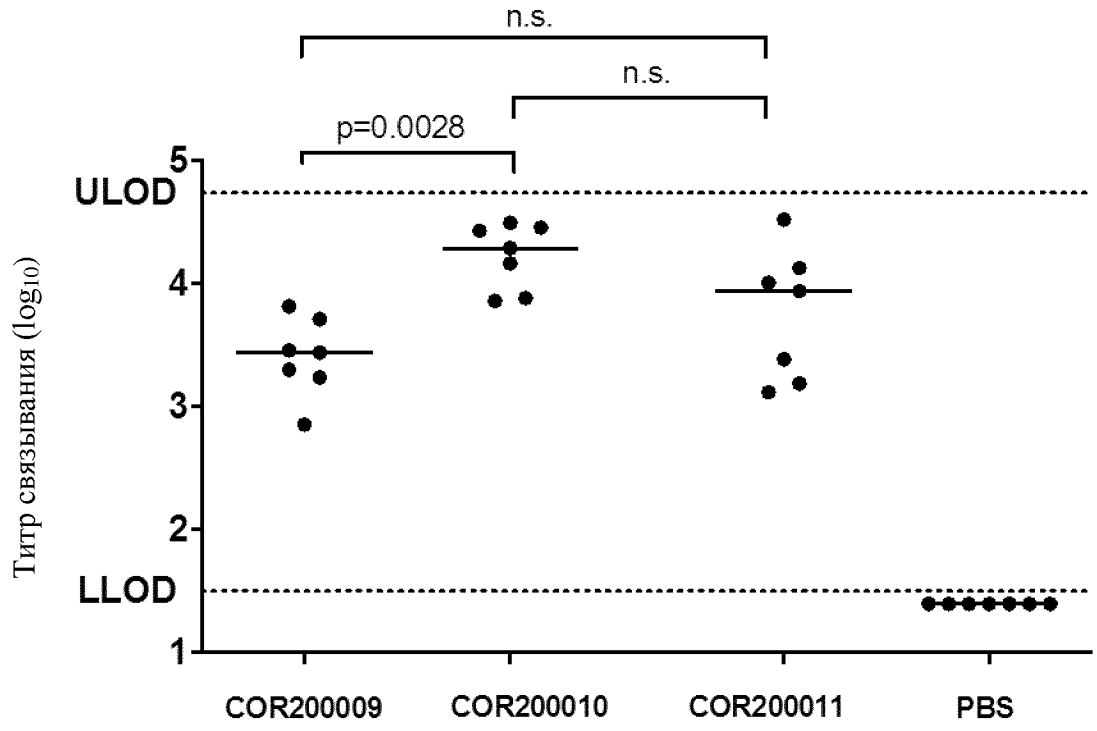
Фиг. 69


Интенсивность люминисценции
500000
400000
300000
200000
100000
0
-100000
COR200009
COR200010
COR200011
COR200018
CR3015
CR3022
CR3023
CR3046
CR3050
CR3054
CR3055

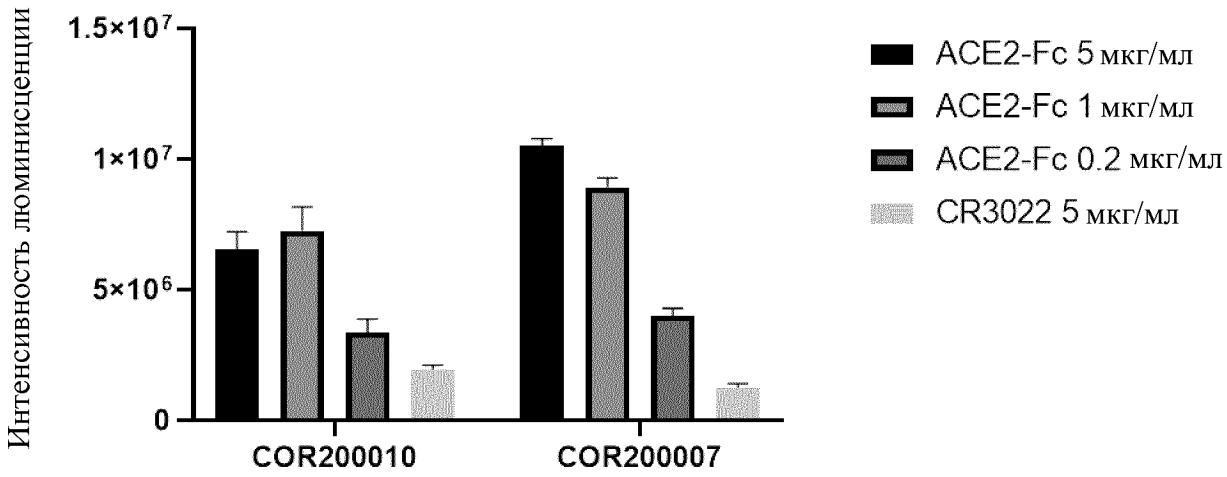
Фиг. 70


Средний AF647 из [GFP+]
1×10⁴
1×10³
1×10²
CR3015
CR3022
CR3023
CR3046
CR3050
CR3054
CR3055
2G12
COR200009
COR200010
COR200011
COR200018
Мишень

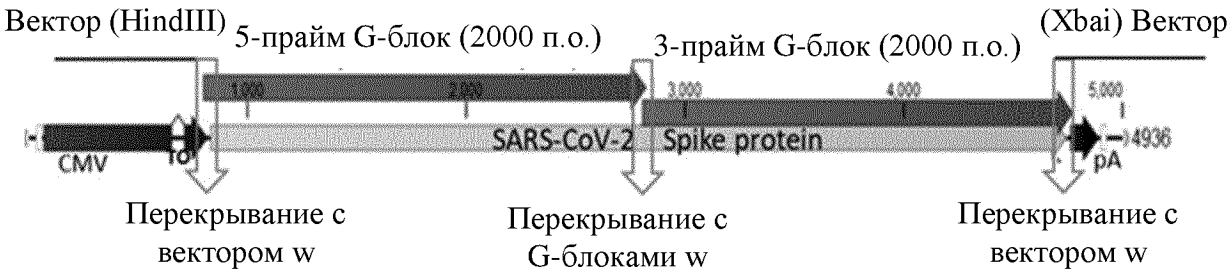
Фиг. 71


n.s.
n.s.
p=0.0028
Титр связывания (log10)
5
4
3
2
1
ULOD
LLOD
COR200009
COR200010
COR200011
PBS

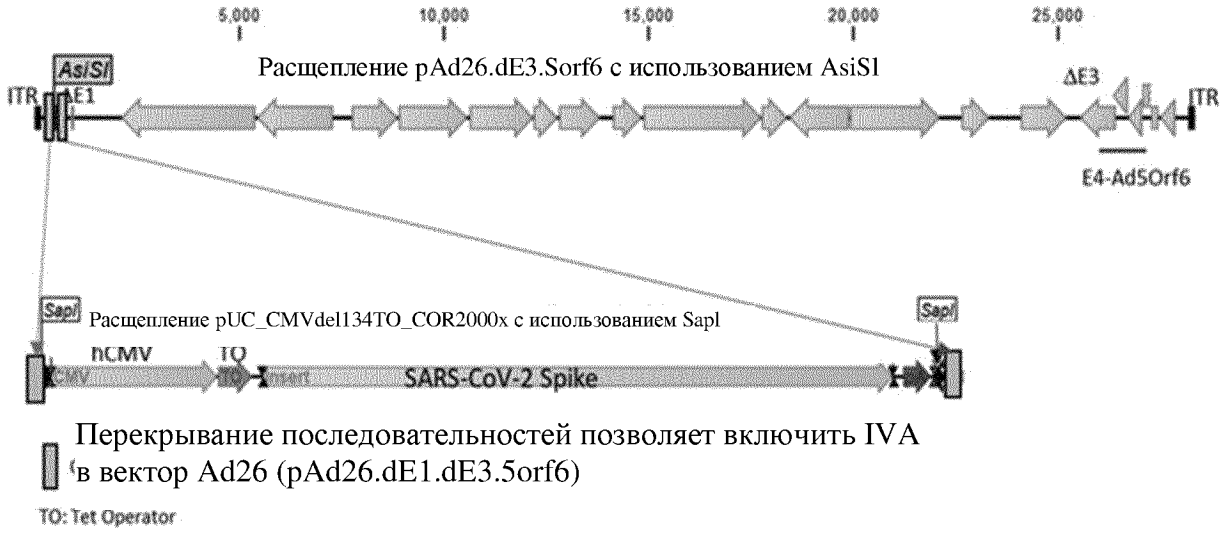
Фиг. 72



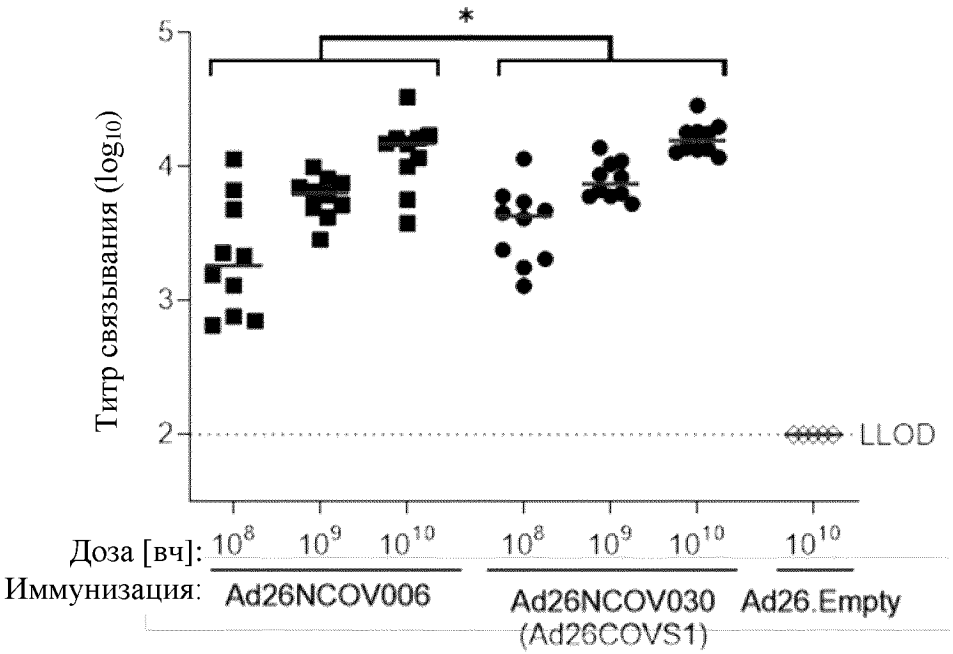
Фиг. 73



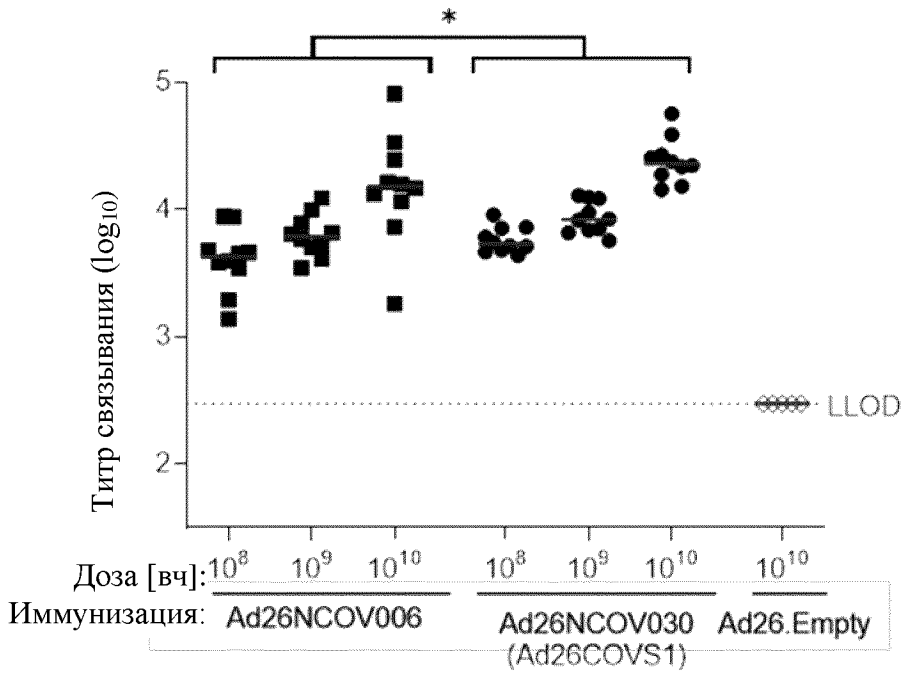
Фиг. 74



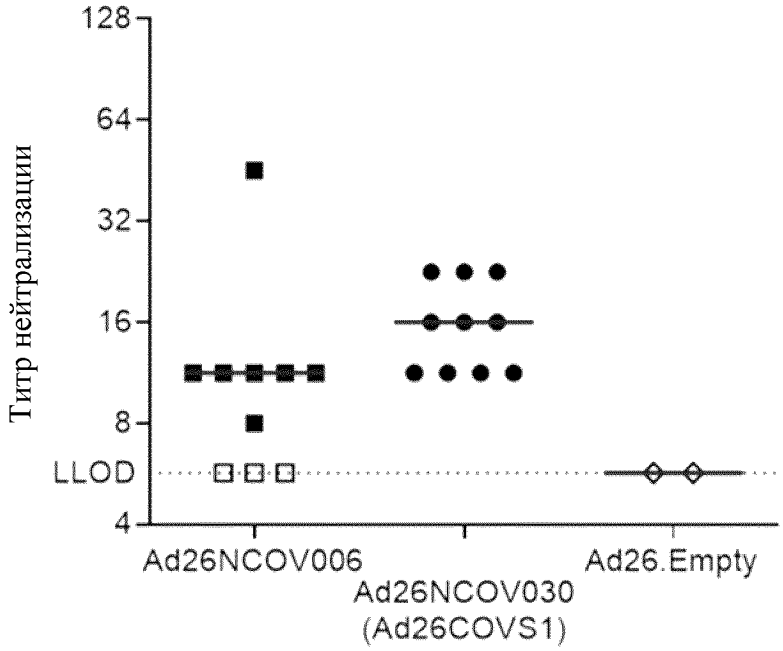
Фиг. 75



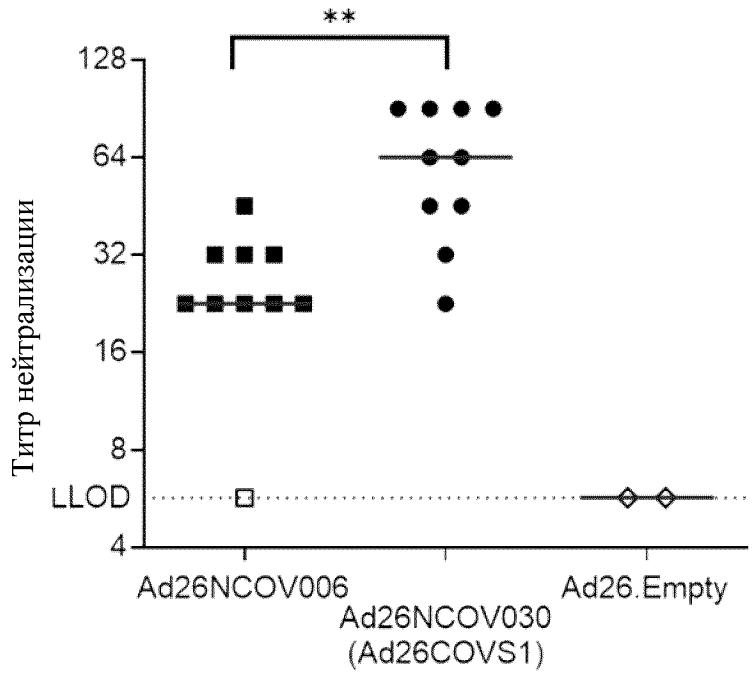
Фиг. 76A



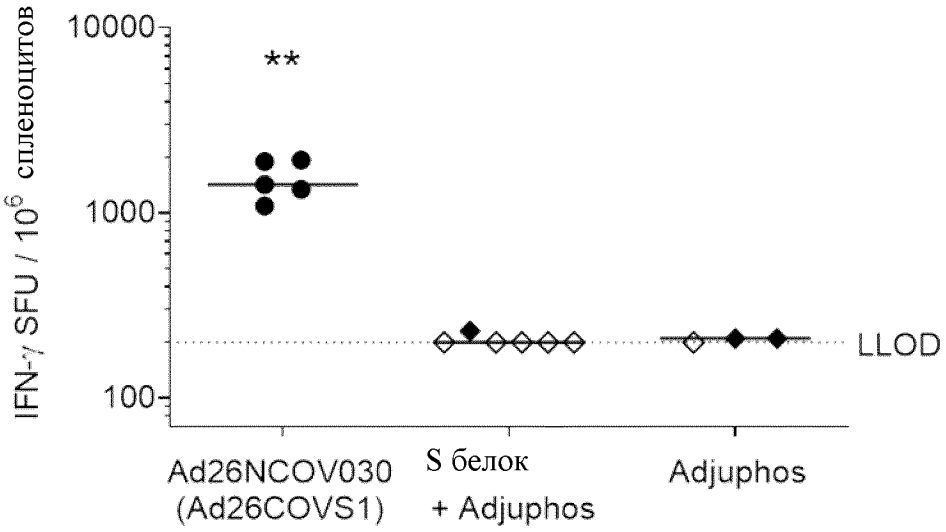
Фиг. 76B



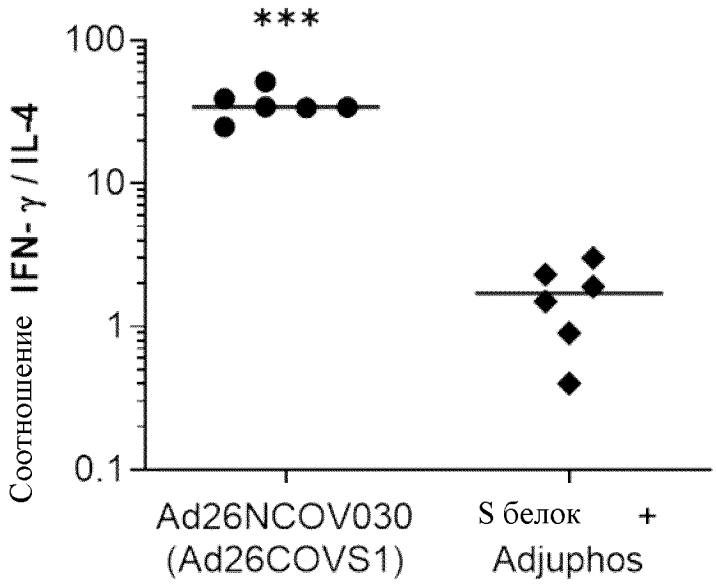
Фиг. 77A



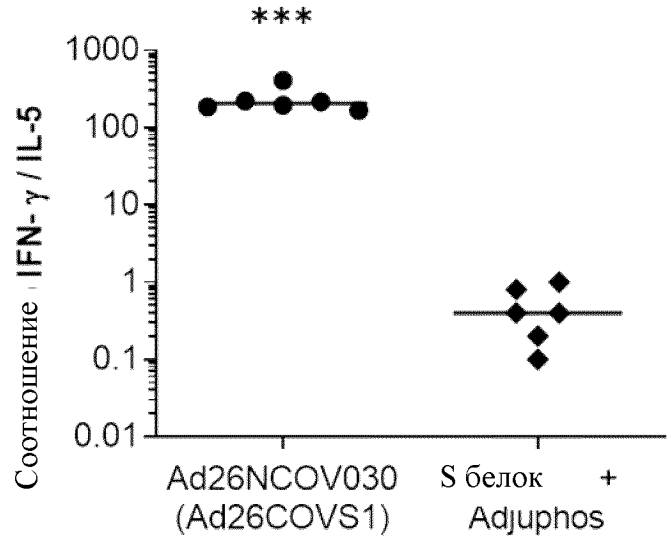
Фиг. 77B



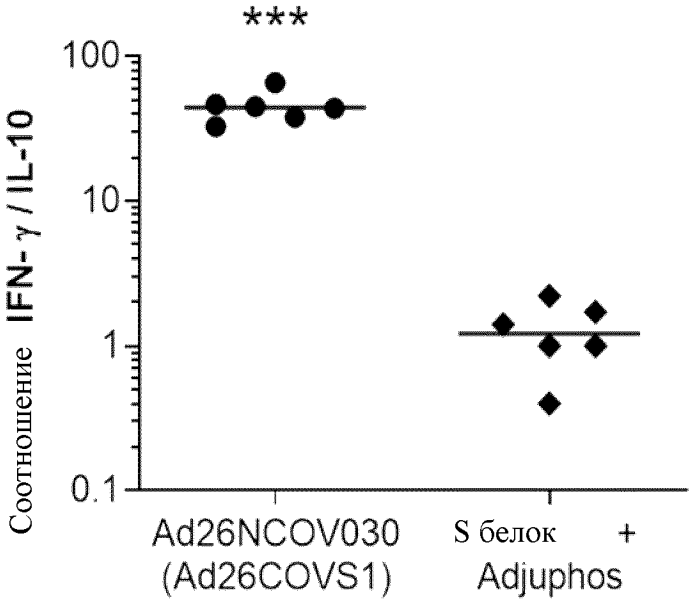
Фиг. 78



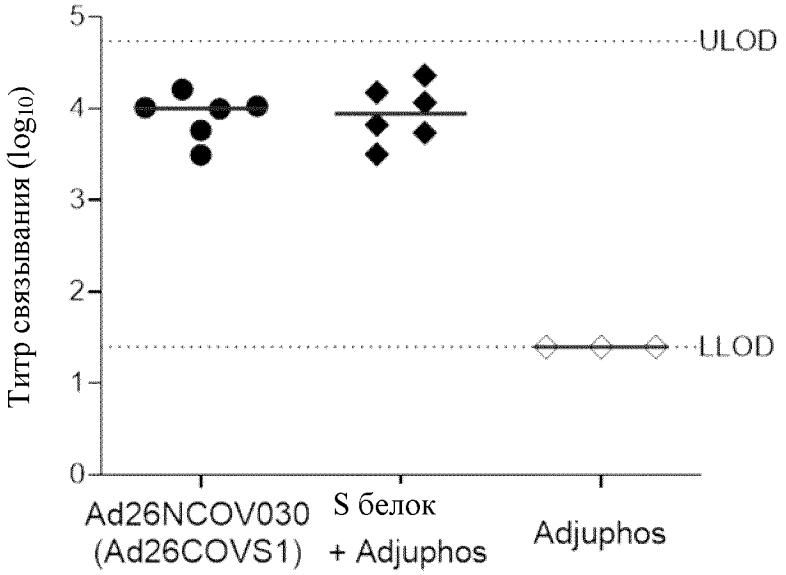
Фиг. 79A



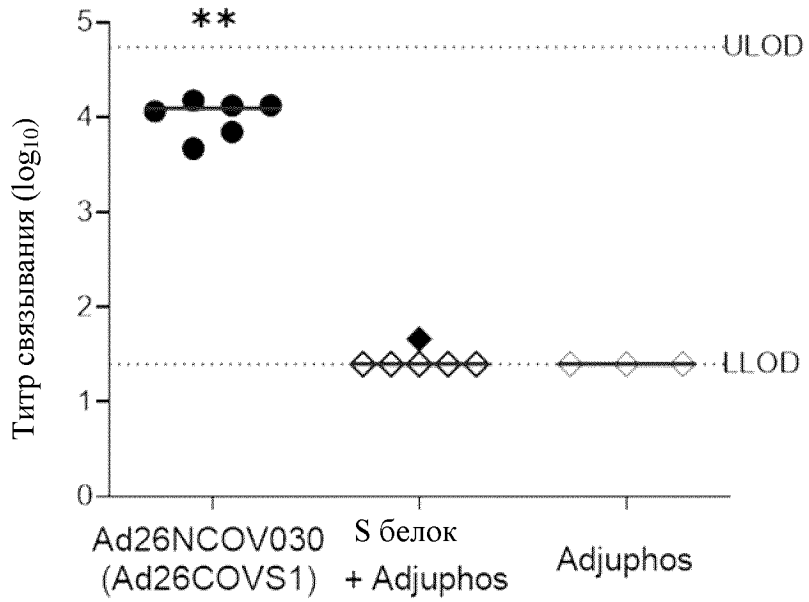
Фиг. 79B



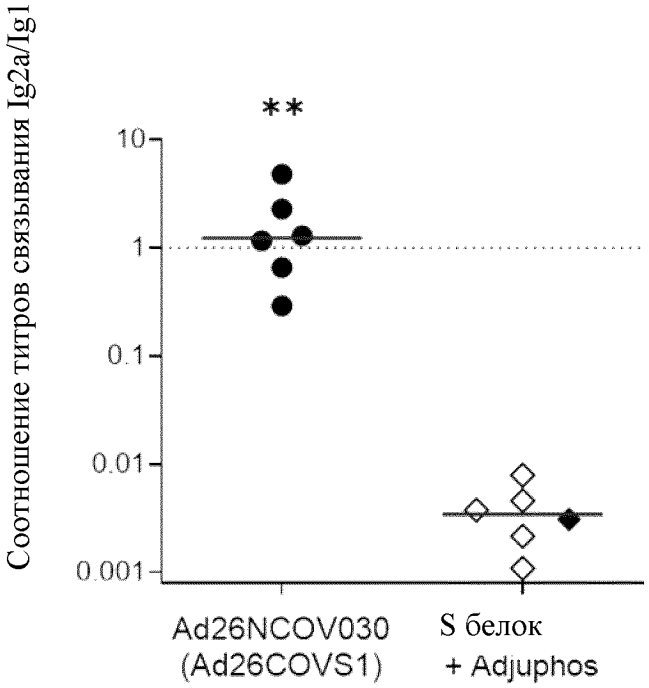
Фиг. 79C



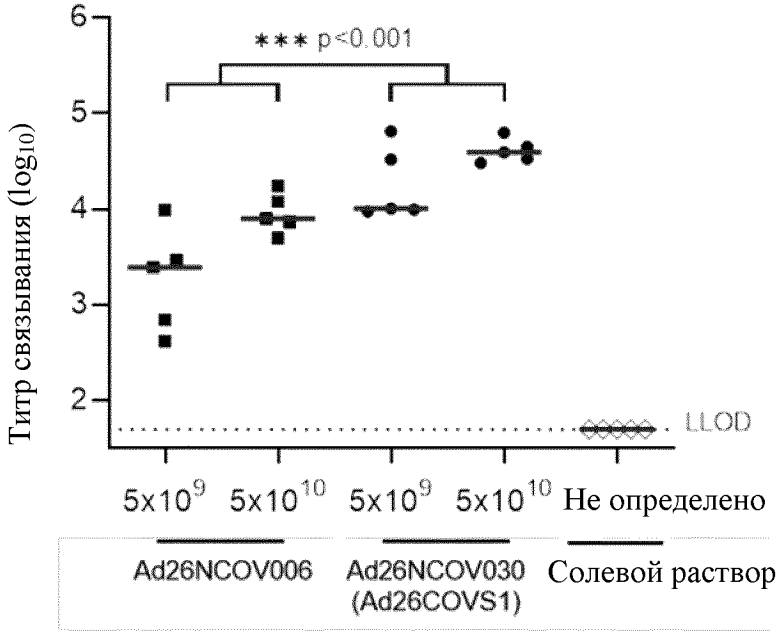
Фиг. 80A



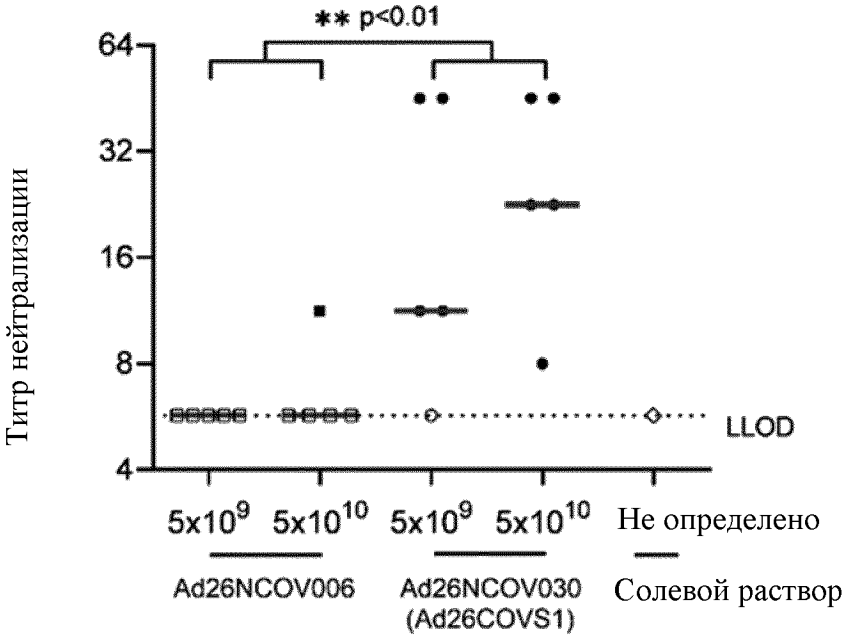
Фиг. 80B



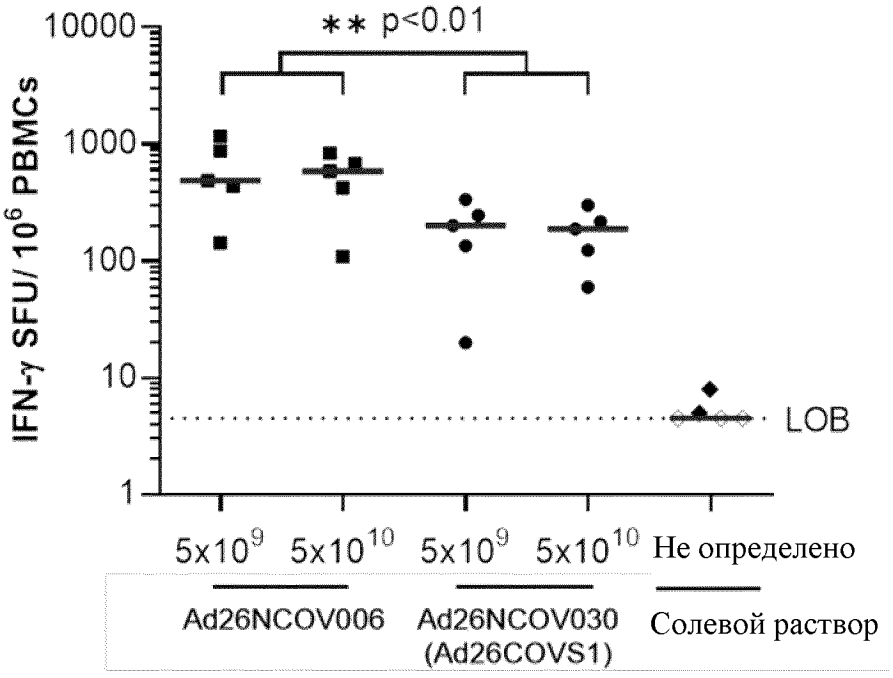
Фиг. 80C



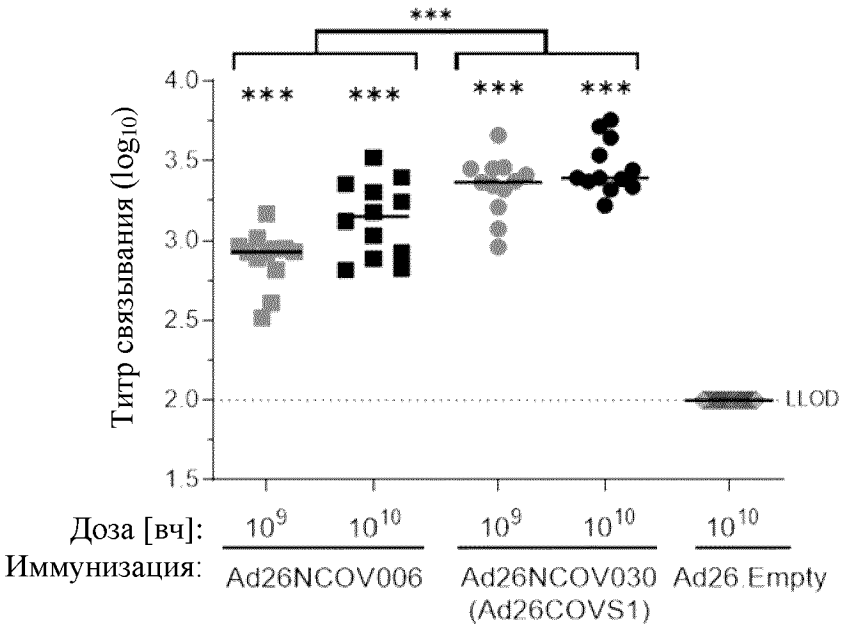
Фиг. 81A



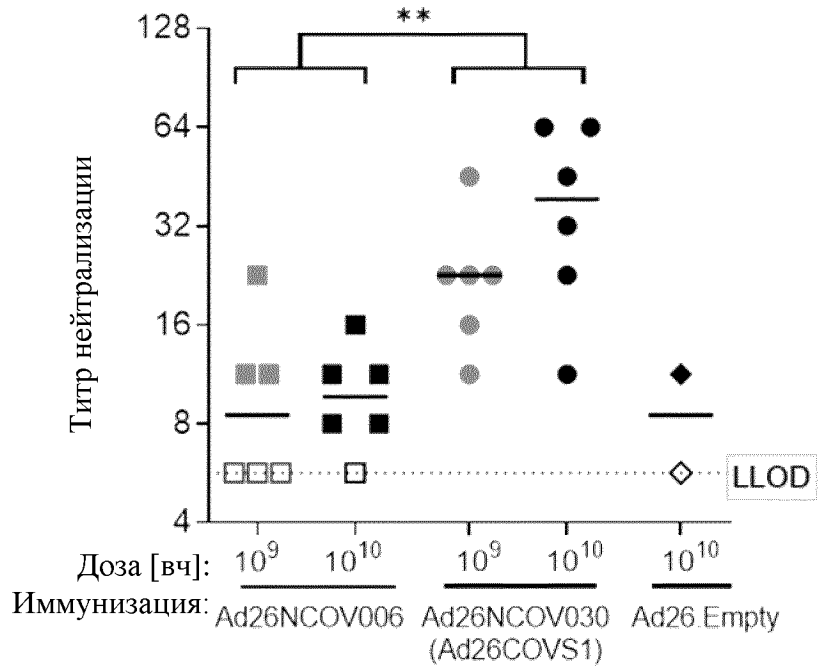
Фиг. 81B



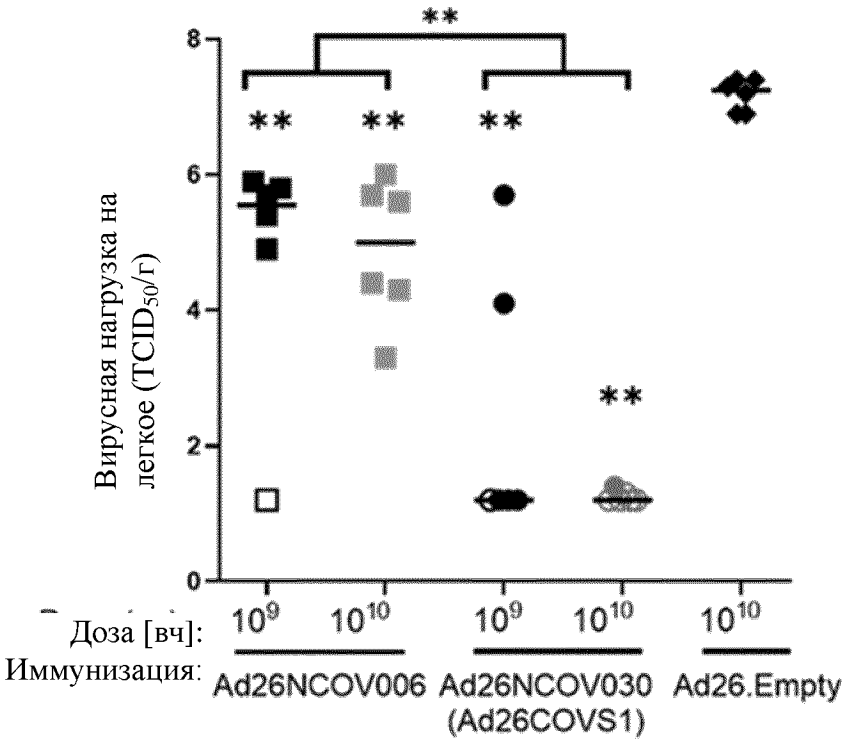
Фиг. 82



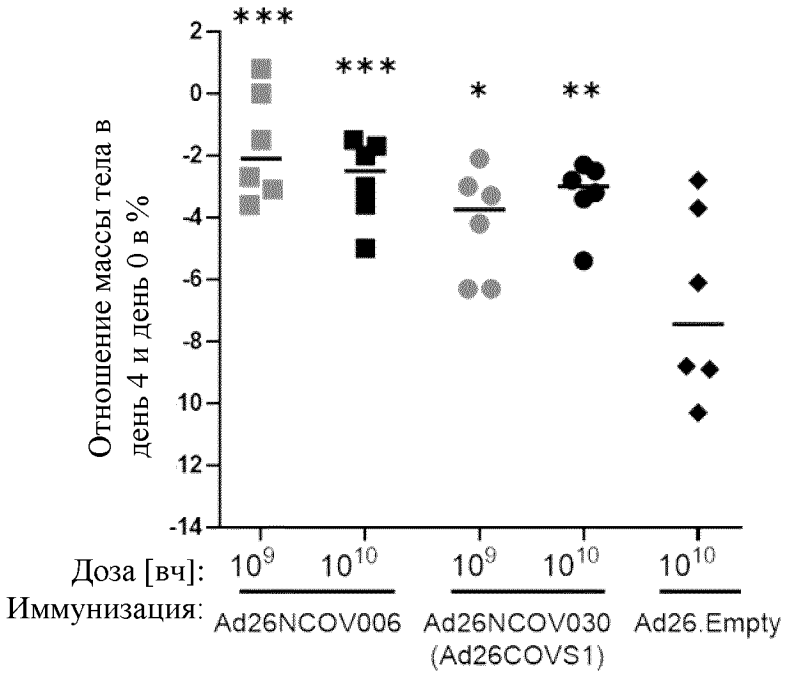
Фиг. 83A



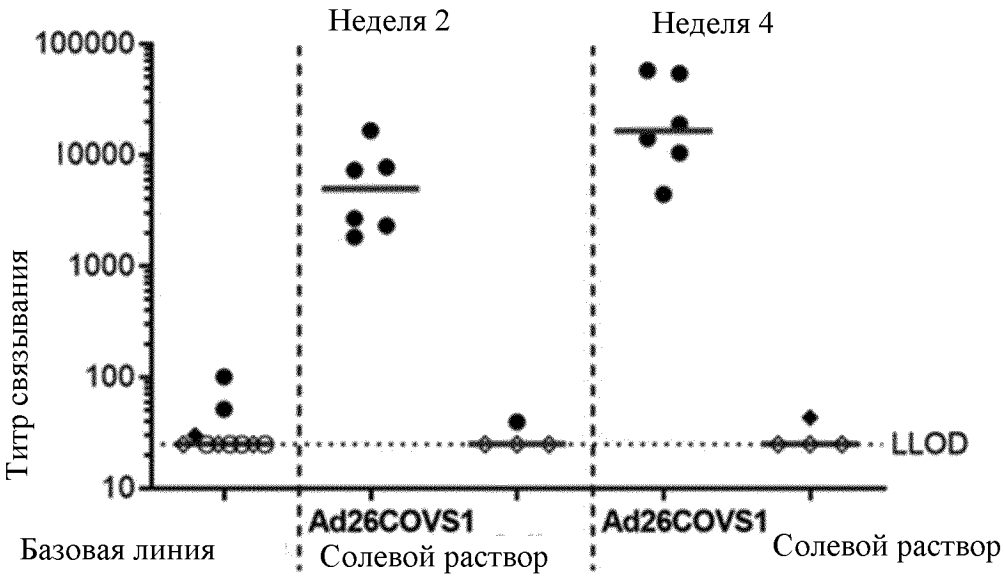
Фиг. 83B


**
**
**
**
**
**
8
6
4
2
0
Вирусная нагрузка на легкое (TCID50/г)
Доза [вч]:
10^9
10^10
10^9
10^10
10^10
Иммунизация:
Ad26NCOV006
Ad26NCOV030 (Ad26COVS1)
Ad26.Empty

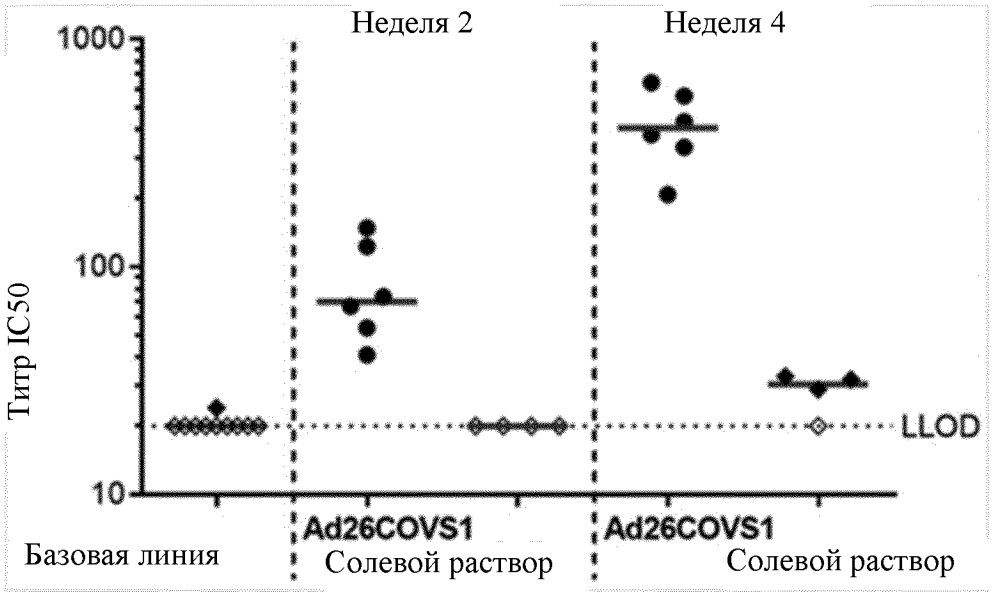
Фиг. 84


***
***
*
**
2
0
-2
-4
-6
-8
10
12
-14
Отношение массы тела в день 4 и день 0 в %
Доза [вч]:
10^9
10^10
10^9
10^10
10^10
Иммунизация:
Ad26NCOV006
Ad26NCOV030 (Ad26COVS1)
Ad26.Empty

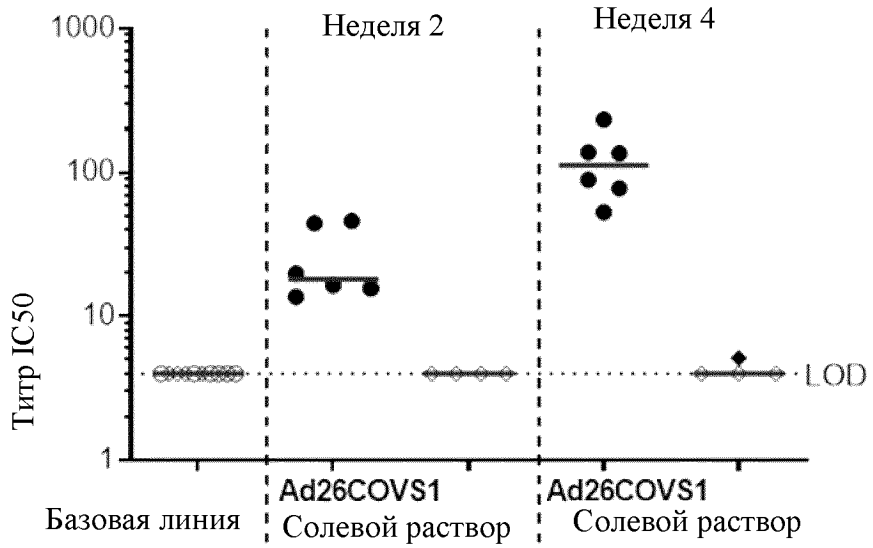
Фиг. 85



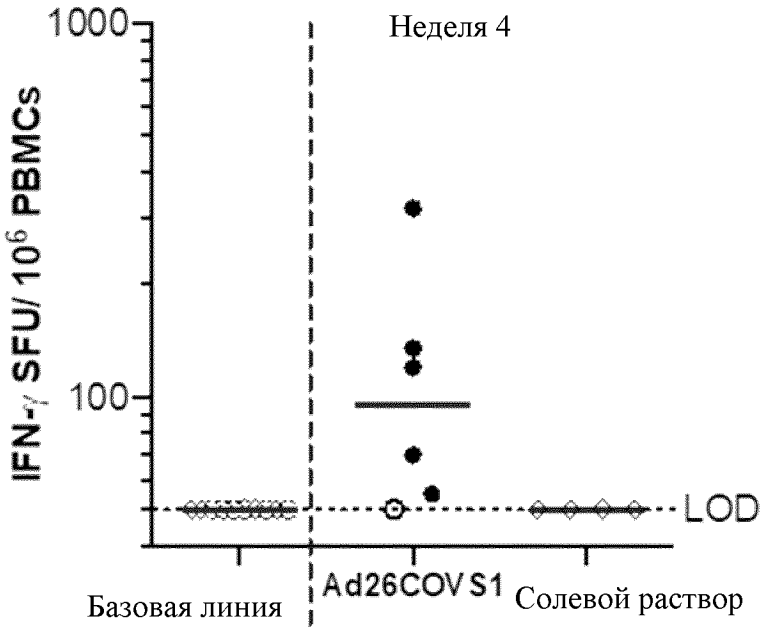
Фиг. 86A



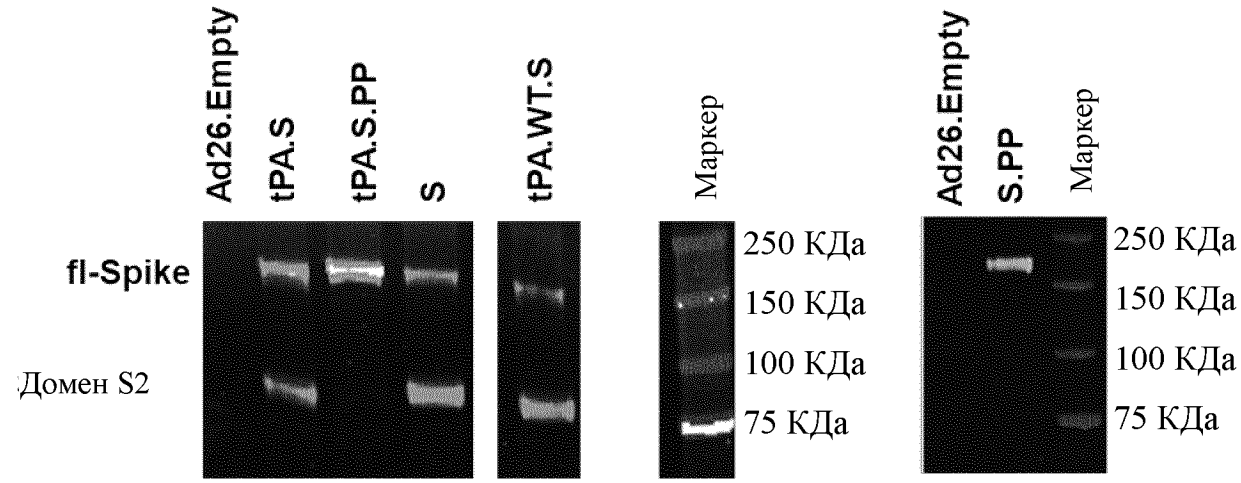
Фиг. 86B



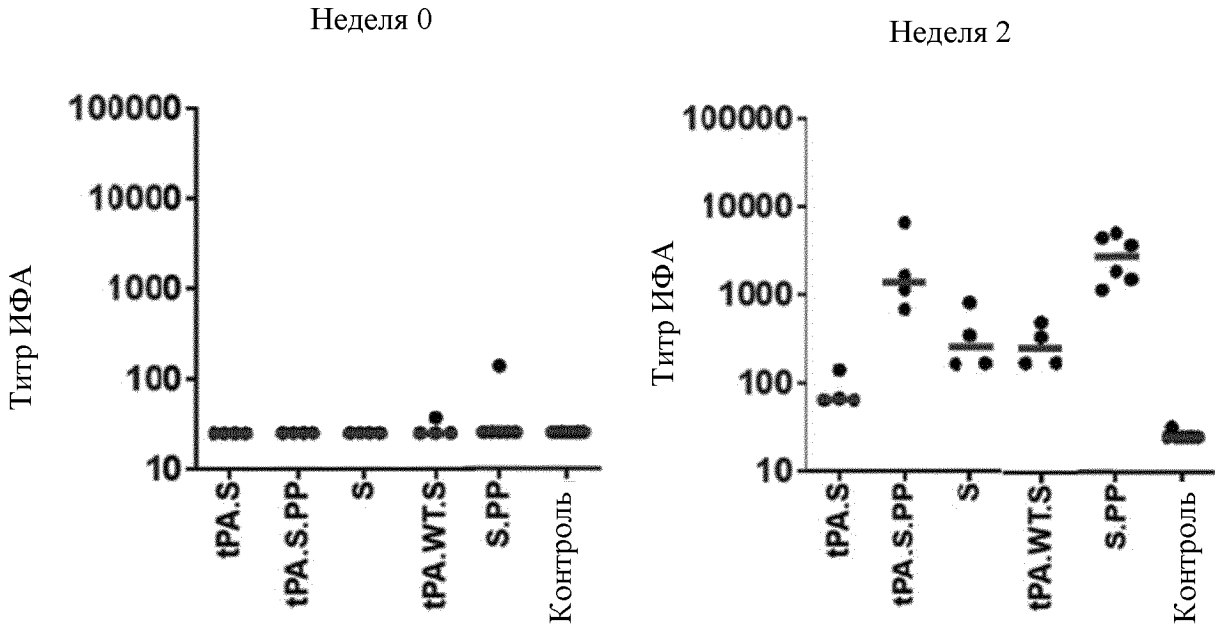
Фиг. 86C



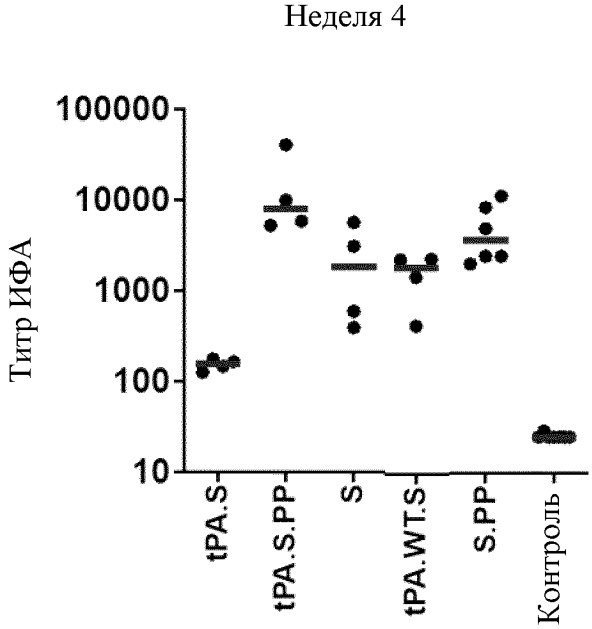
Фиг. 86D



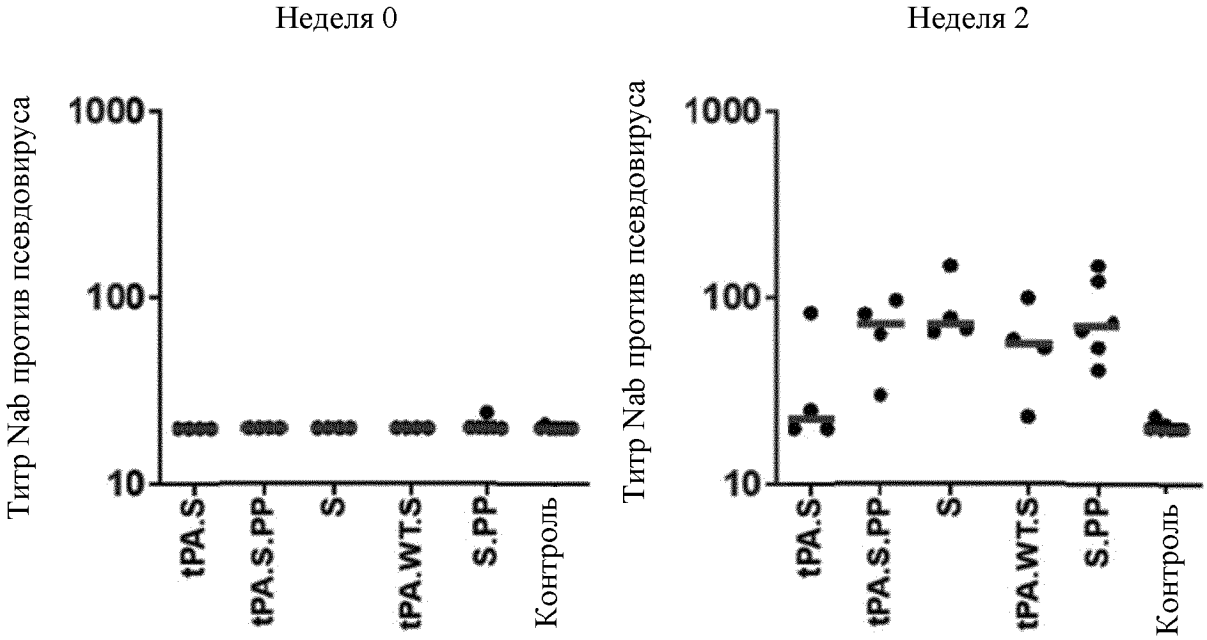
Фиг. 87



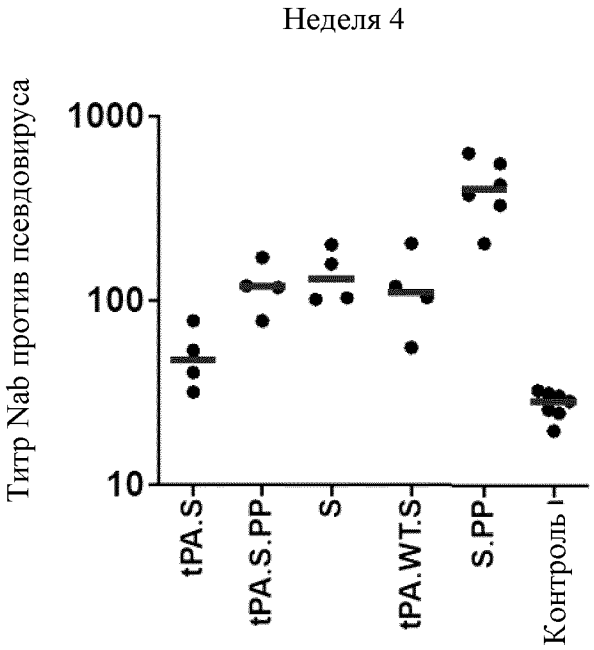
Фиг. 88A



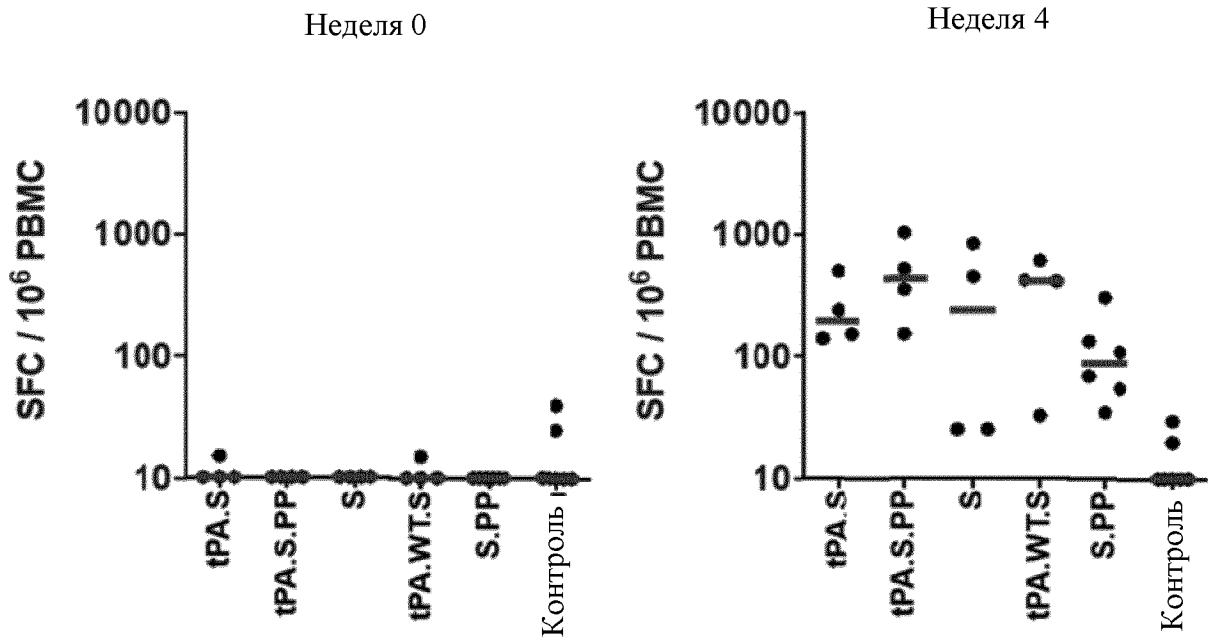
Фиг. 88A (продолжение)



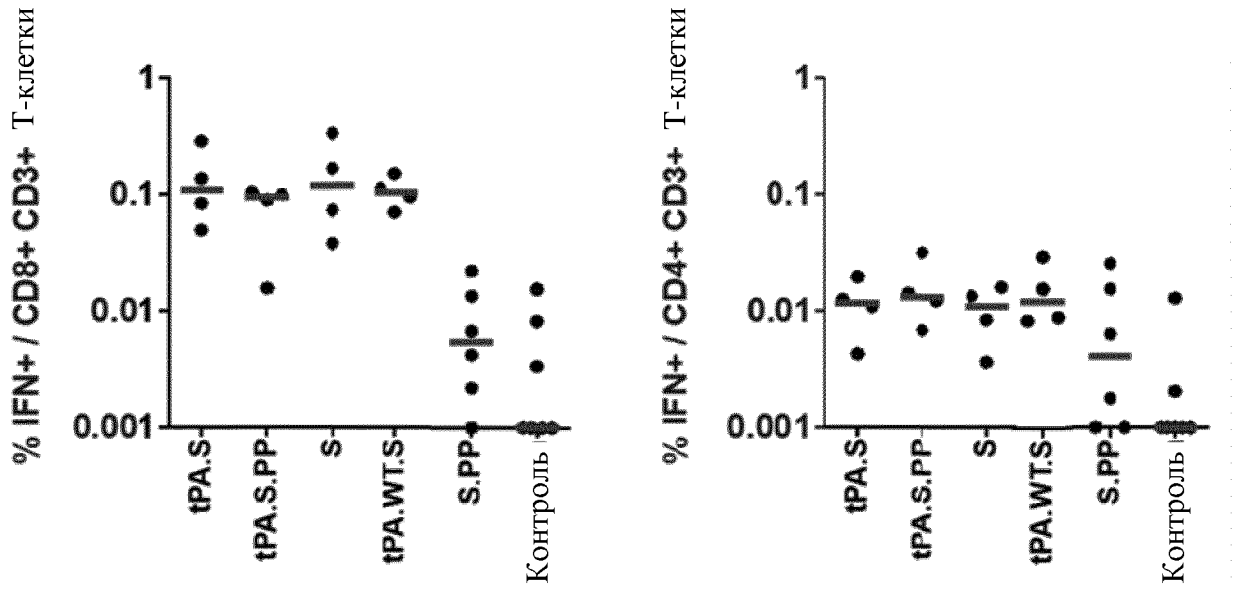
Фиг. 88B



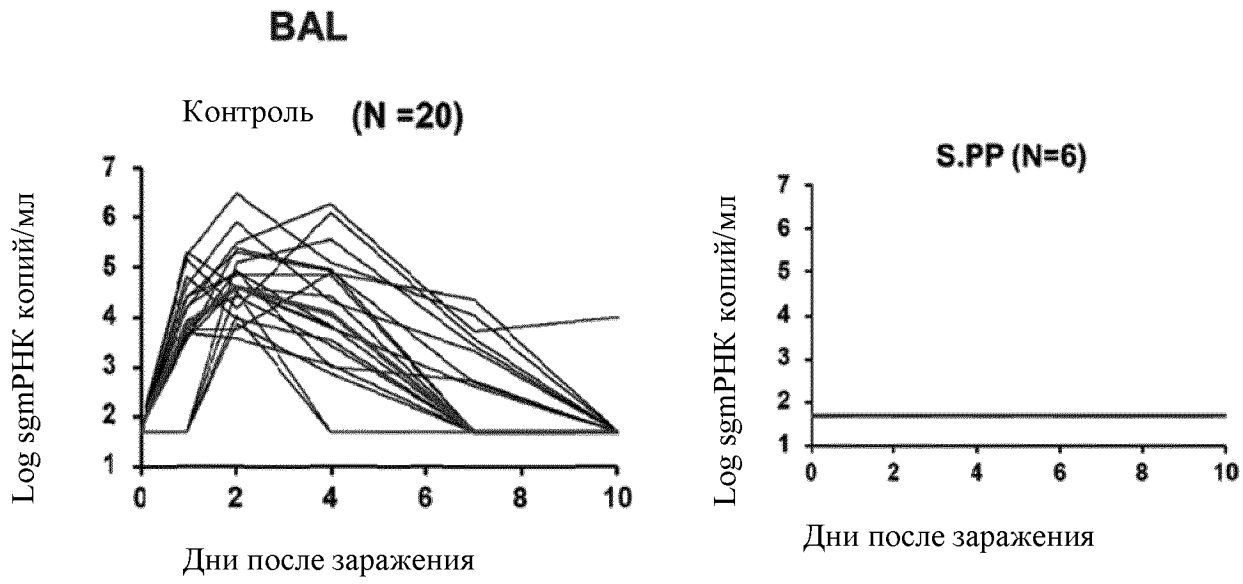
Фиг. 88B (продолжение)



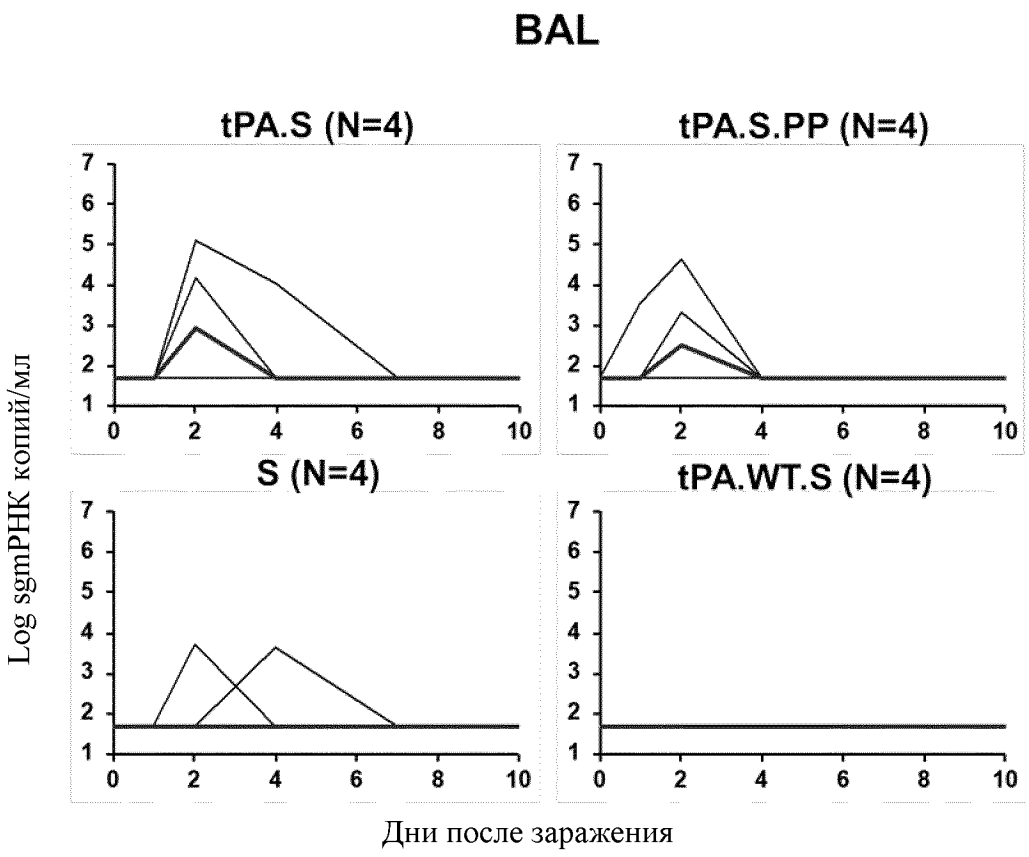
Фиг. 89A



Фиг. 89B

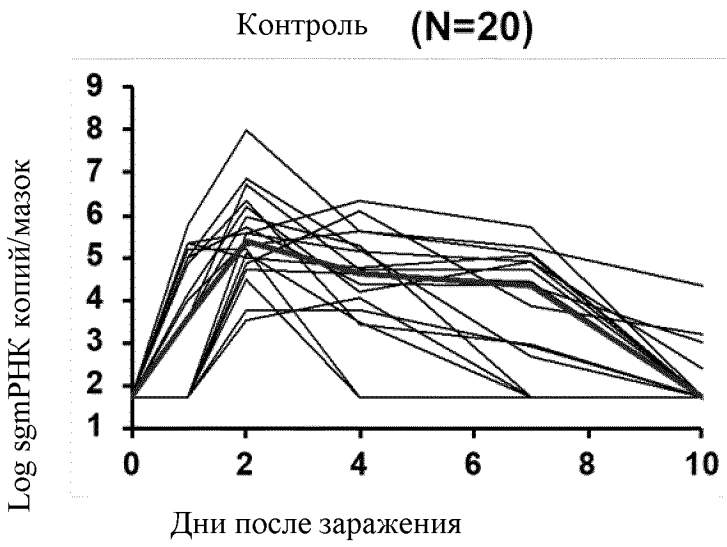


Фиг. 90A



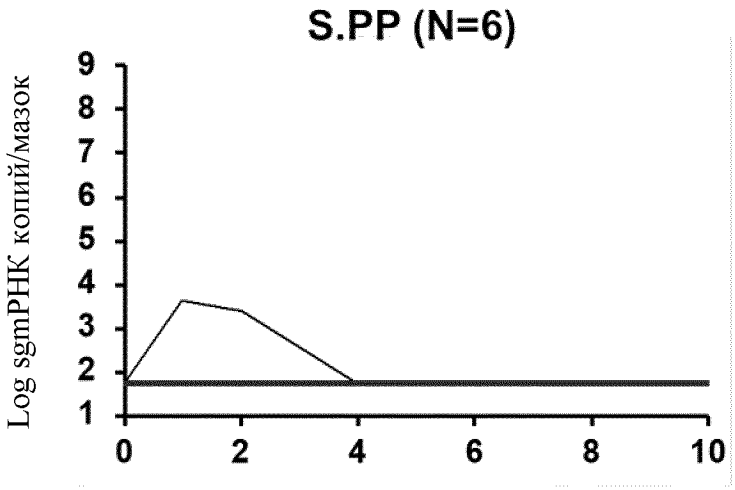
Фиг. 90B

Назальный мазок



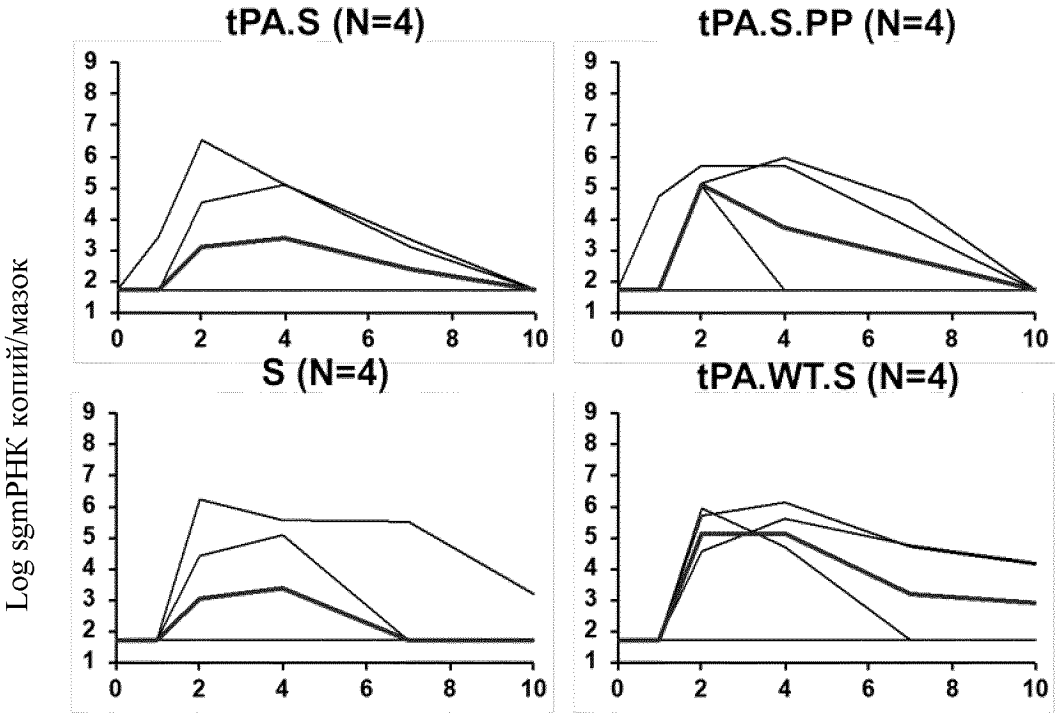
Фиг. 90C

Назальный мазок

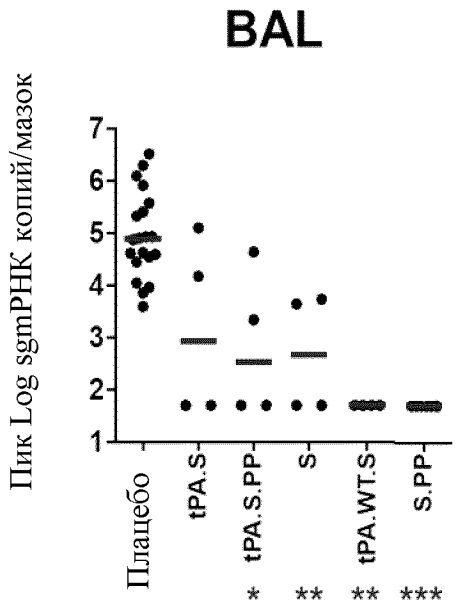


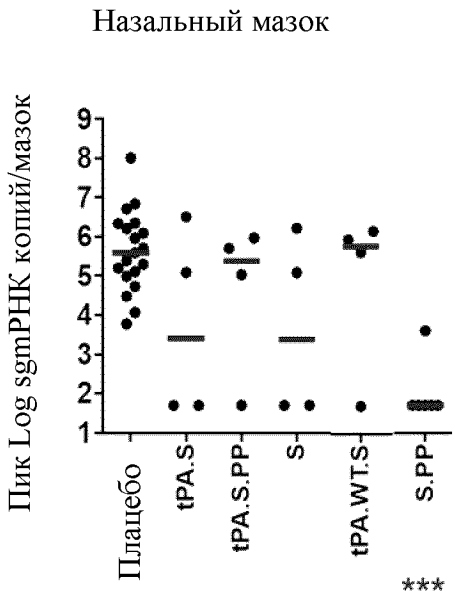
Фиг. 90C (продолжение)

Назальный мазок

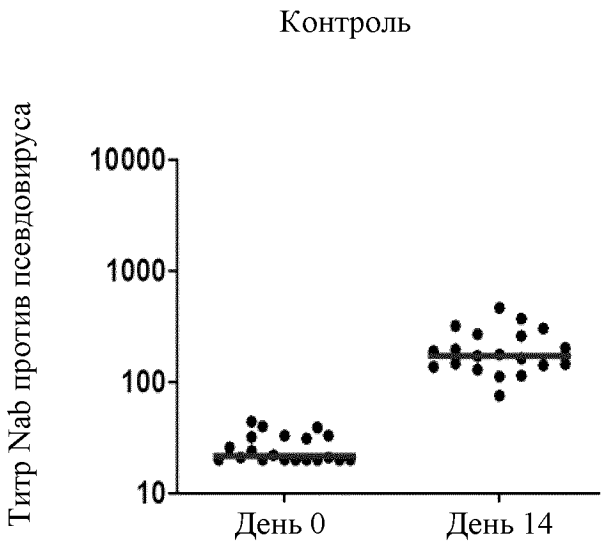


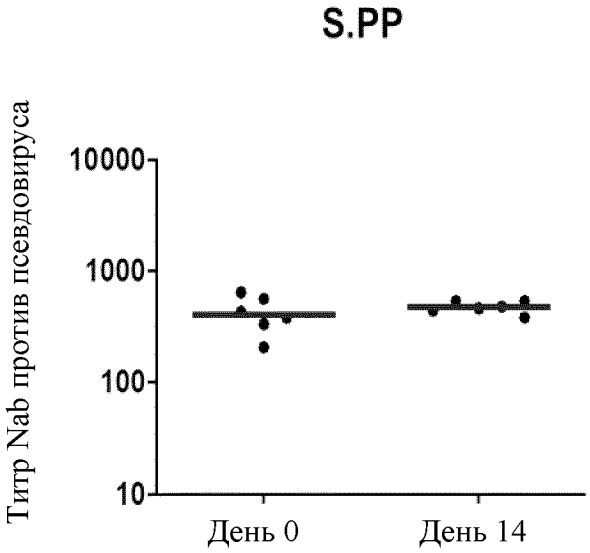
Фиг. 90D


BAL
Пик Log sgmPHK копий/мазок
7
6
5
4
3
2
1
Плацебо
tPA.S
tPA.S.PP
S
tPA.WT.S
S.PP
*
**
**
***

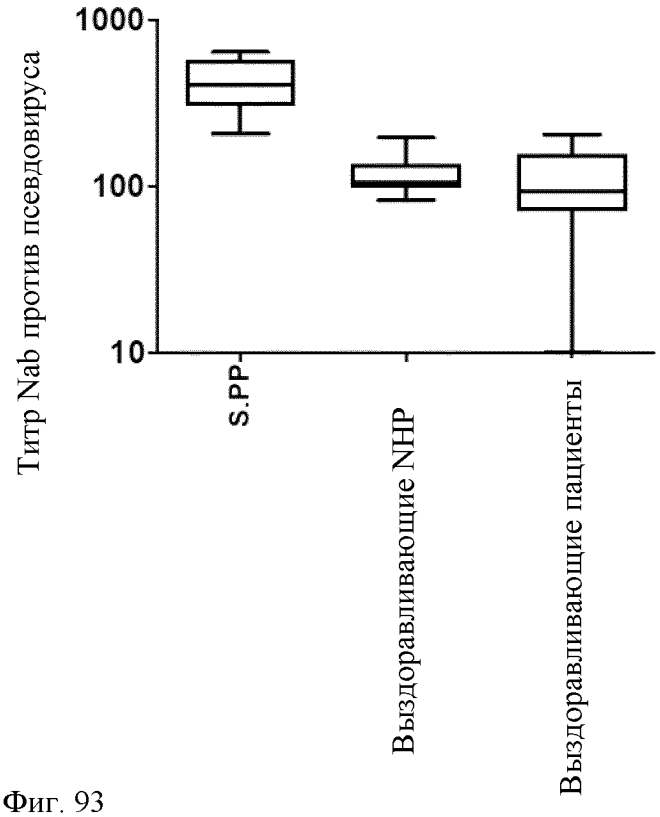

Назальный мазок
Пик Log sgmPHK копий/мазок
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Плацебо
tPA.S
tPA.S.PP
S
tPA.WT.S
S.PP
***

Фиг. 91

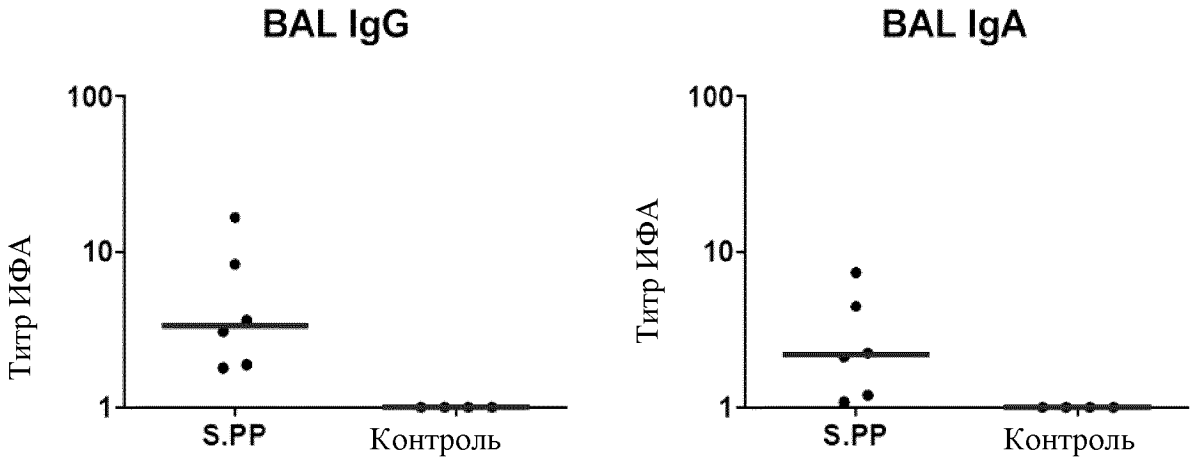

Контроль
Титр Nab против псевдовируса
10000
1000
100
10
День 0
День 14


S.PP
Титр Nab против псевдовируса
10000
1000
100
10
День 0
День 14

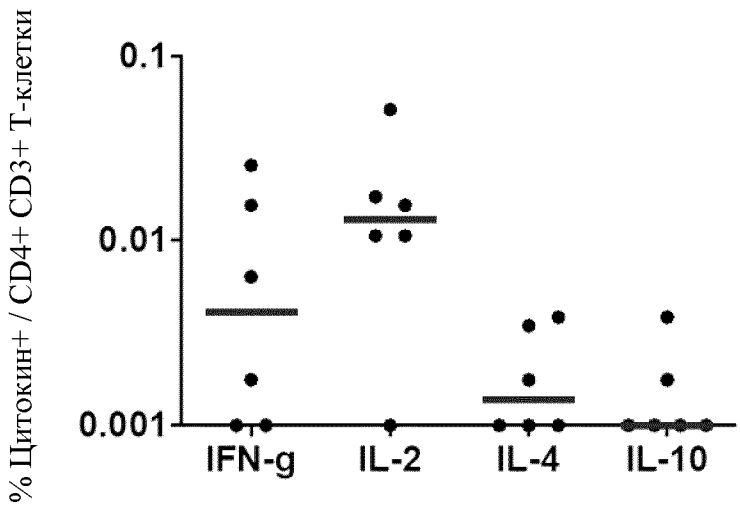
Фиг. 92


Титр Nab против псевдовируса
1000
100
10
S.PP
Выздоравливающие NHP
Выздоравливающие пациенты

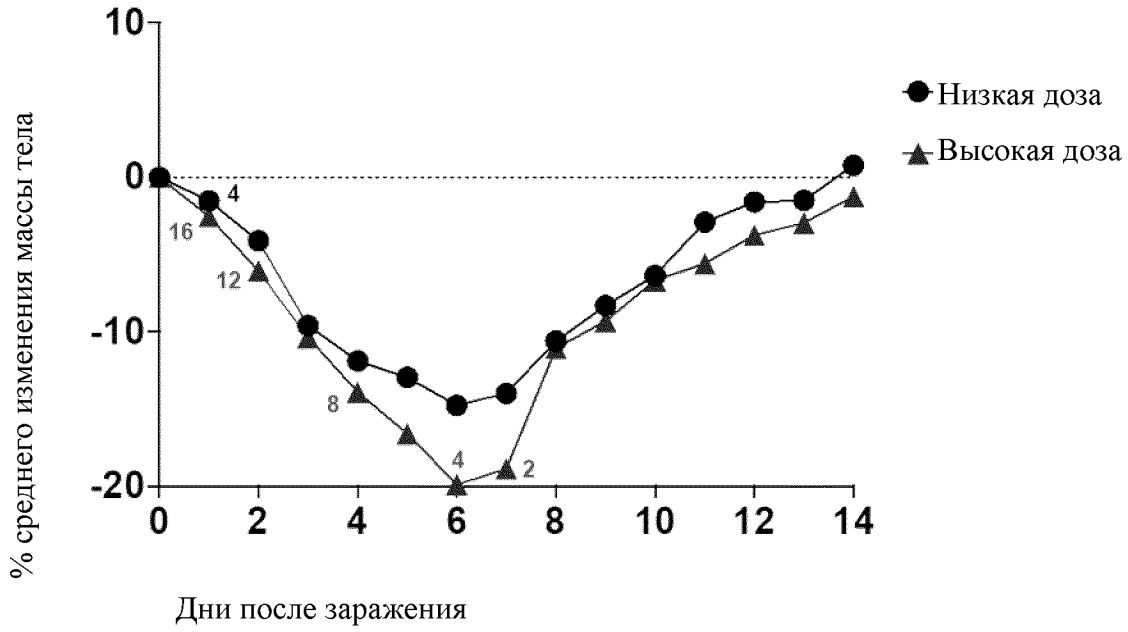
Фиг. 93


BAL IgG
Титр ИФА
100
10
1
S.PP
Контроль
BAL IgA
Титр ИФА
100
10
1
S.PP
Контроль

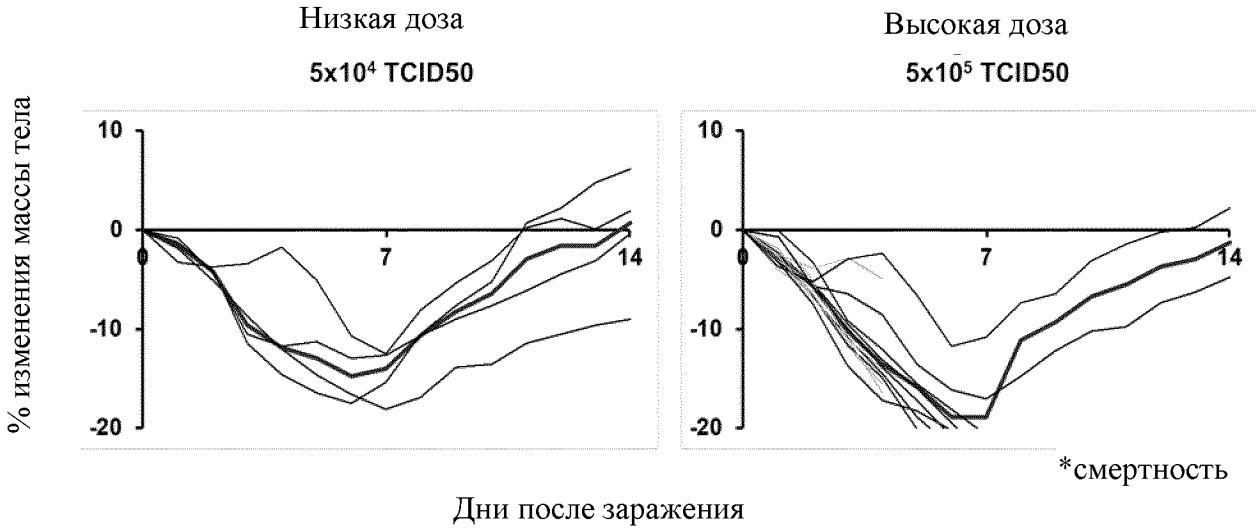
Фиг. 94



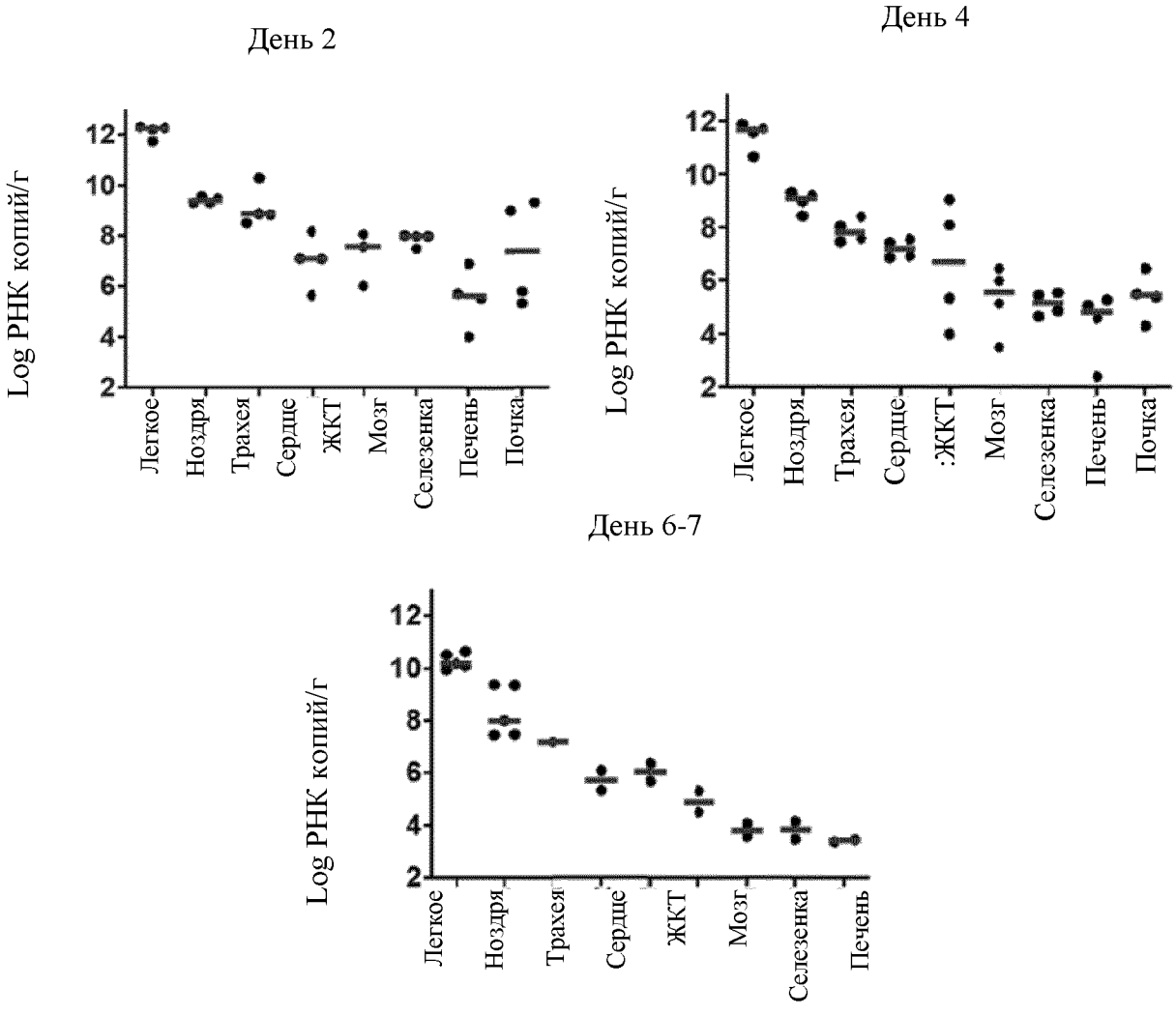
Фиг. 95



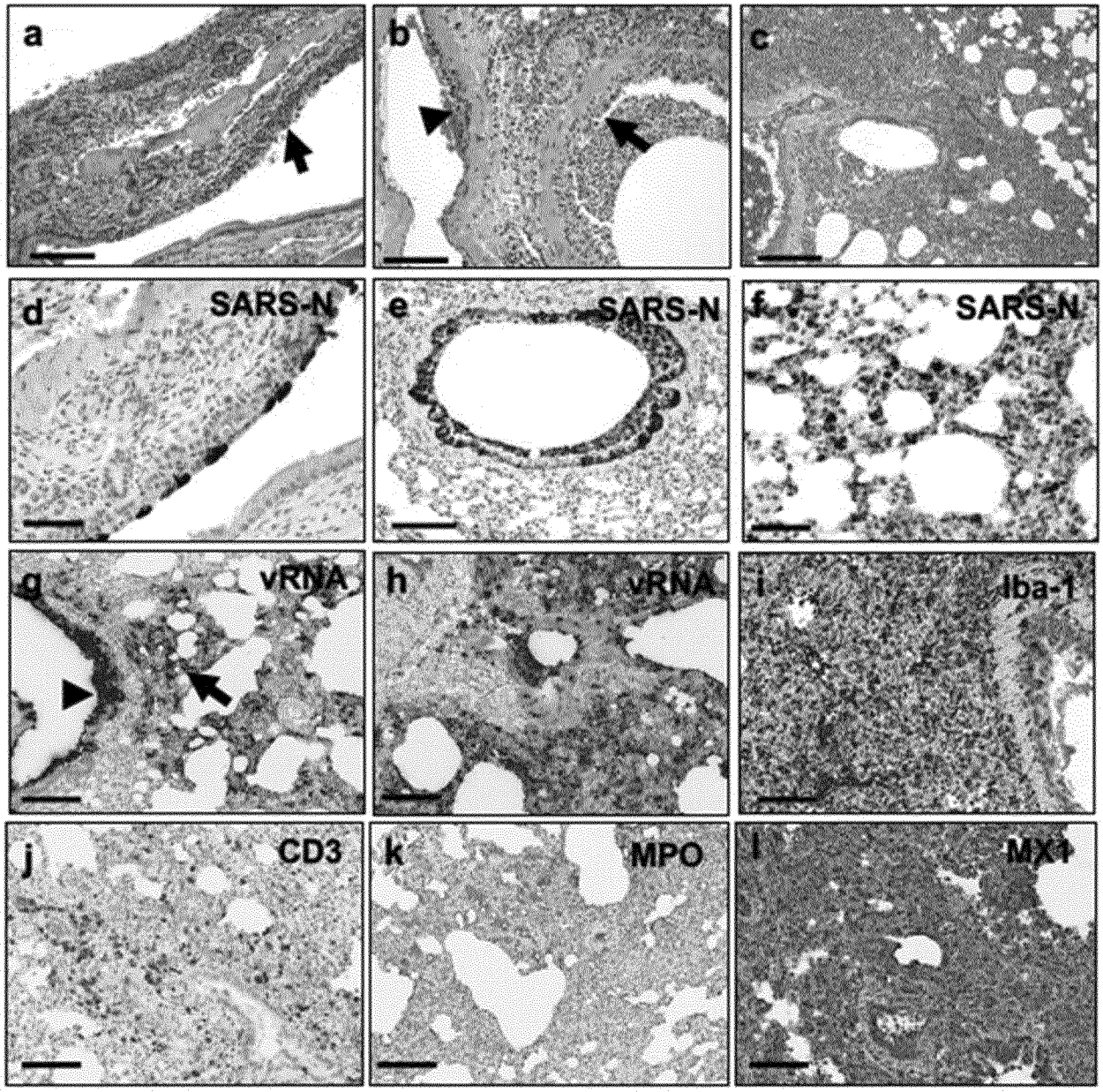
Фиг. 96A



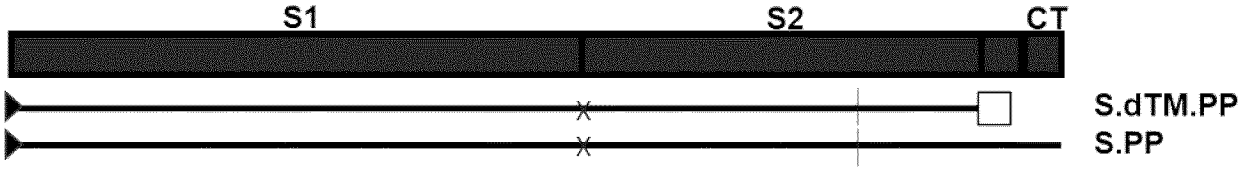
Фиг. 96B



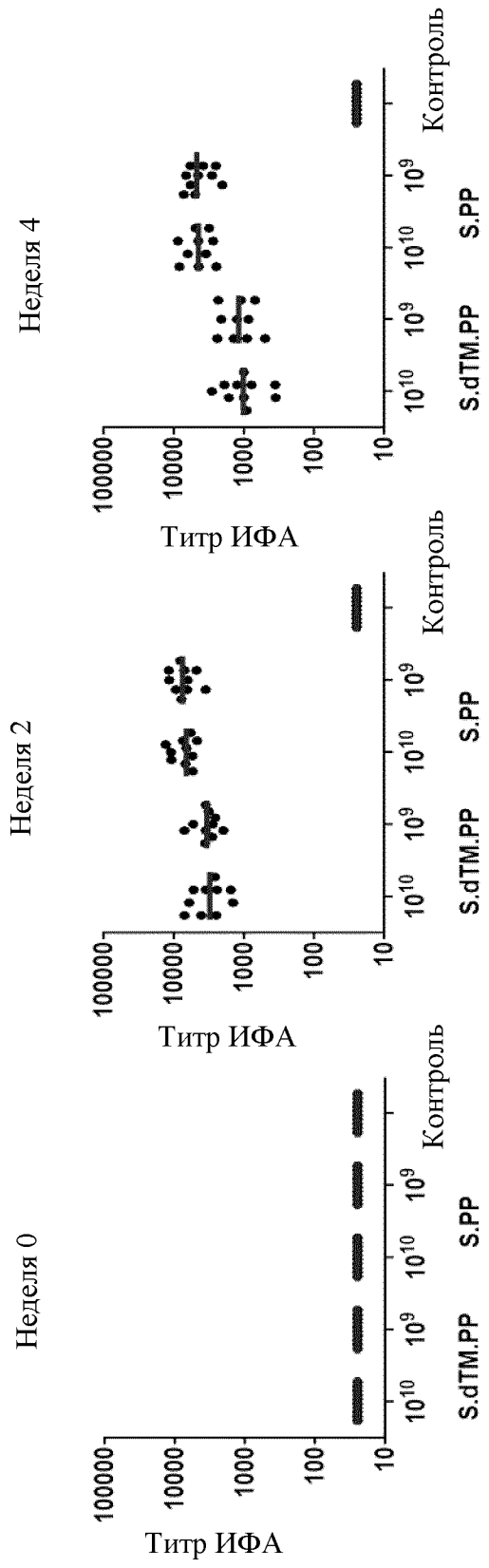
Фиг. 96C



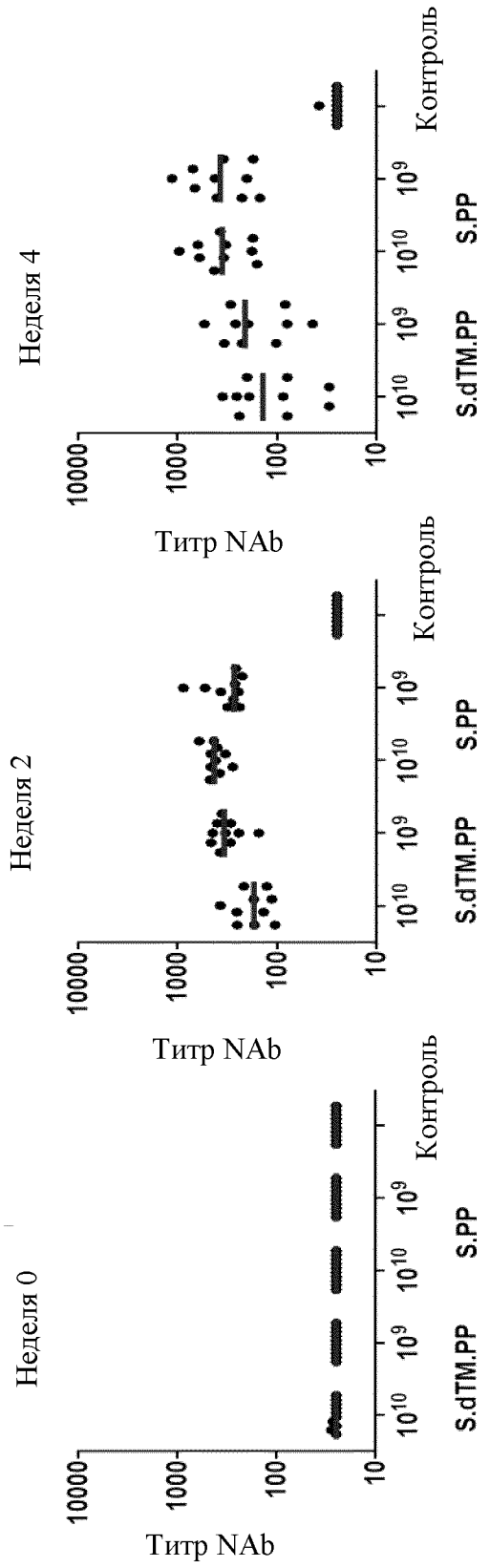
Фиг. 97A-97L



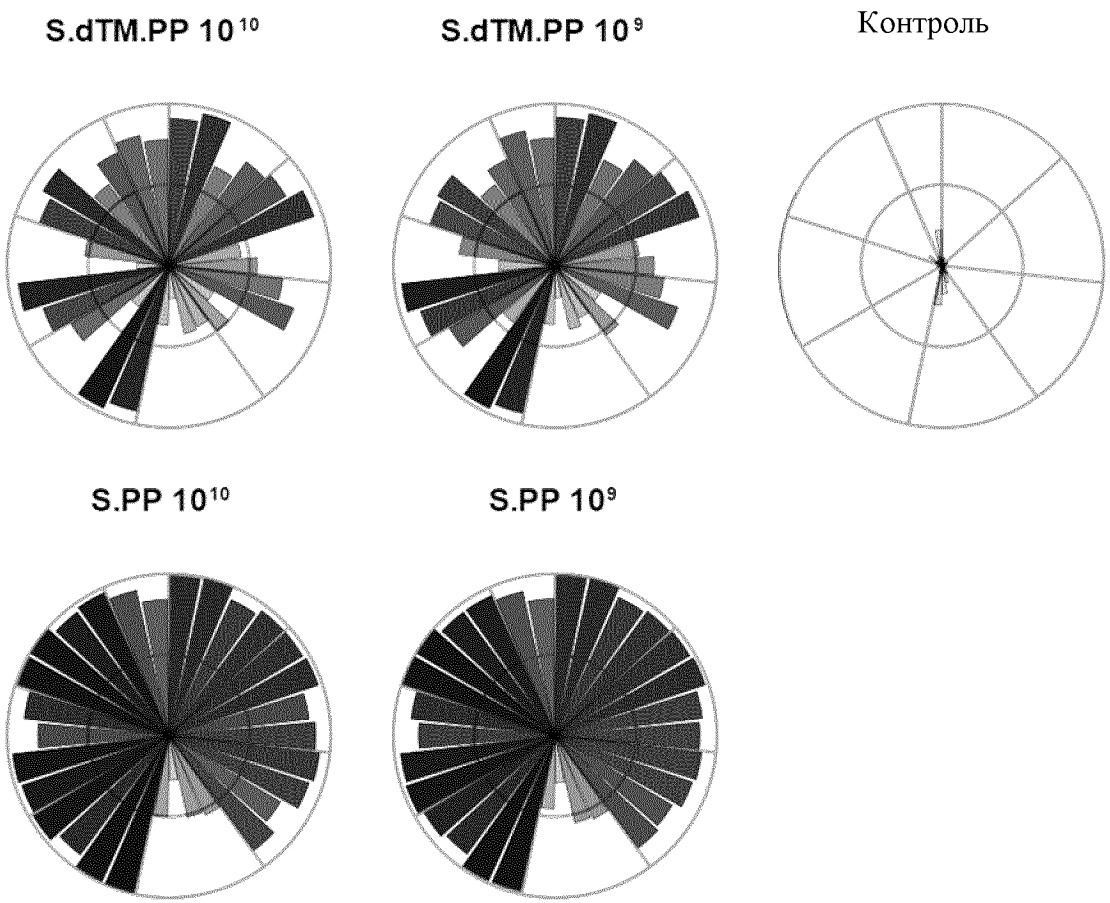
Фиг. 98A


Неделя 0
Неделя 2
Неделя 4
Титр ИФА
100000
10000
1000
100
10
S.dTM.PP
S.PP
Контроль

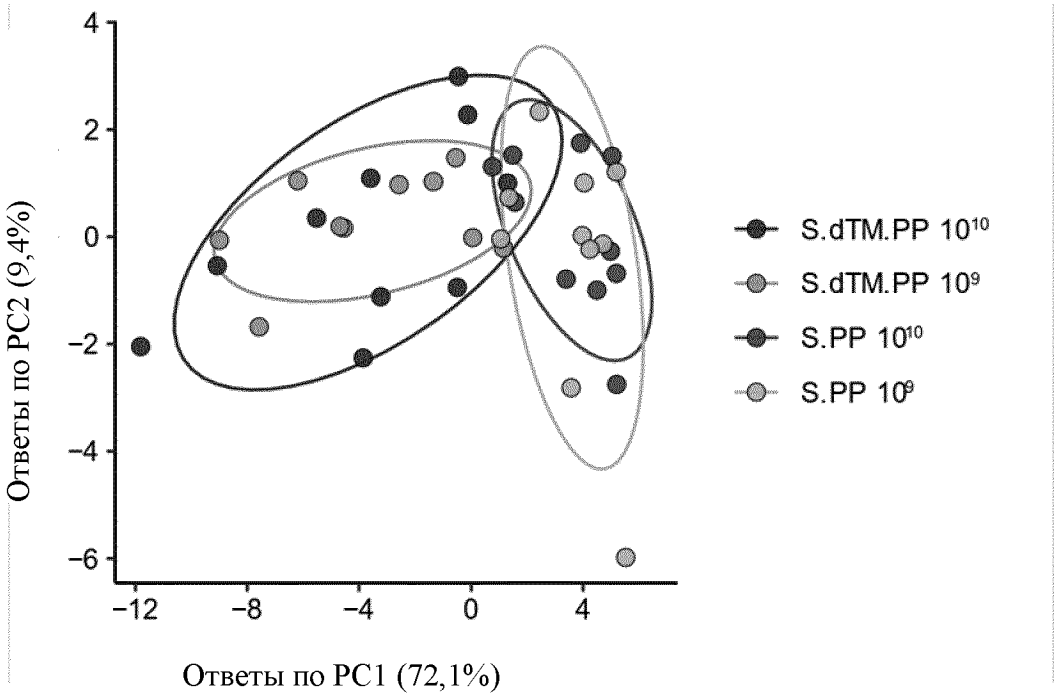
Фиг. 98B


Неделя 4
Титр NAb
10000
1000
100
10
10^{10}
10^{9}
S.dTM.PP
S.PP
Контроль
Неделя 2
Титр NAb
10000
1000
100
10
10^{10}
10^{9}
S.dTM.PP
S.PP
Контроль
Неделя 0
Титр NAb
10000
1000
100
10
10^{10}
10^{9}
S.dTM.PP
S.PP
Контроль

Фиг. 98C

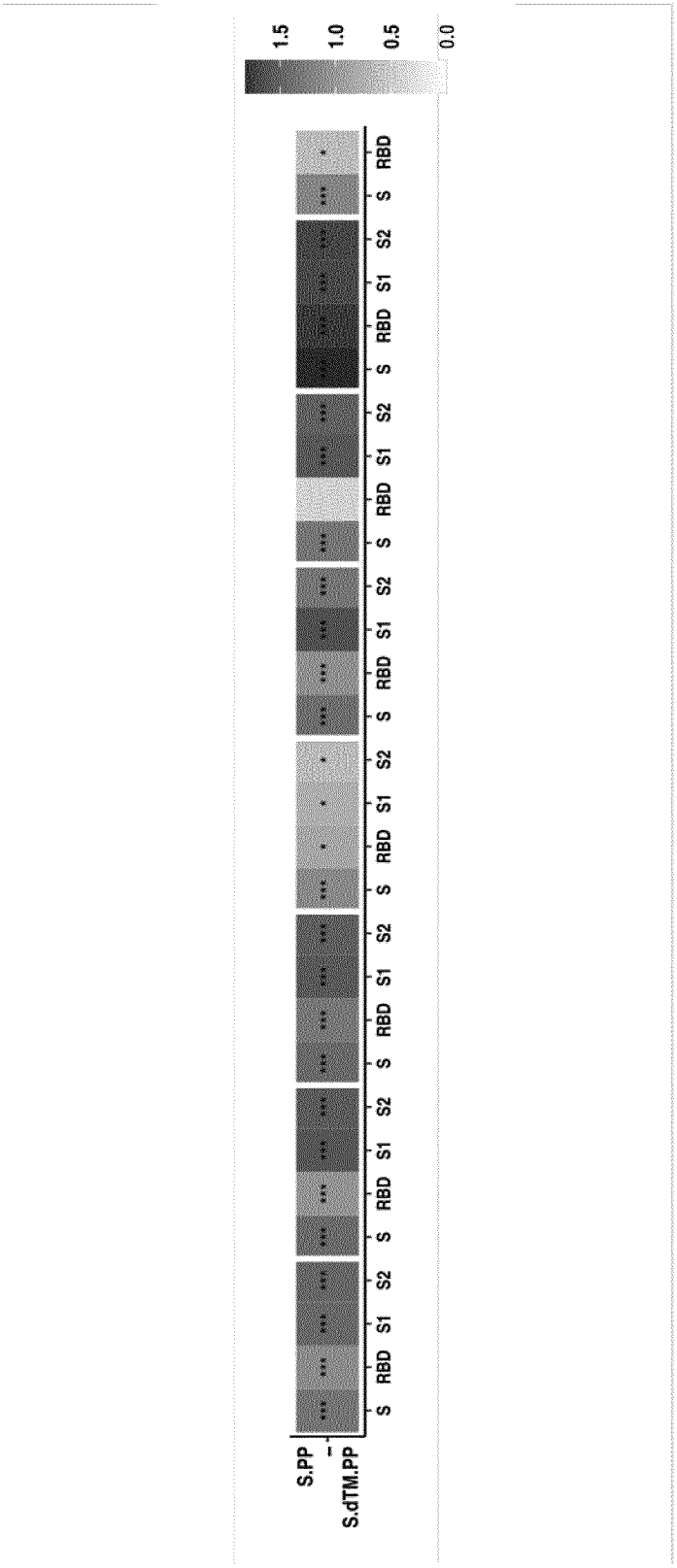


Фиг. 98D

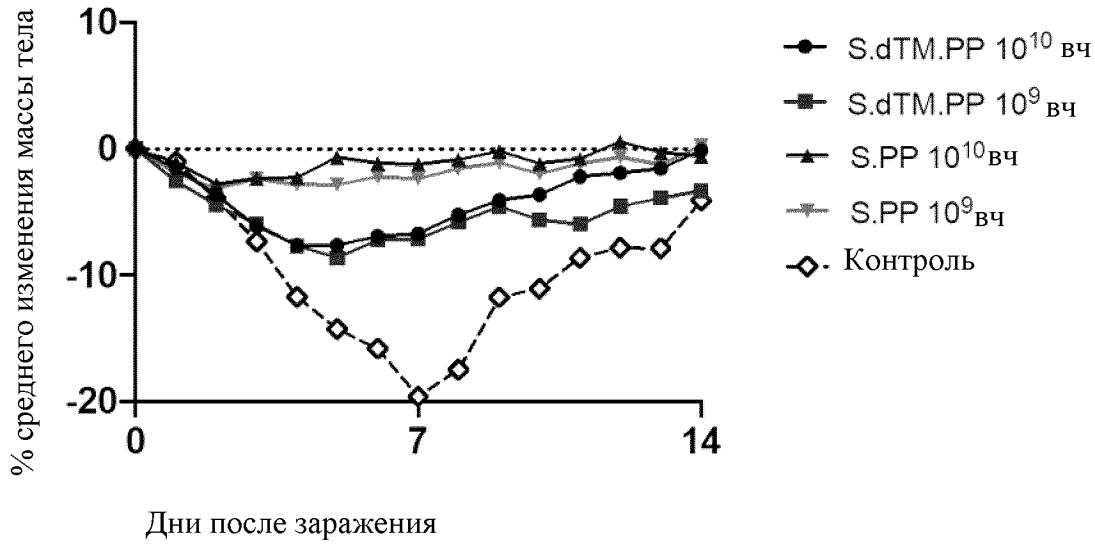


Фиг. 98E

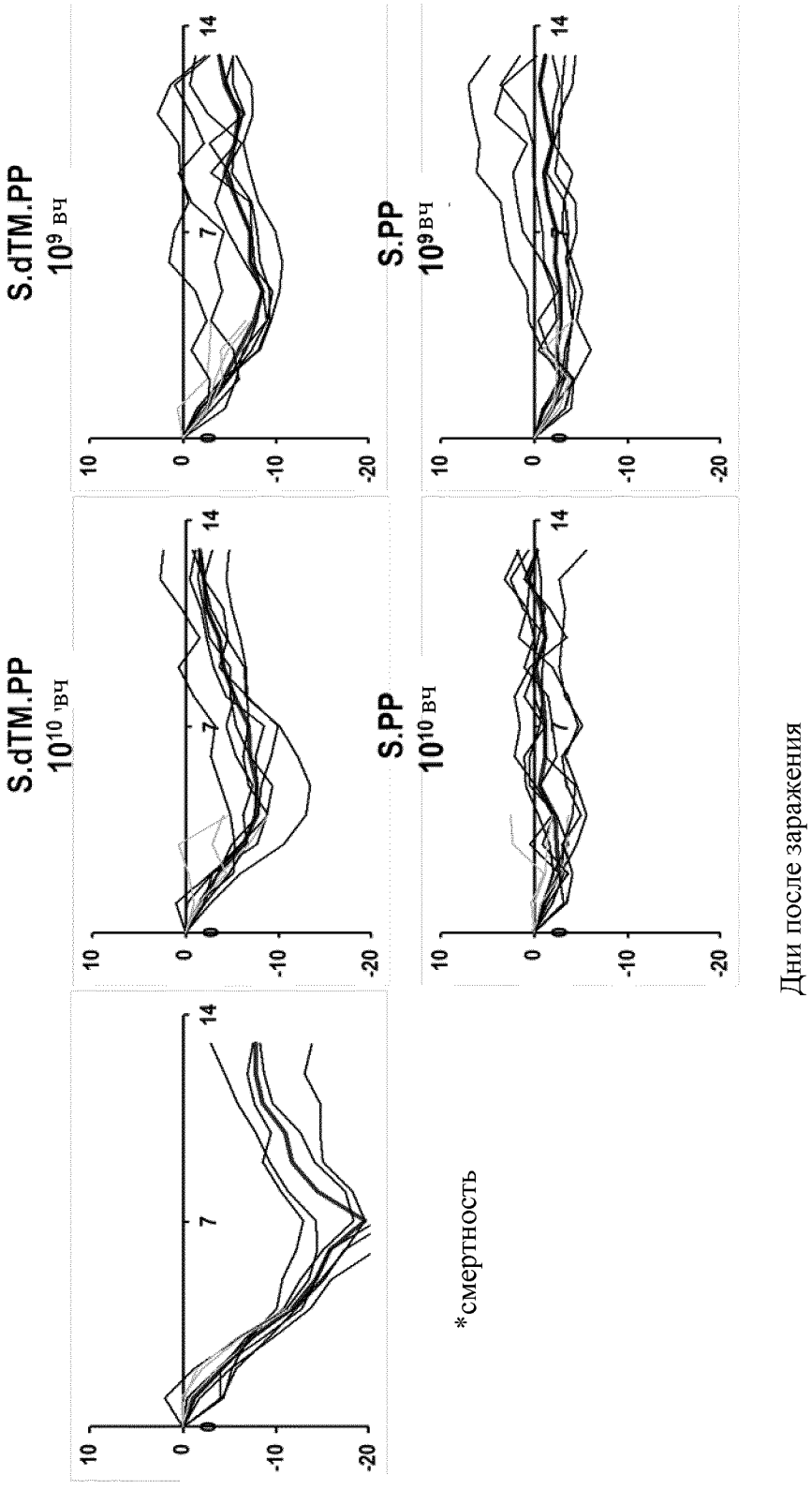
различия в средних
показателях z-значений



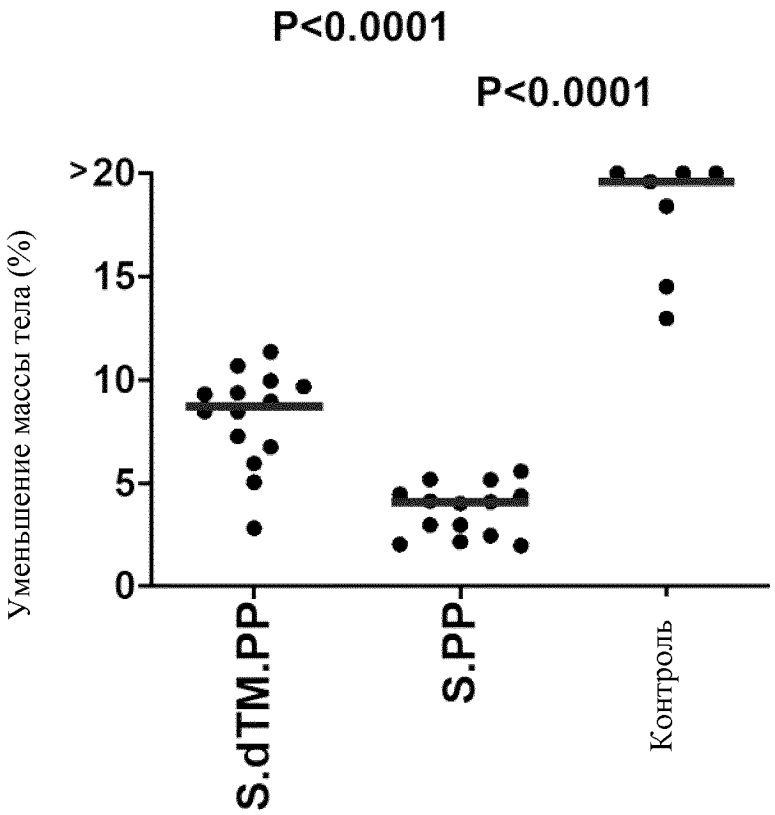
Фиг. 98F


10
0
-10
-20
0
7
14
% среднего изменения массы тела
Дни после заражения
S.dTM.PP 10^10 вч
S.dTM.PP 10^9 вч
S.PP 10^10 вч
S.PP 10^9 вч
Контроль

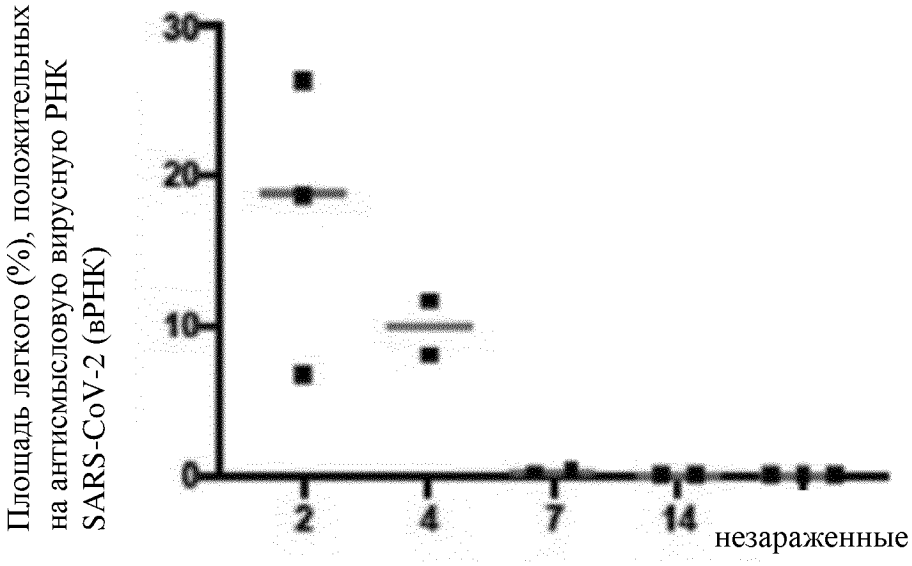
Фиг. 99A


S.dTM.PP
10^9 вч
S.PP
10^9 вч
S.dTM.PP
10^10 вч
S.PP
10^10 вч
10
0
-10
-20
7
14
*смертность
Дни после заражения
Изменение массы тела (%)

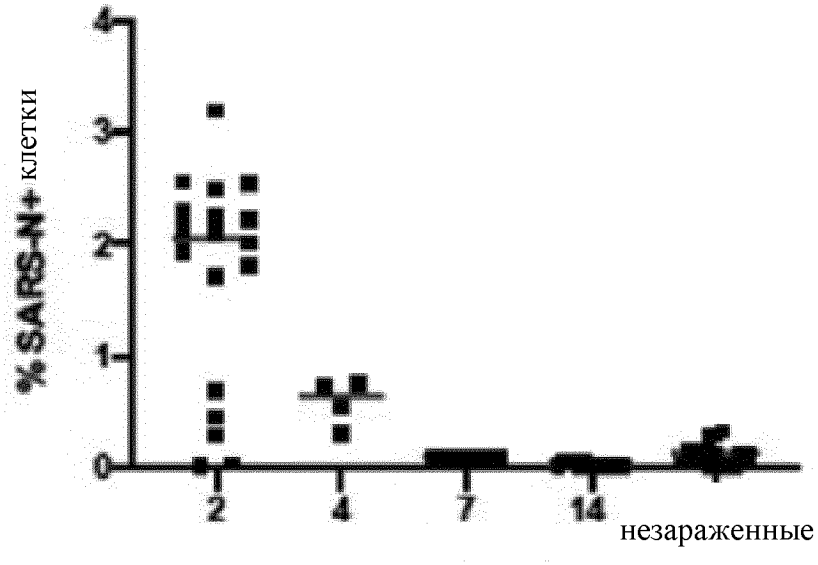
Фиг. 99B



Фиг. 99C

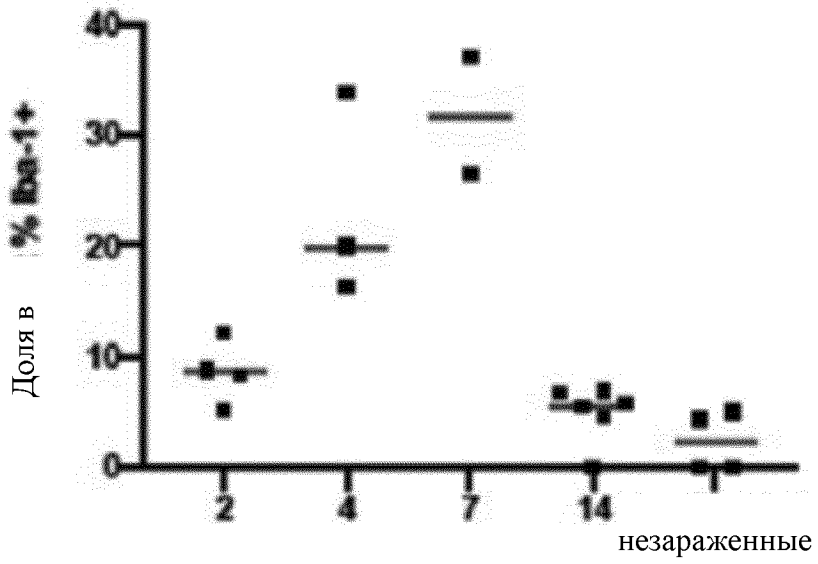


Фиг. 100A



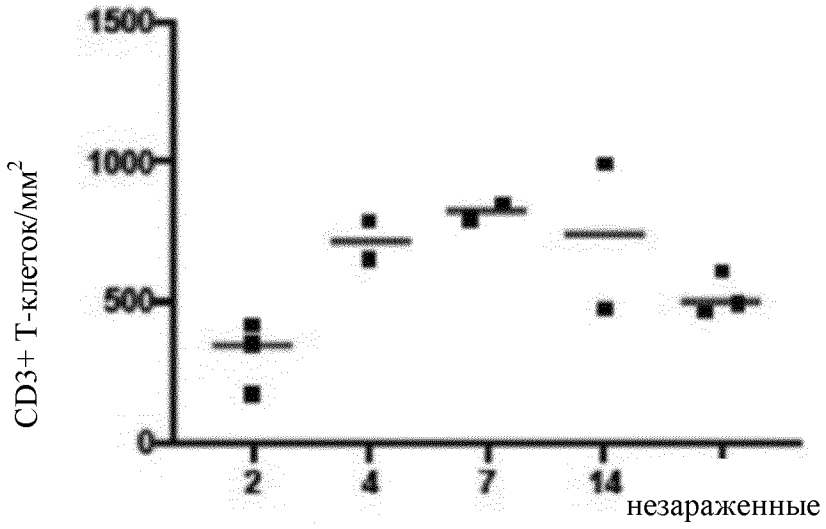
Дни после заражения

Фиг. 100B

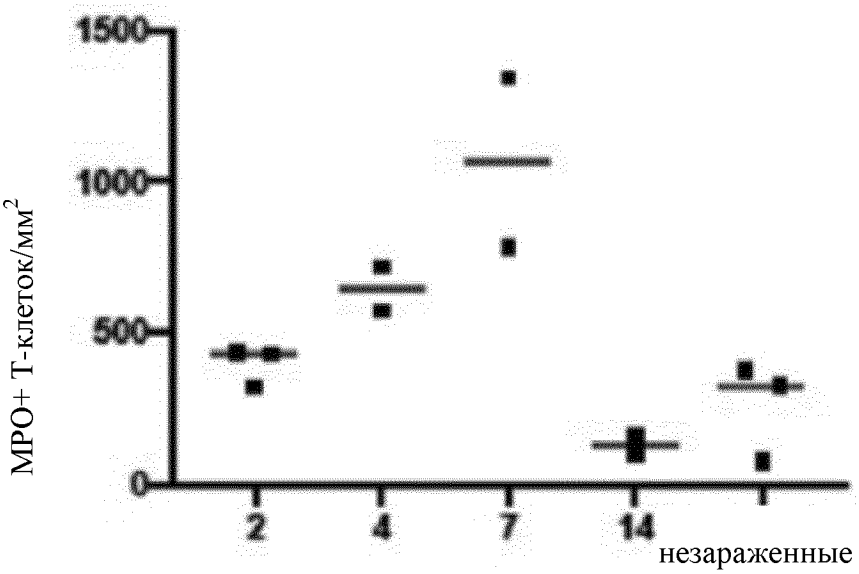


Дни после заражения

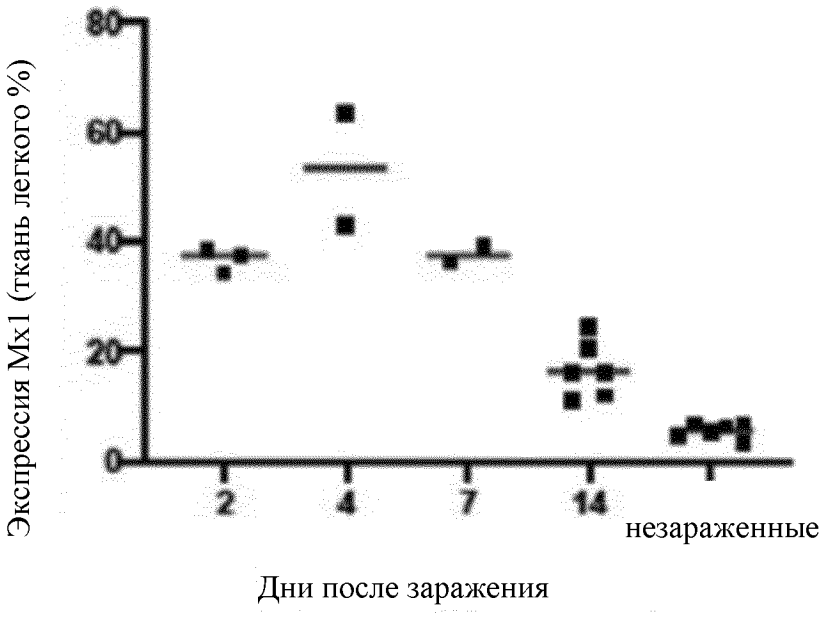
Фиг. 100C



Фиг. 100D



Фиг. 100E

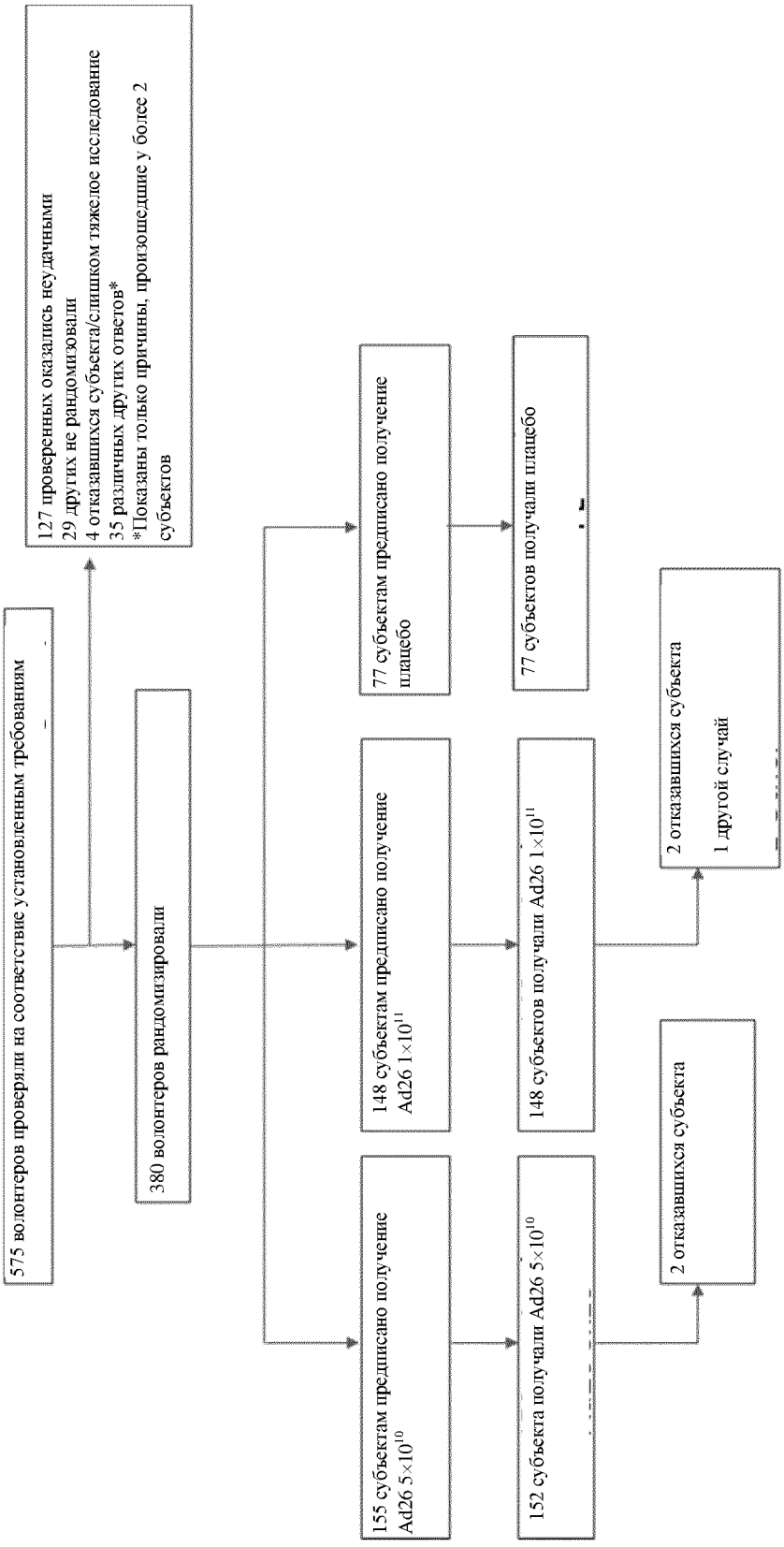

Экспрессия Mx1 (ткань легкого %)
80
60
40
20
0
2
4
7
14
незараженные
Дни после заражения

Фиг. 100F

Когорта 1a (взрослые ≥18 до ≤55 лет)			
Группа	N	День 1 (вакцинация 1)	День 57 (вакцинация 2)
1	75	Ad26COVS1 5×10^{10} вч	Ad26COVS1 5×10^{10} вч
2	75	Ad26COVS1 5×10^{10} вч	Плацебо
3	75	Ad26COVS1 1×10^{11} вч	Ad26COVS1 1×10^{11} вч
4	75	Ad26COVS1 1×10^{11} вч	Плацебо
5	75	Плацебо	Плацебо
Когорта 1b (взрослые ≥18 до ≤55 лет)			
вч Группа	N	День 1 (вакцинация 1)	День 57 (вакцинация 2)
1	5	Ad26COVS1 5×10^{10} вч	Ad26COVS1 5×10^{10} вч
2	5	Ad26COVS1 5×10^{10} вч	Плацебо
3	5	Ad26COVS1 1×10^{11} вч	Ad26COVS1 1×10^{11} вч
4	5	Ad26COVS1 1×10^{11} вч	Плацебо
5	5	Плацебо	Плацебо
Когорта 2a (взрослые ≥18 до ≤55 лет)			
Группа	N	День 1 (вакцинация 1)	День 57
1-4	120	Ad26COVS1 1×10^{11} вч	Без вакцинации
5	15	Плацебо	Без вакцинации
Когорта 2b (взрослые ≥18 до ≤55 лет)			
Группа	N	День 1 (вакцинация 1)	День 57 (вакцинация 2)
1-4	120	Ad26COVS1 5×10^{10} вч	Ad26COVS1 5×10^{10} вч
5	15	Плацебо	Плацебо
Когорта 3 (взрослые ≥65 лет)			
Группа	N	День 1 (вакцинация 1)	День 57 (вакцинация 2)
1	75	Ad26COVS1 5×10^{10} вч	Ad26COVS1 5×10^{10} вч
2	75	Ad26COVS1 5×10^{10} вч	Плацебо
3	75	Ad26COVS1 1×10^{11} вч	Ad26COVS1 1×10^{11} вч
4	75	Ad26COVS1 1×10^{11} вч	Плацебо
5	75	Плацебо	Плацебо
Итого	1,045		

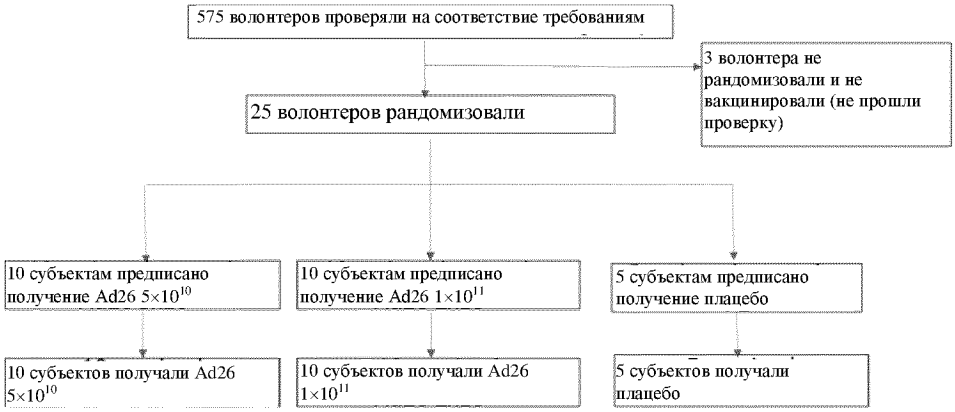
Фиг. 101

Когорта 1

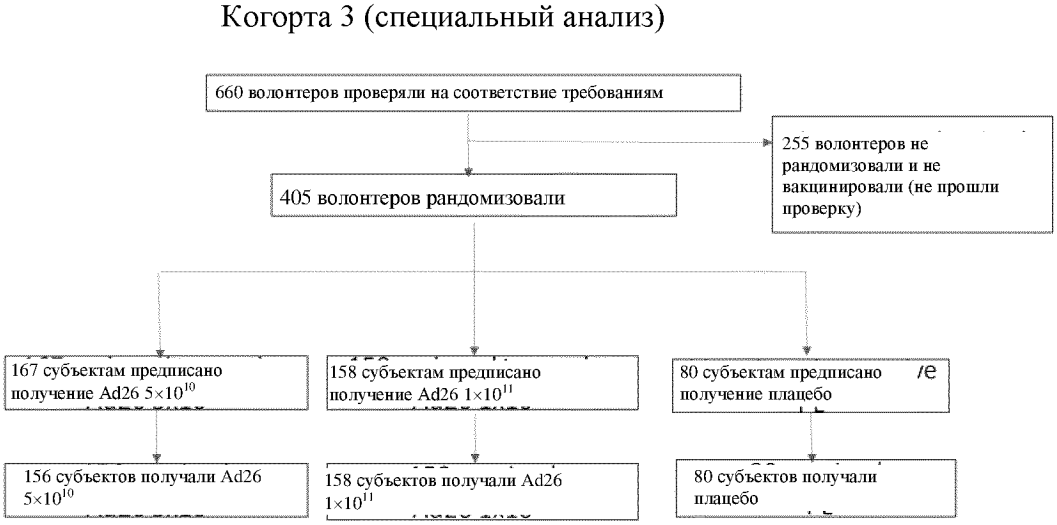


Фиг. 102A

Когорта 1b

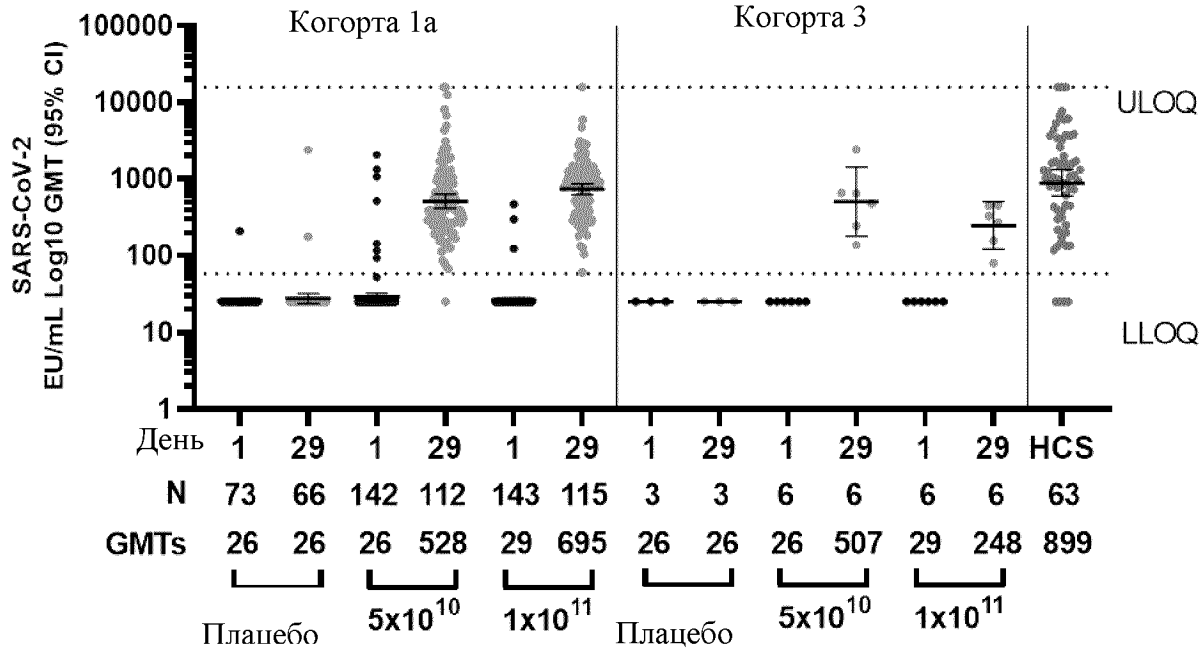


Фиг. 102B

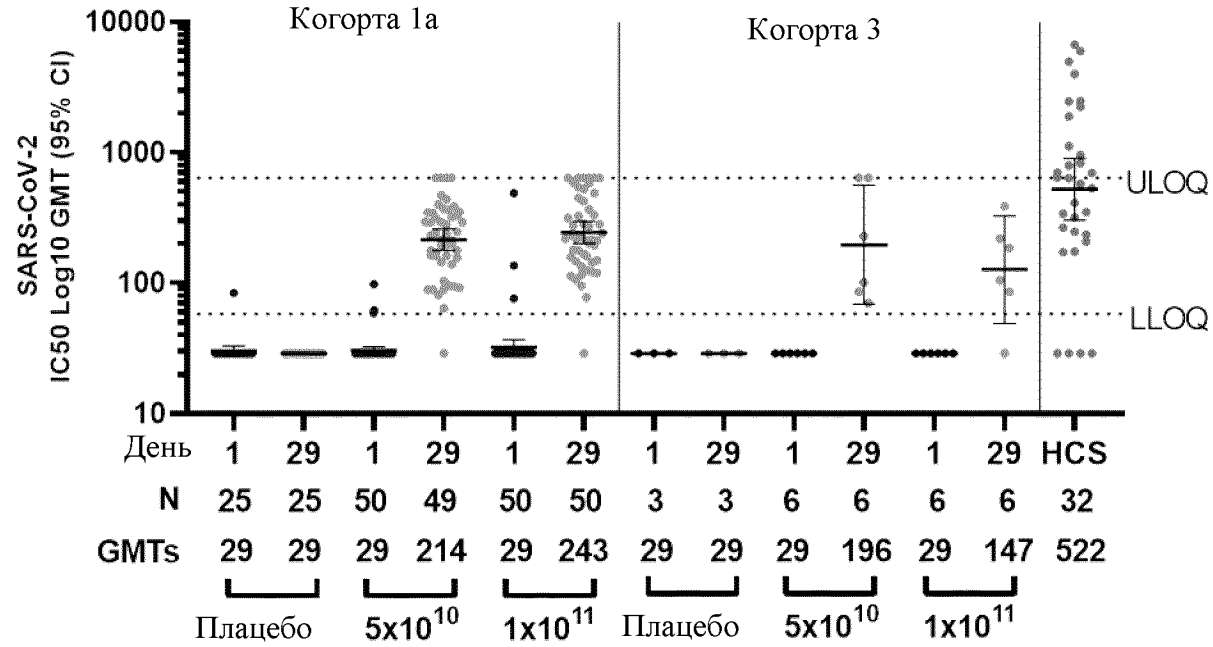


4

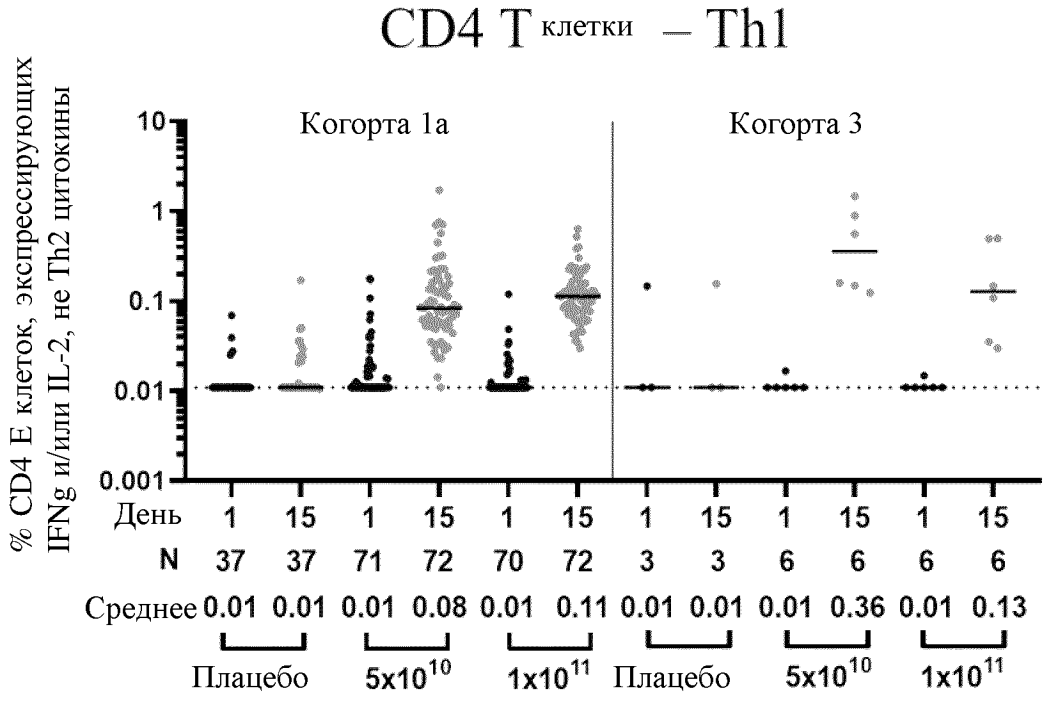
Фиг. 102C



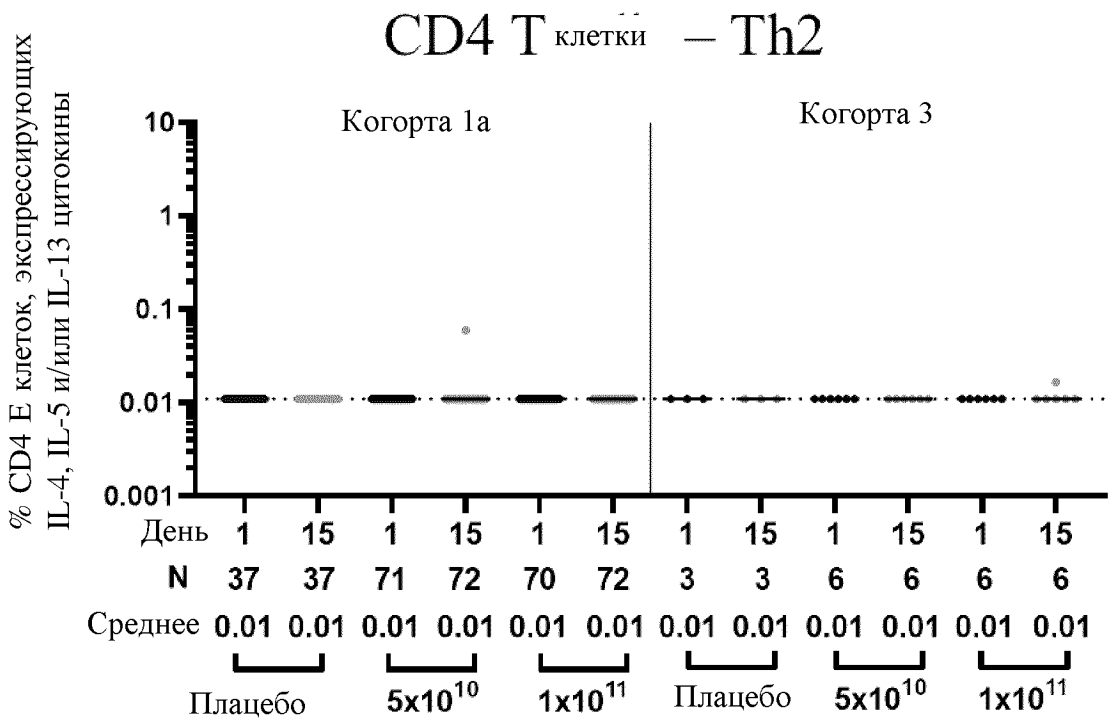
Фиг. 103A



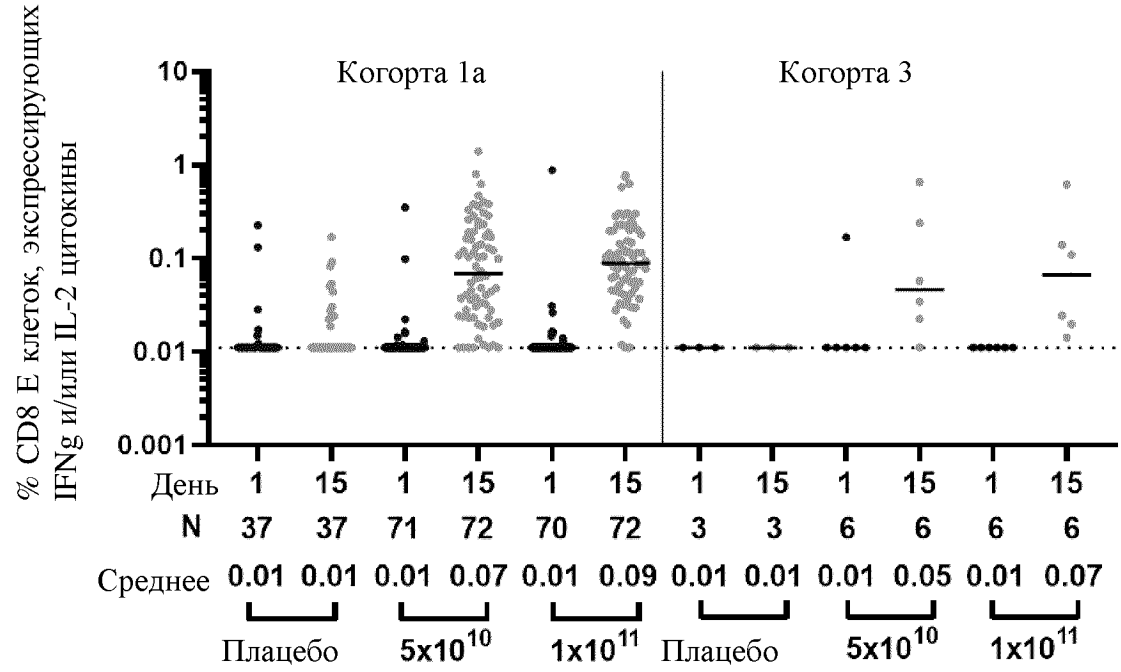
Фиг. 103B



Фиг. 103C

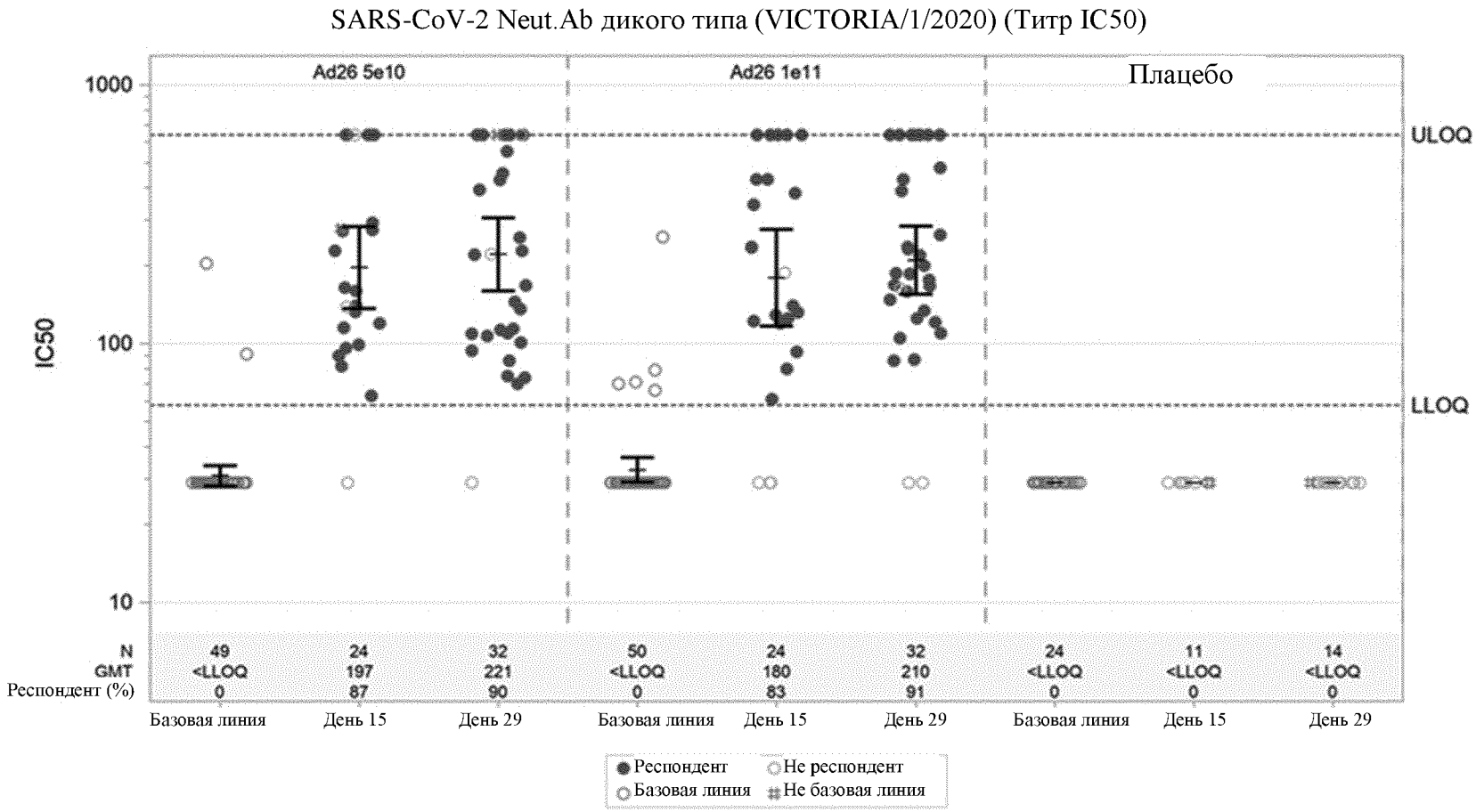


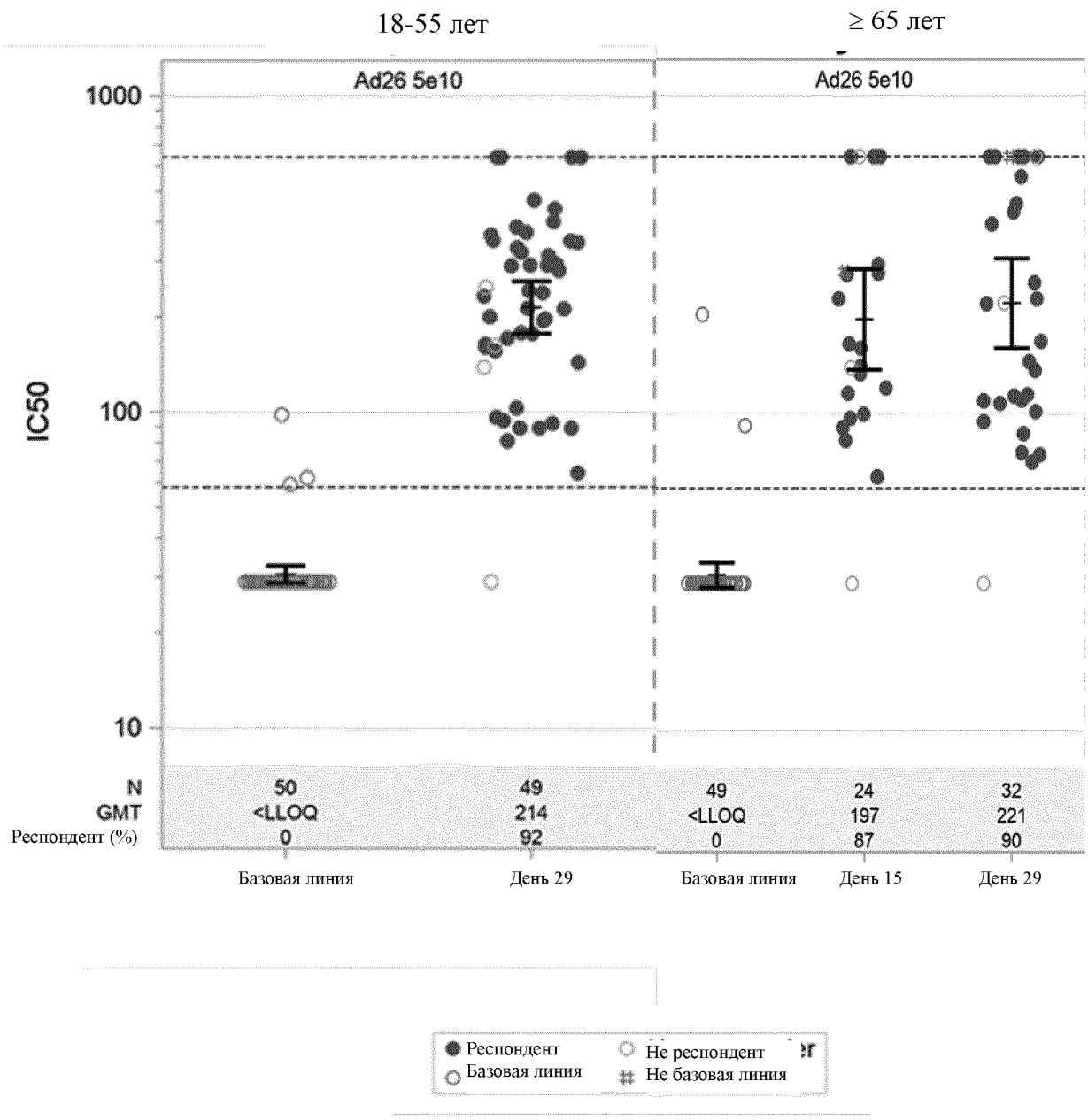
Фиг. 103C (продолжение)



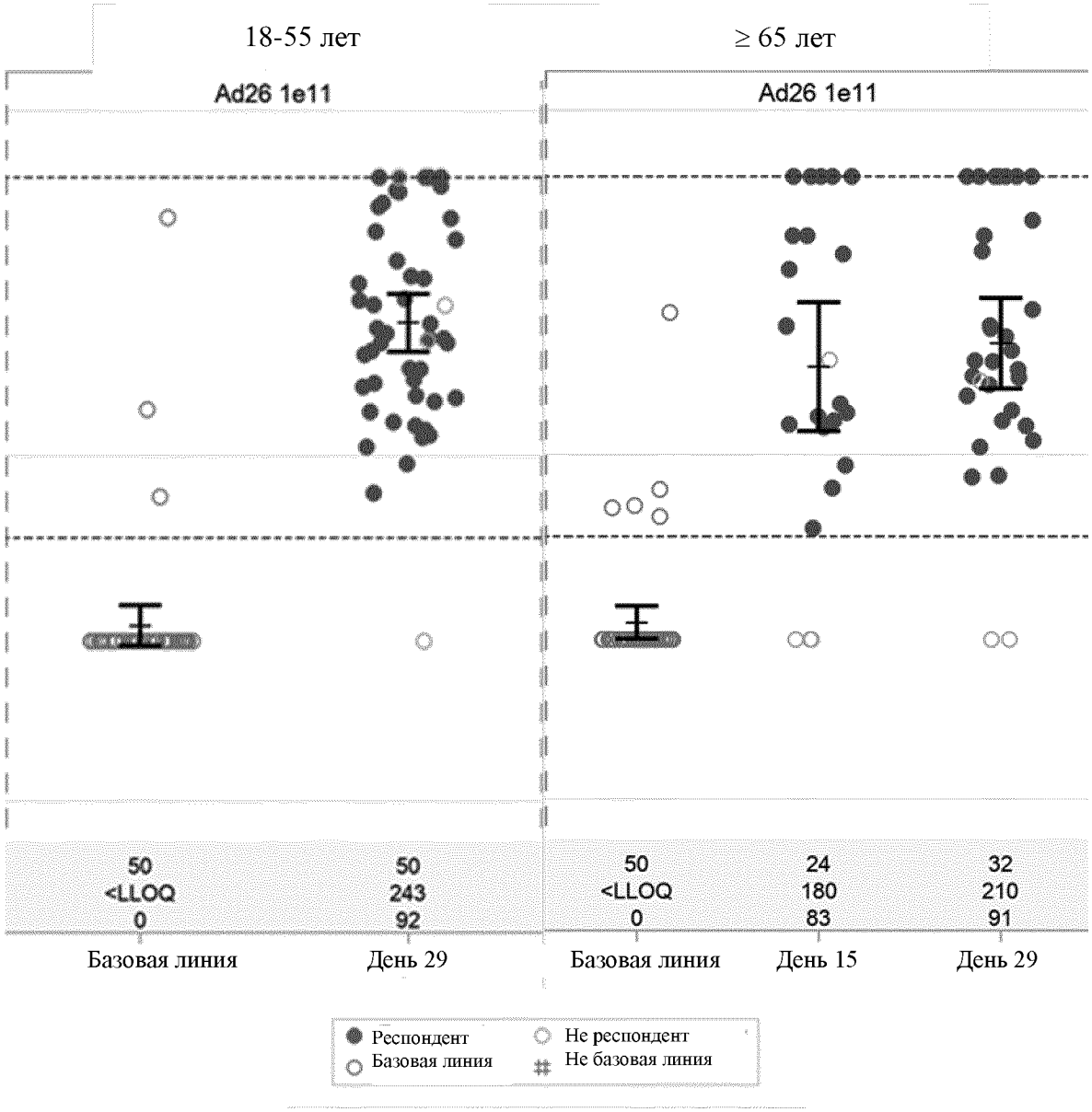
Фиг. 103D

Фиг. 104


SARS-CoV-2 Neut.Ab дикого типа (VICTORIA/1/2020) (Титр IC50)
Ad26 5e10
Ad26 1e11
Плацебо
1000
100
10
IC50
ULOQ
LLOQ
N
GMT
Респондент (%)
49
<LLOQ
0
24
197
87
32
221
90
50
<LLOQ
0
24
180
83
32
210
91
24
<LLOQ
0
11
<LLOQ
0
14
<LLOQ
0
Базовая линия
День 15
День 29
Базовая линия
День 15
День 29
Базовая линия
День 15
День 29
Респондент
Не респондент
Базовая линия
Не базовая линия

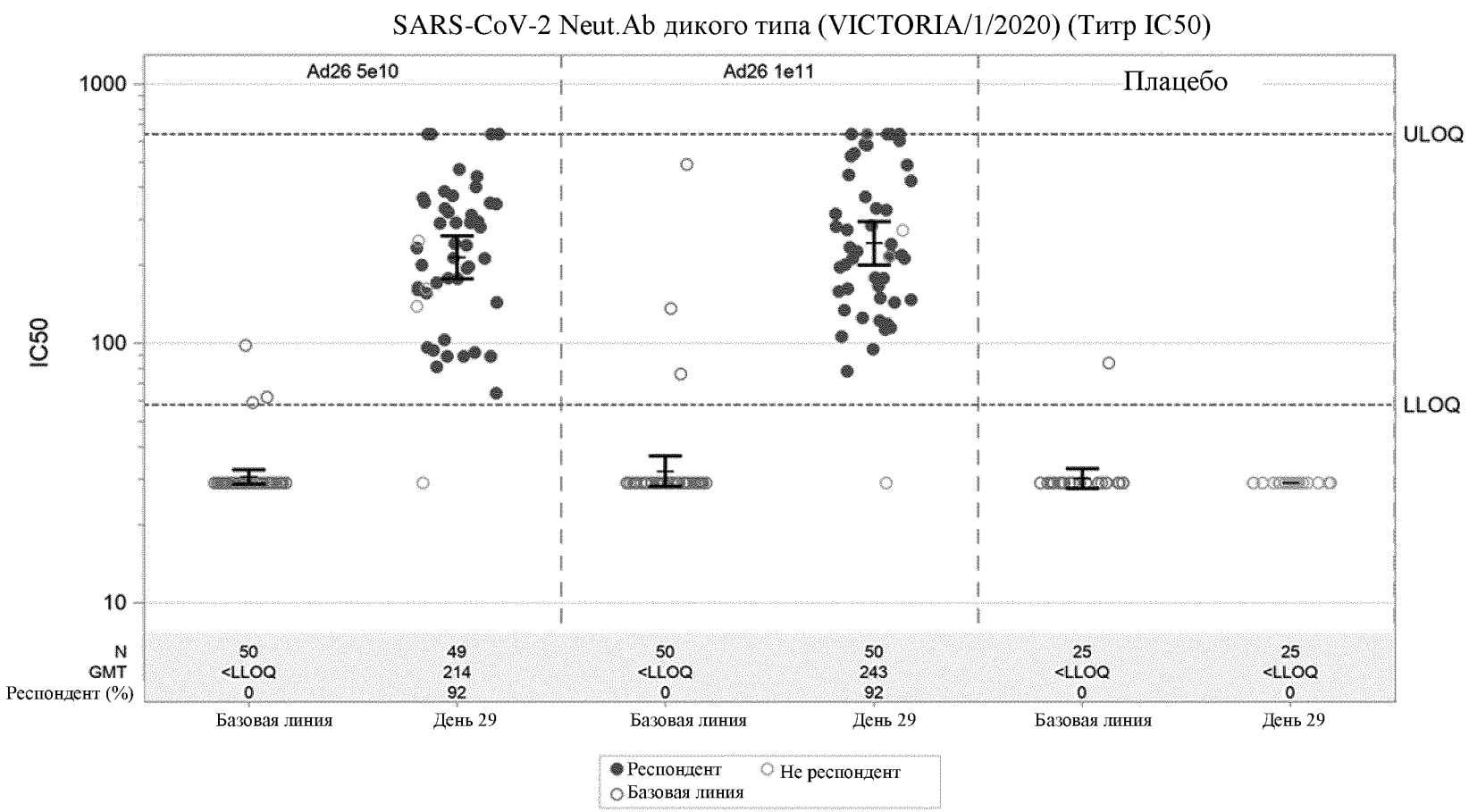

18-55 лет
≥ 65 лет
Ad26 5e10
Ad26 5e10
1000
100
10
IC50
N
GMT
Респондент (%)
50
<LLOQ
0
49
214
92
49
<LLOQ
0
24
197
87
32
221
90
Базовая линия
День 29
Базовая линия
День 15
День 29
Респондент
Базовая линия
Не респондент
Не базовая линия

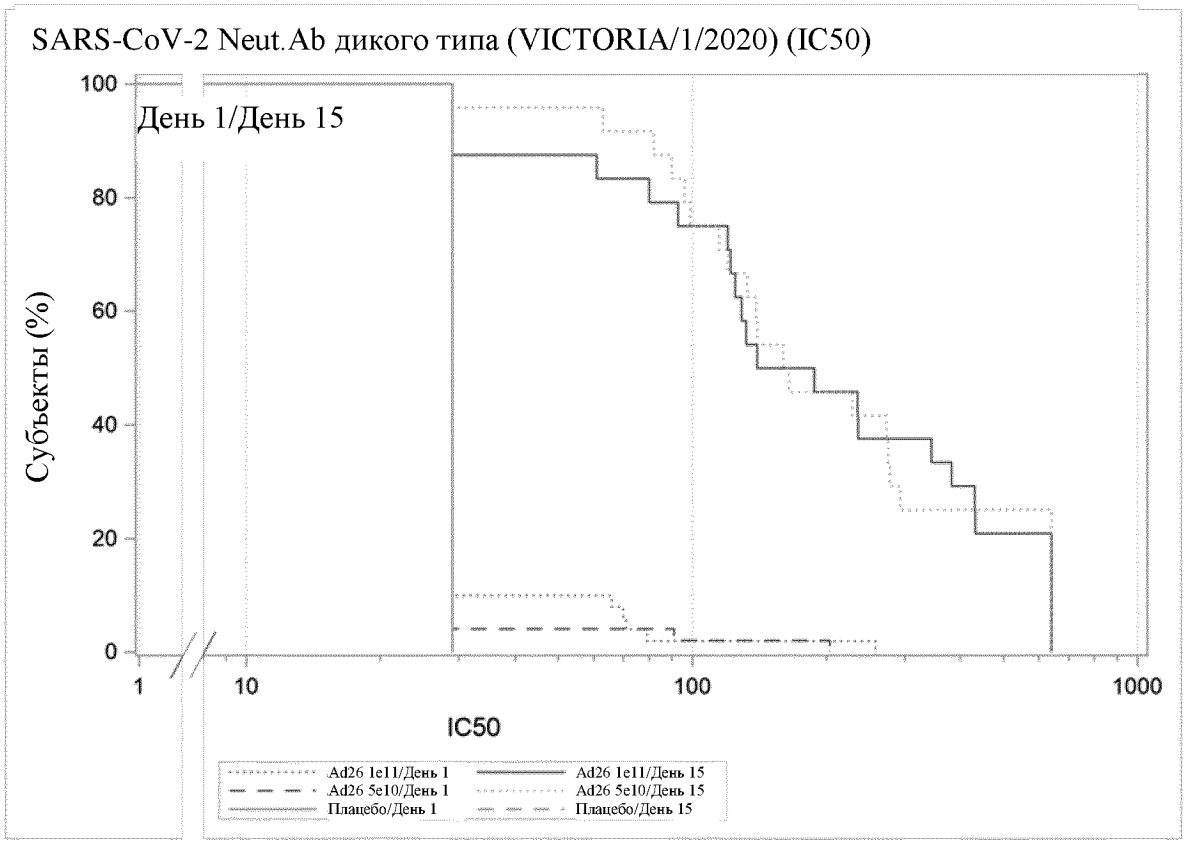
Фиг. 105

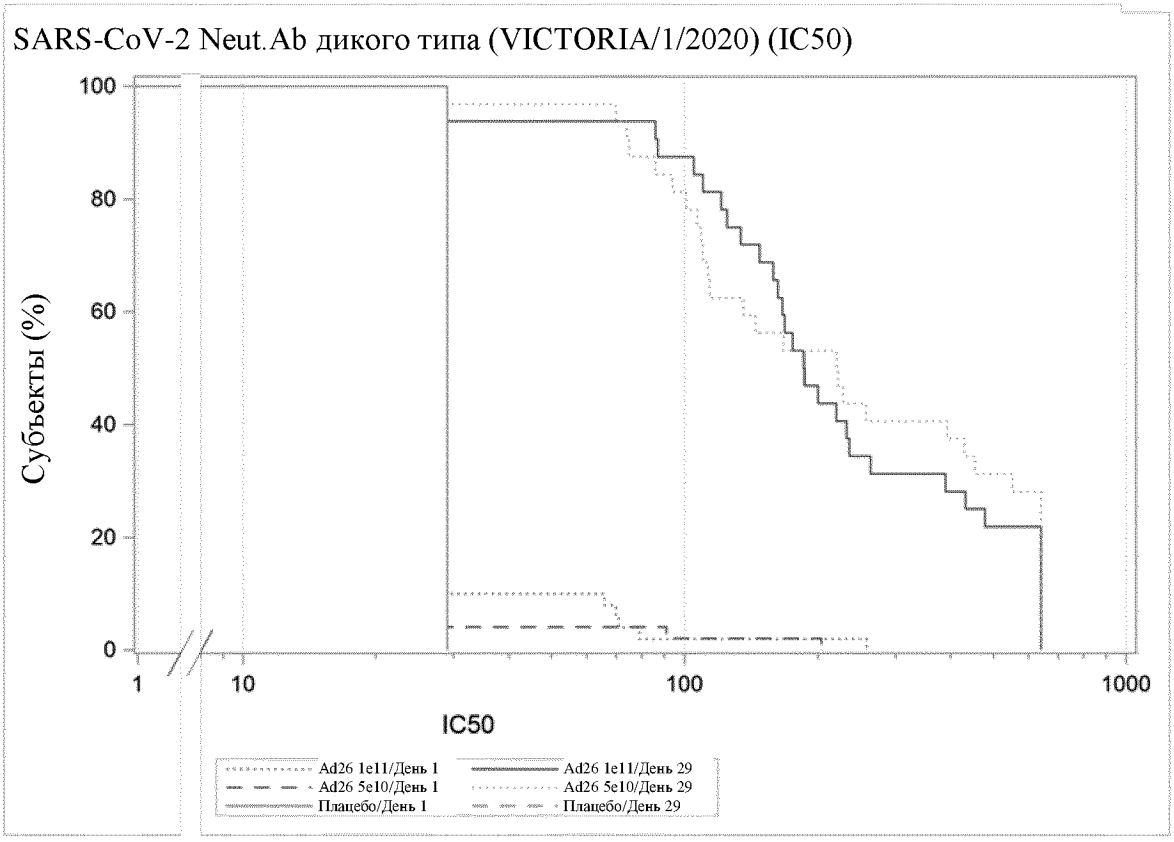


Фиг. 105 (продолжение)

Фиг. 106

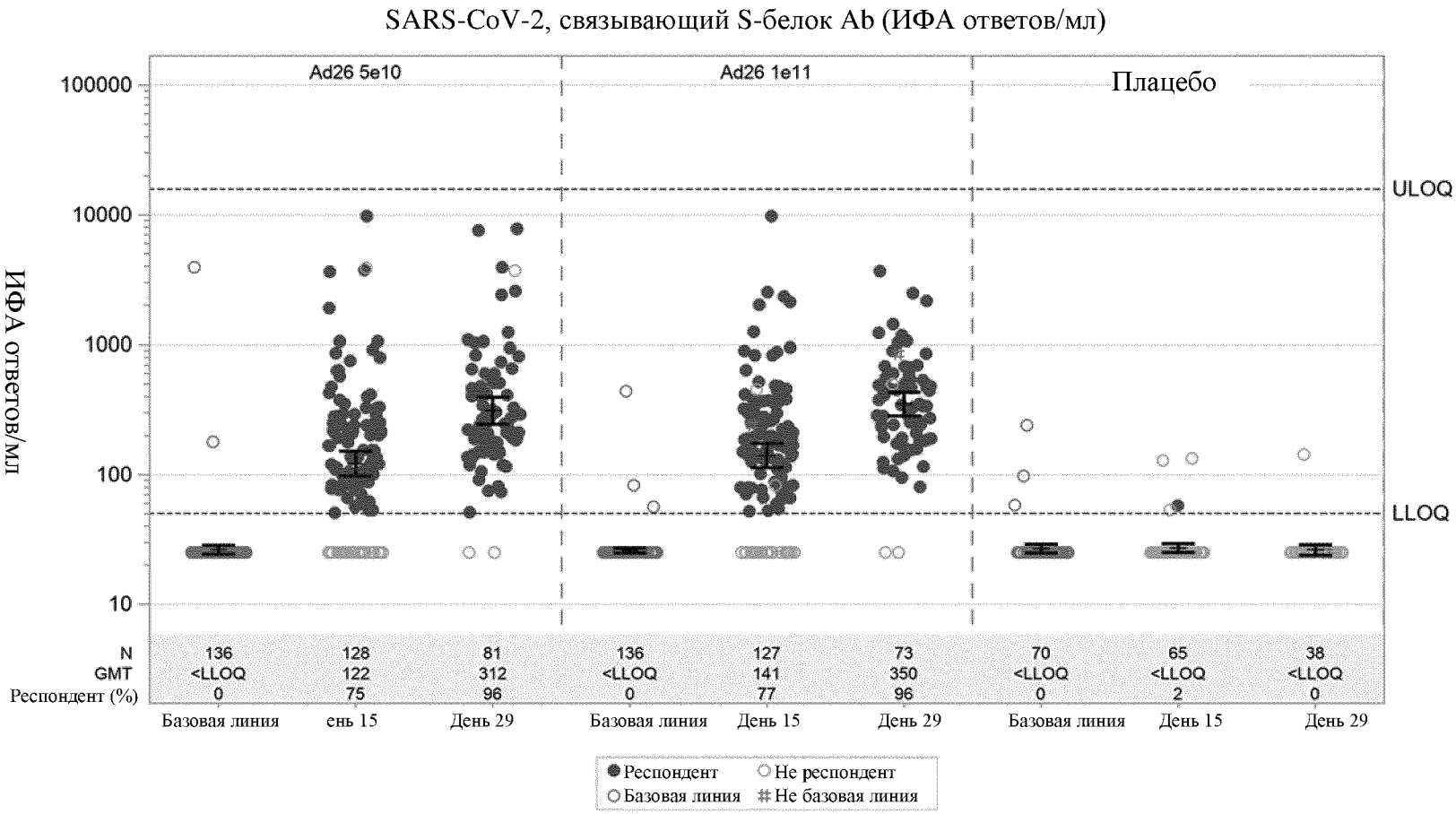

SARS-CoV-2 Neut.Ab дикого типа (VICTORIA/1/2020) (Титр IC50)
Ad26 5e10
Ad26 1e11
Плацебо
1000
100
10
IC50
ULOQ
LLOQ
N
GMT
Респондент (%)
50
<LLOQ
0
49
214
92
50
<LLOQ
0
50
243
92
25
<LLOQ
0
25
<LLOQ
0
Базовая линия
День 29
Базовая линия
День 29
Базовая линия
День 29
Респондент
Не респондент
Базовая линия

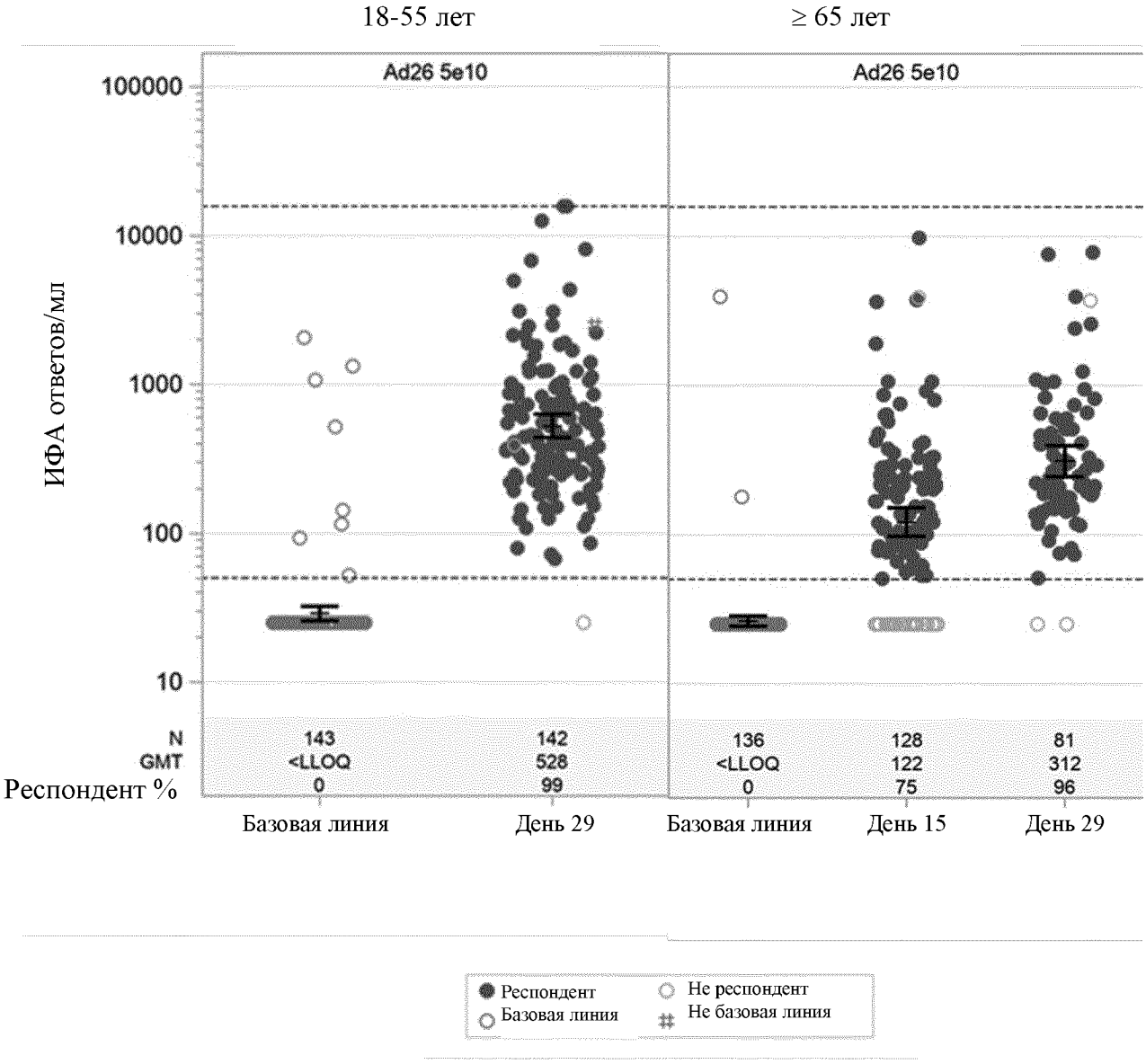

SARS-CoV-2 Neut.Ab дикого типа (VICTORIA/1/2020) (IC50)
День 1/День 15
Субъекты (%)
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
IC50
Ad26 1e11/День 1
Ad26 5e10/День 1
Плацебо/День 1
Ad26 1e11/День 15
Ad26 5e10/День 15
Плацебо/День 15


SARS-CoV-2 Neut.Ab дикого типа (VICTORIA/1/2020) (IC50)
Субъекты (%)
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
IC50
Ad26 1e11/День 1
Ad26 5e10/День 1
Плацебо/День 1
Ad26 1e11/День 29
Ad26 5e10/День 29
Плацебо/День 29

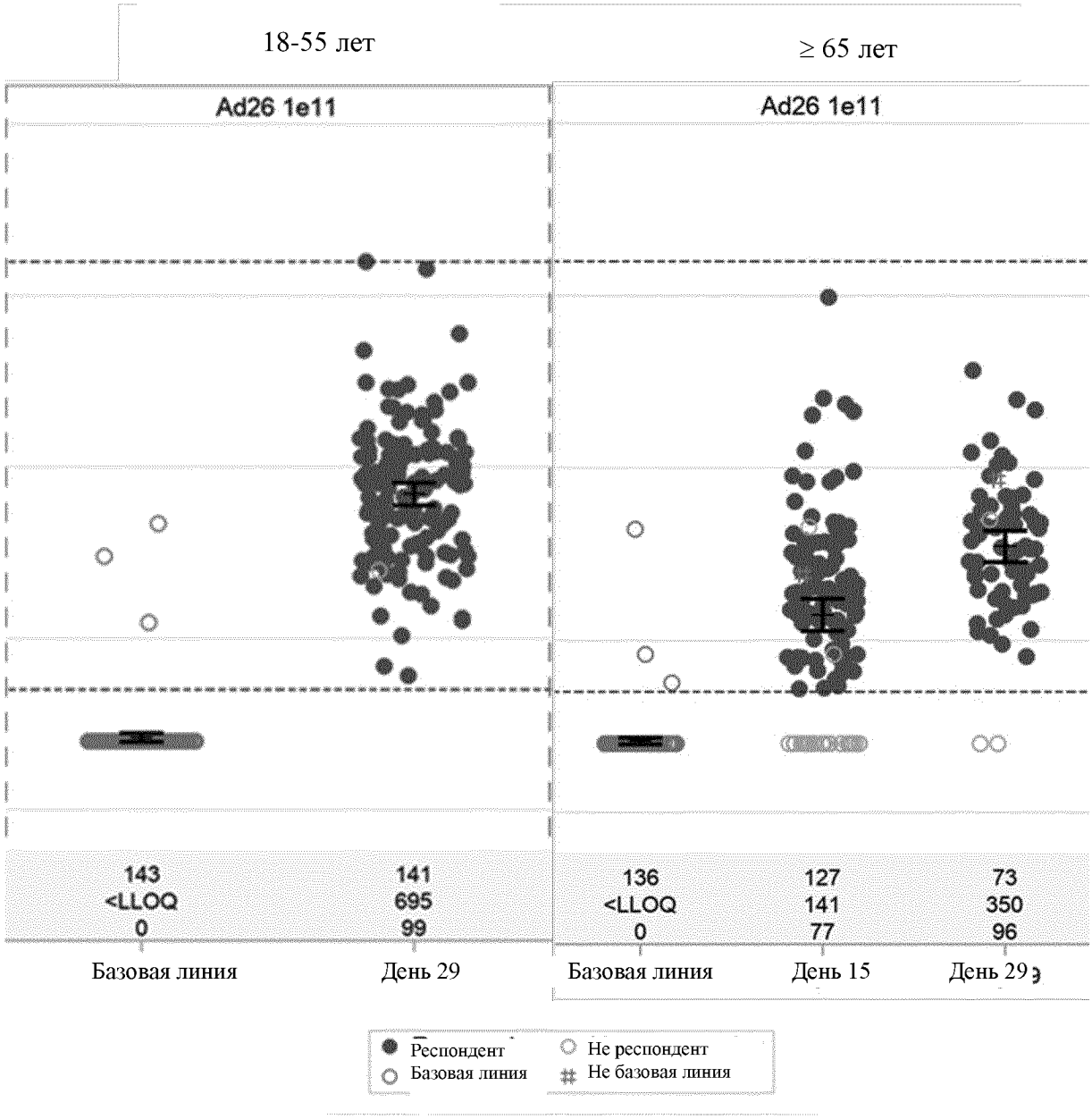
Фиг. 107

Фиг. 108


SARS-CoV-2, связывающий S-белок Ab (ИФА ответов/мл)
Ad26 5e10
Ad26 1e11
Плацебо
ИФА ответов/мл
100000
10000
1000
100
10
ULOQ
LLOQ
N 136 128 81 136 127 73 70 65 38
GMT <LLOQ 122 312 <LLOQ 141 350 <LLOQ <LLOQ <LLOQ
Респондент (%) 0 75 96 0 77 96 0 2 0
Базовая линия
ень 15
День 29
Базовая линия
День 15
День 29
Базовая линия
День 15
День 29
Респондент
Не респондент
Базовая линия
Не базовая линия

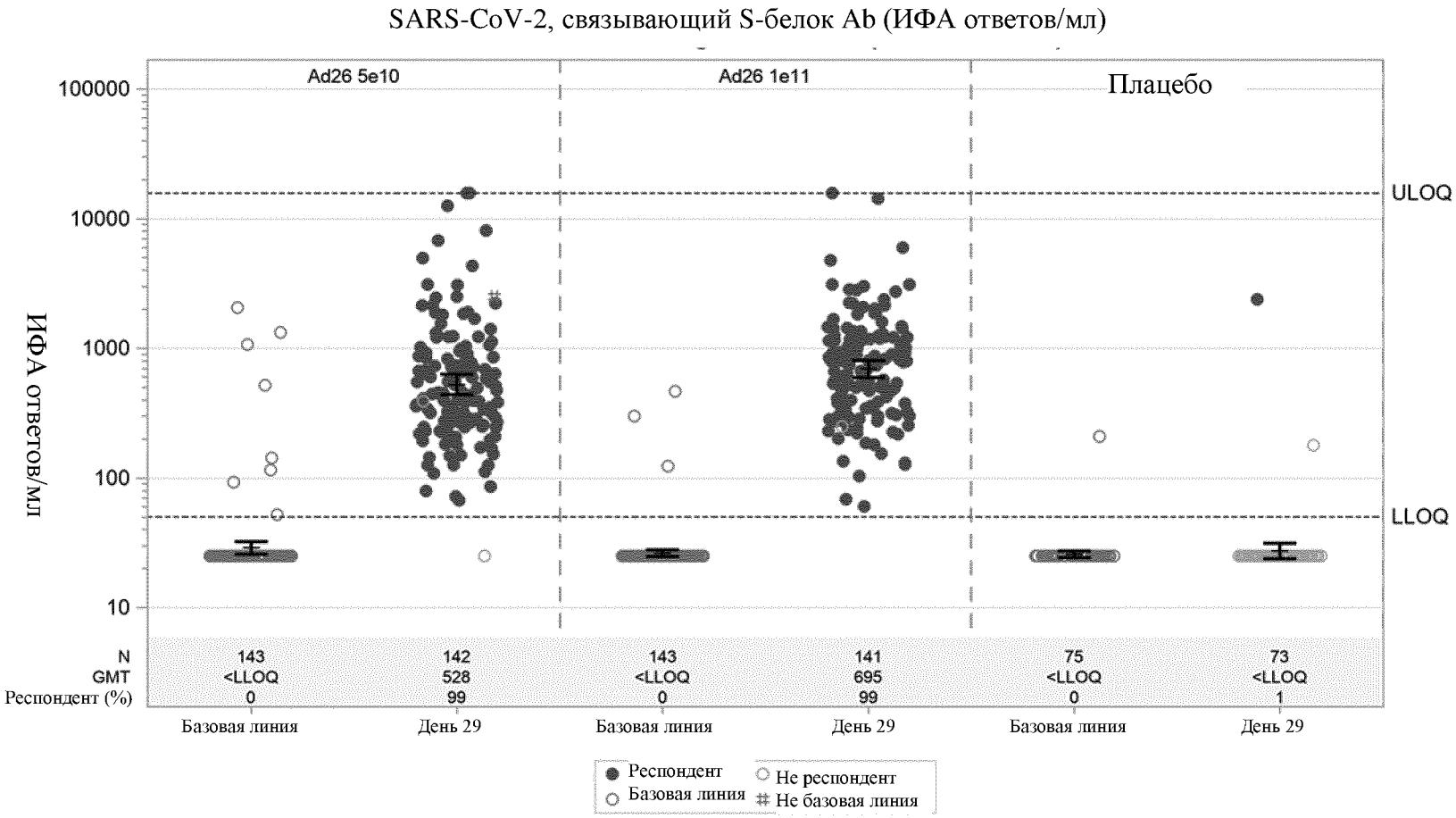

18-55 лет
≥ 65 лет
Ad26 5e10
Ad26 5e10
ИФА ответов/мл
100000
10000
1000
100
10
N
GMT
143
<LLOQ
0
142
528
99
136
<LLOQ
0
128
122
75
81
312
96
Респондент %
Базовая линия
День 29
Базовая линия
День 15
День 29
Респондент
Базовая линия
Не респондент
Не базовая линия

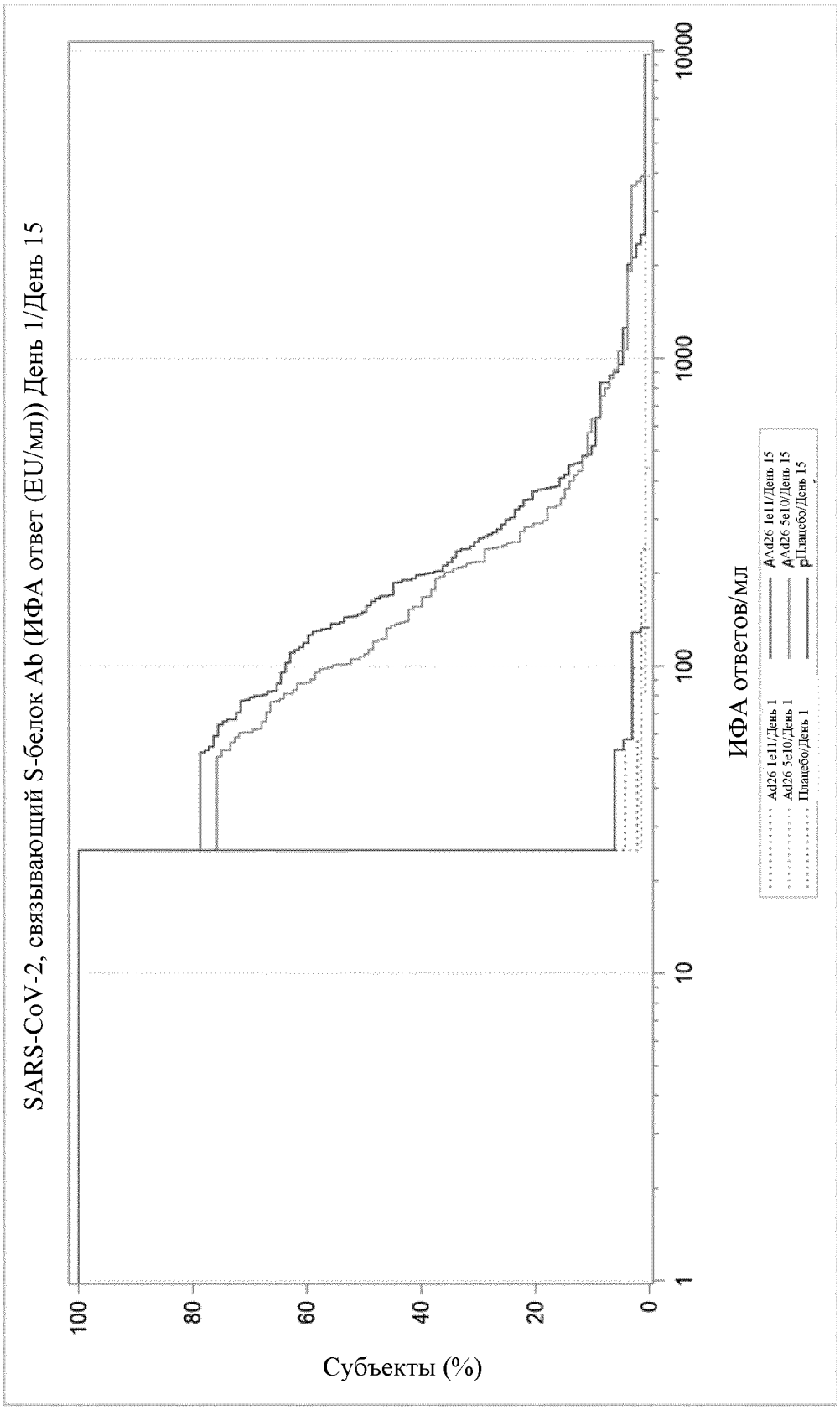
Фиг. 109



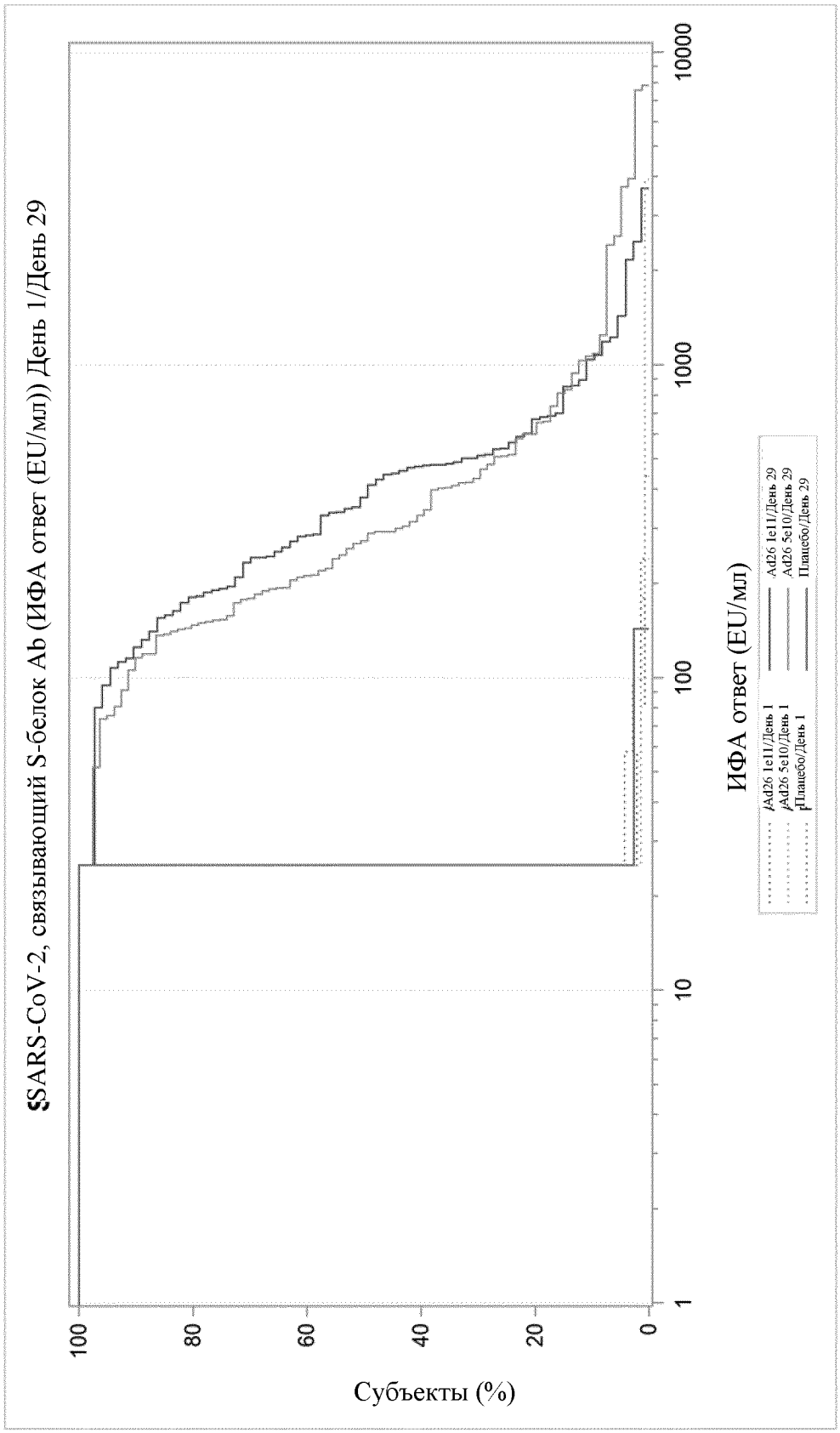
Фиг. 109 (продолжение)

Фиг. 110

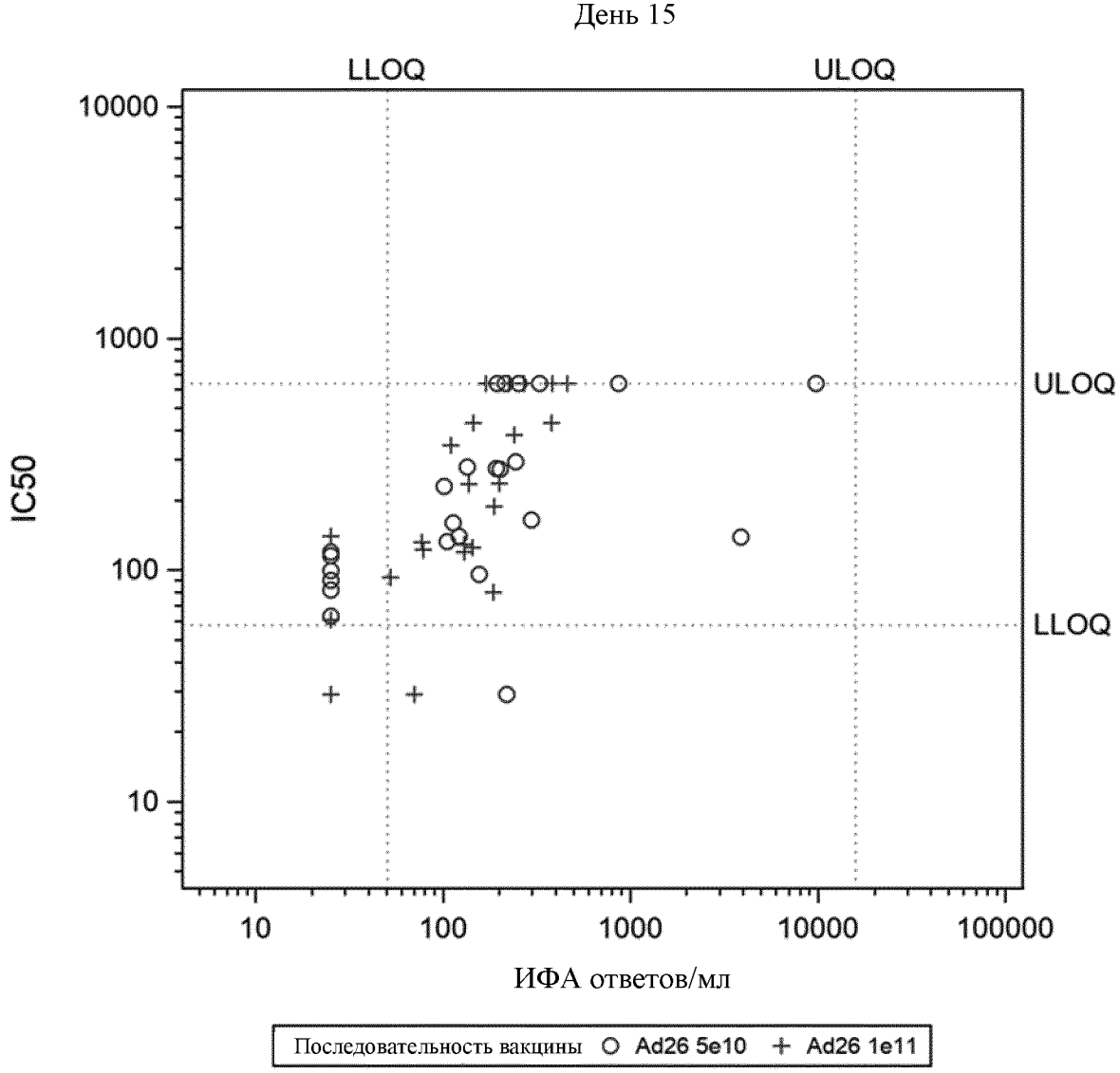

SARS-CoV-2, связывающий S-белок Ab (ИФА ответов/мл)
Ad26 5e10
Ad26 1e11
Плацебо
ULOQ
LLOQ
ИФА ответов/мл
100000
10000
1000
100
10
N
GMT
Респондент (%)
143
<LLOQ
0
142
528
99
143
<LLOQ
0
141
695
99
75
<LLOQ
0
73
<LLOQ
1
Базовая линия
День 29
Базовая линия
День 29
Базовая линия
День 29
Респондент
Не респондент
Базовая линия
Не базовая линия


SARS-CoV-2, связывающий S-белок Ab (ИФА ответ (EU/мл)) День 1/День 15
Субъекты (%)
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
ИФА ответов/мл
Ad26 1e11/День 1
Ad26 5e10/День 1
Плацебо/День 1
Ad26 1e11/День 15
Ad26 5e10/День 15
Плацебо/День 15

Фиг. 111

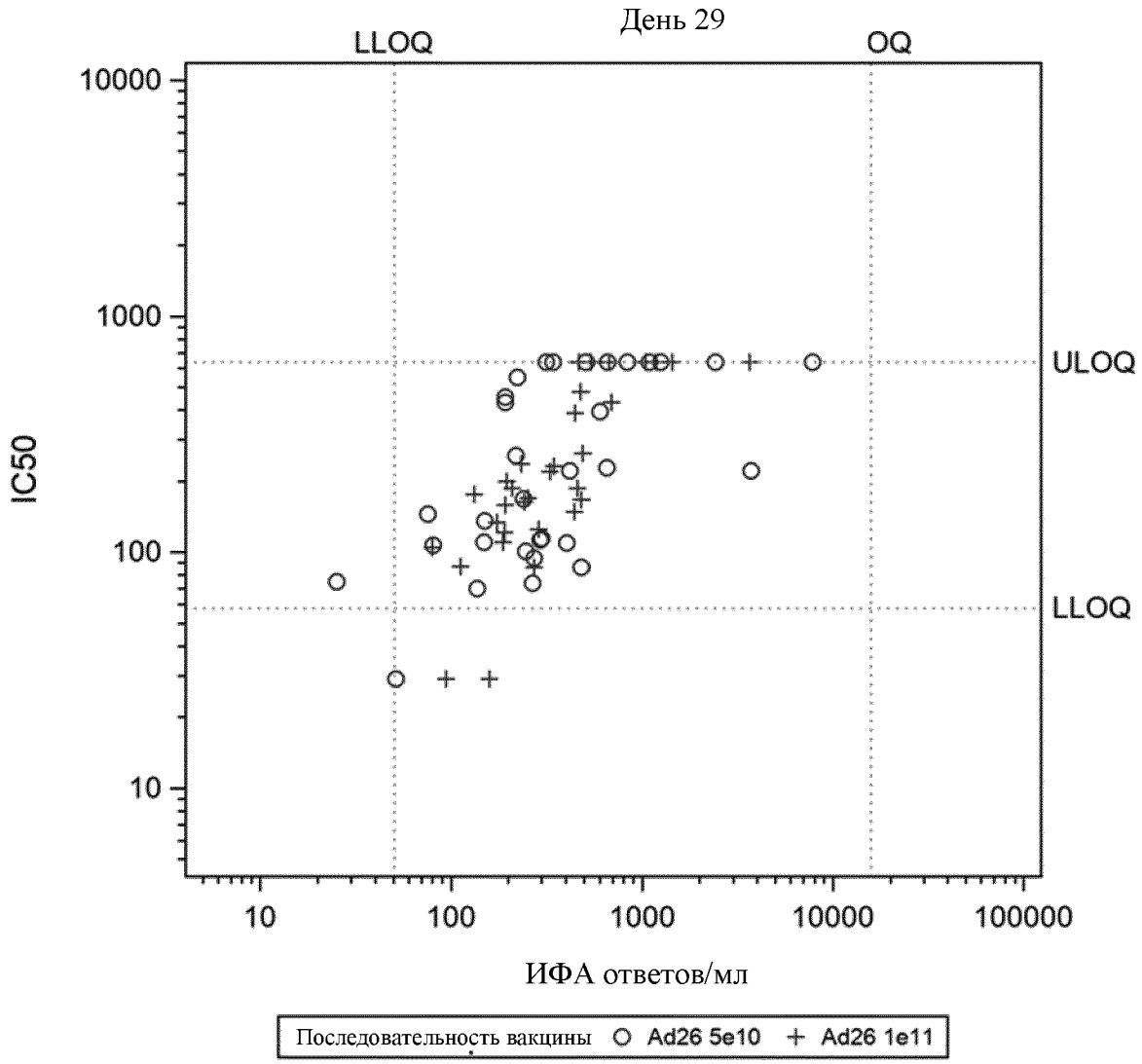


Фиг. 111 (продолжение)



Корреляция Спирмена = 0,734

Фиг. 112

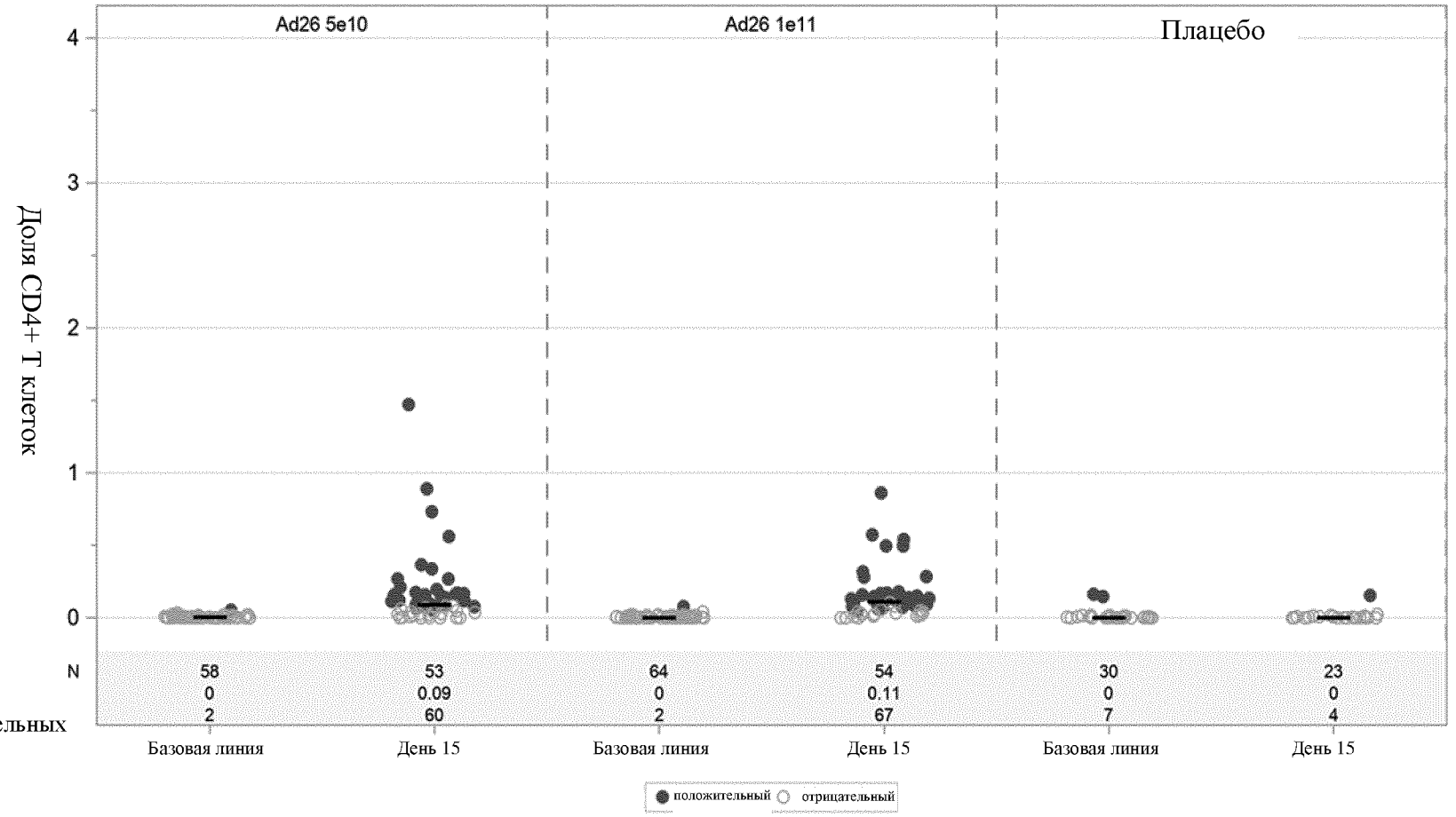


Корреляция Спирмена = 0,72

Фиг. 112 (продолжение)

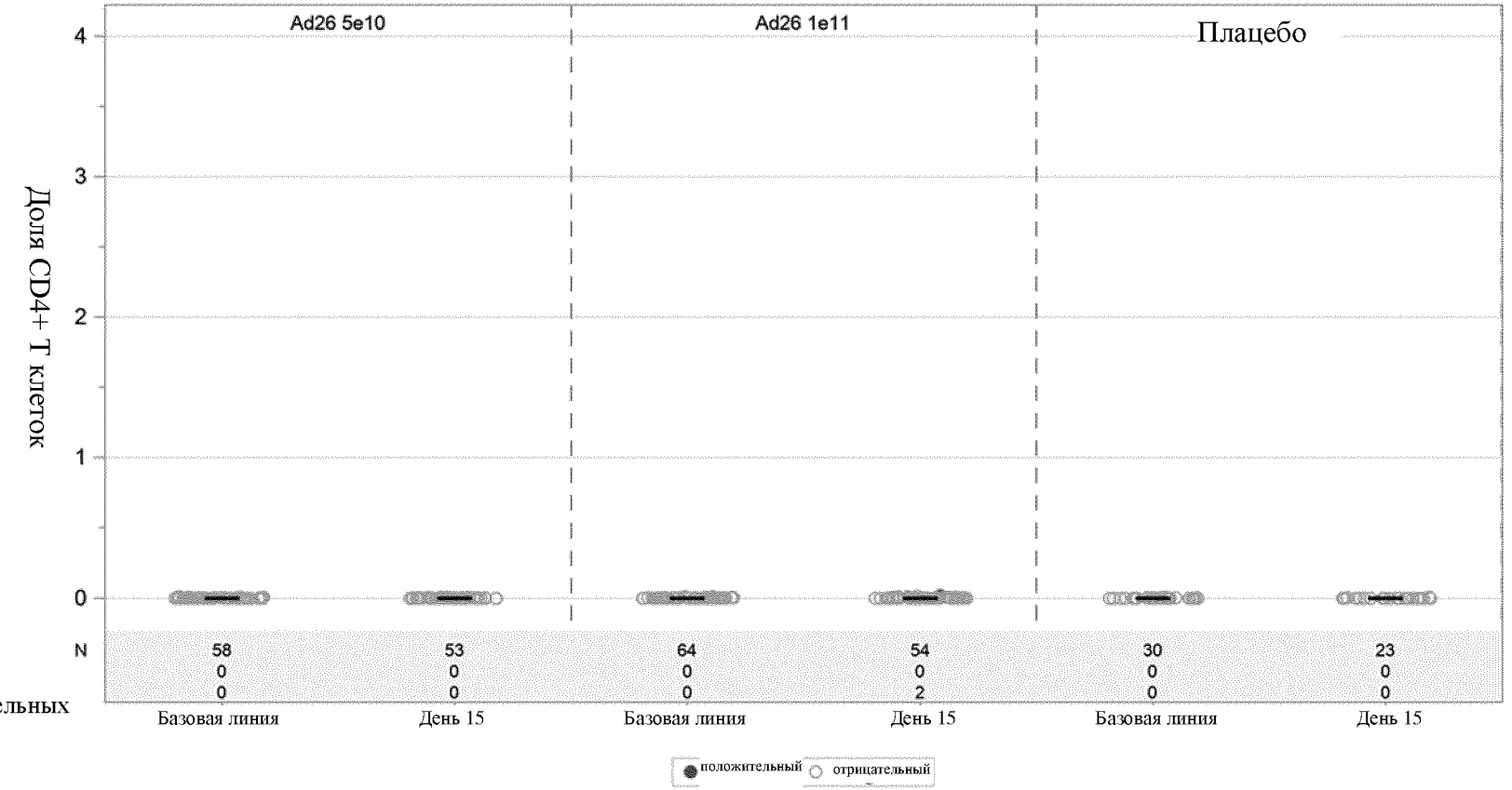
Фиг. 113

Доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1), а не цитокины Th2, и экспрессирующие IL-4 и/или IL-5/IL-13 и CD40L (Th2)



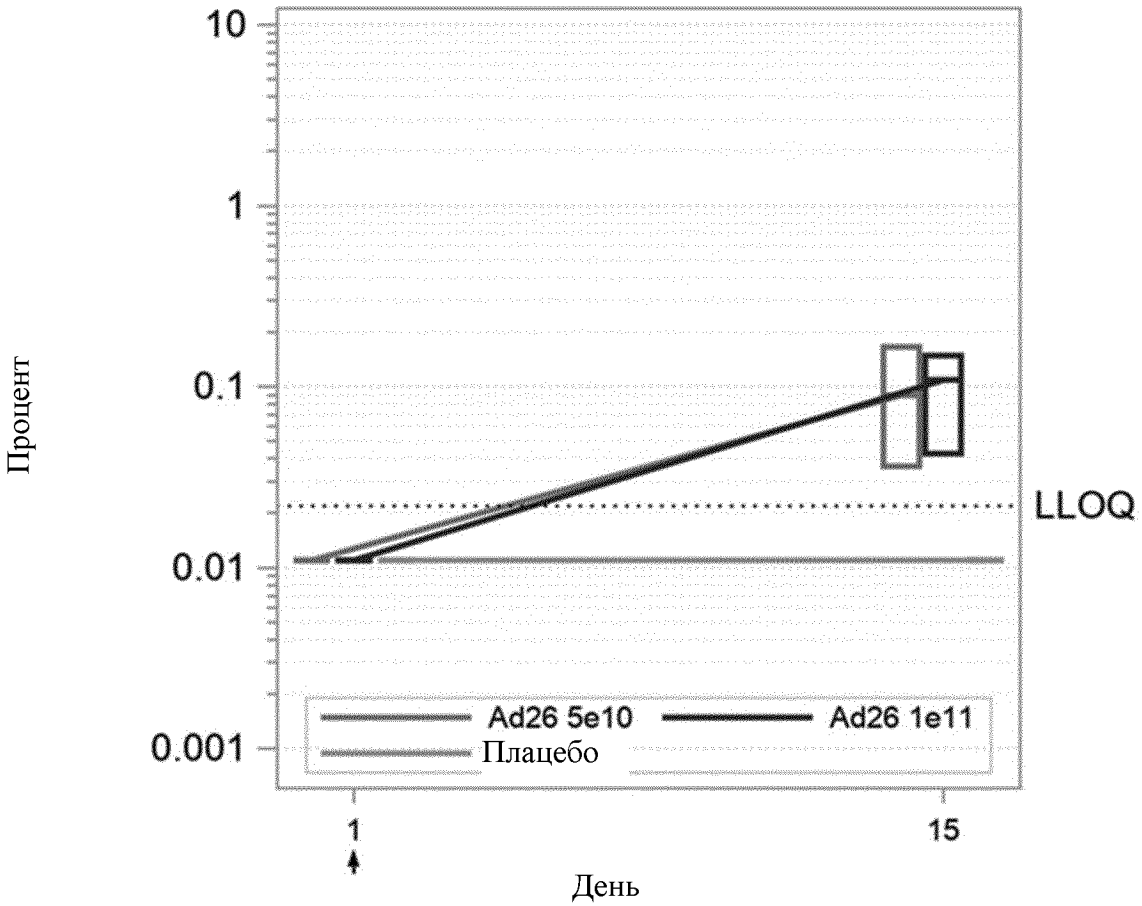
Фиг. 113 (продолжение)

Доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1), а не цитокины Th2, и экспрессирующие IL-4 и/или IL-5/IL-13 и CD40L (Th2)



Среднее
% положительных
ответов

Доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1), а не цитокины Th2

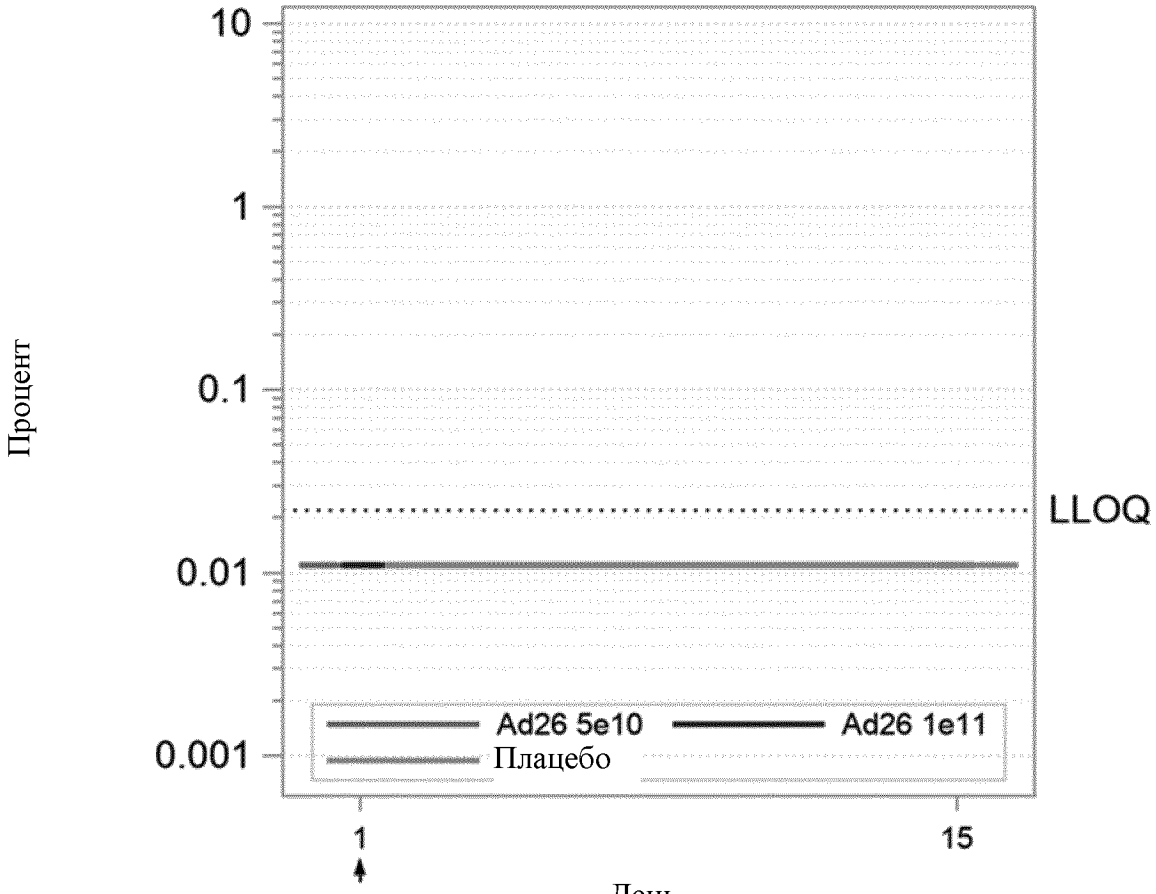


Число субъектов

Ad26 5e10	58	53
Ad26 1e11	64	54
Плацебо	30	23

Фиг. 114

Доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IL4+ или IL5+ или IL13+ и CD40L+

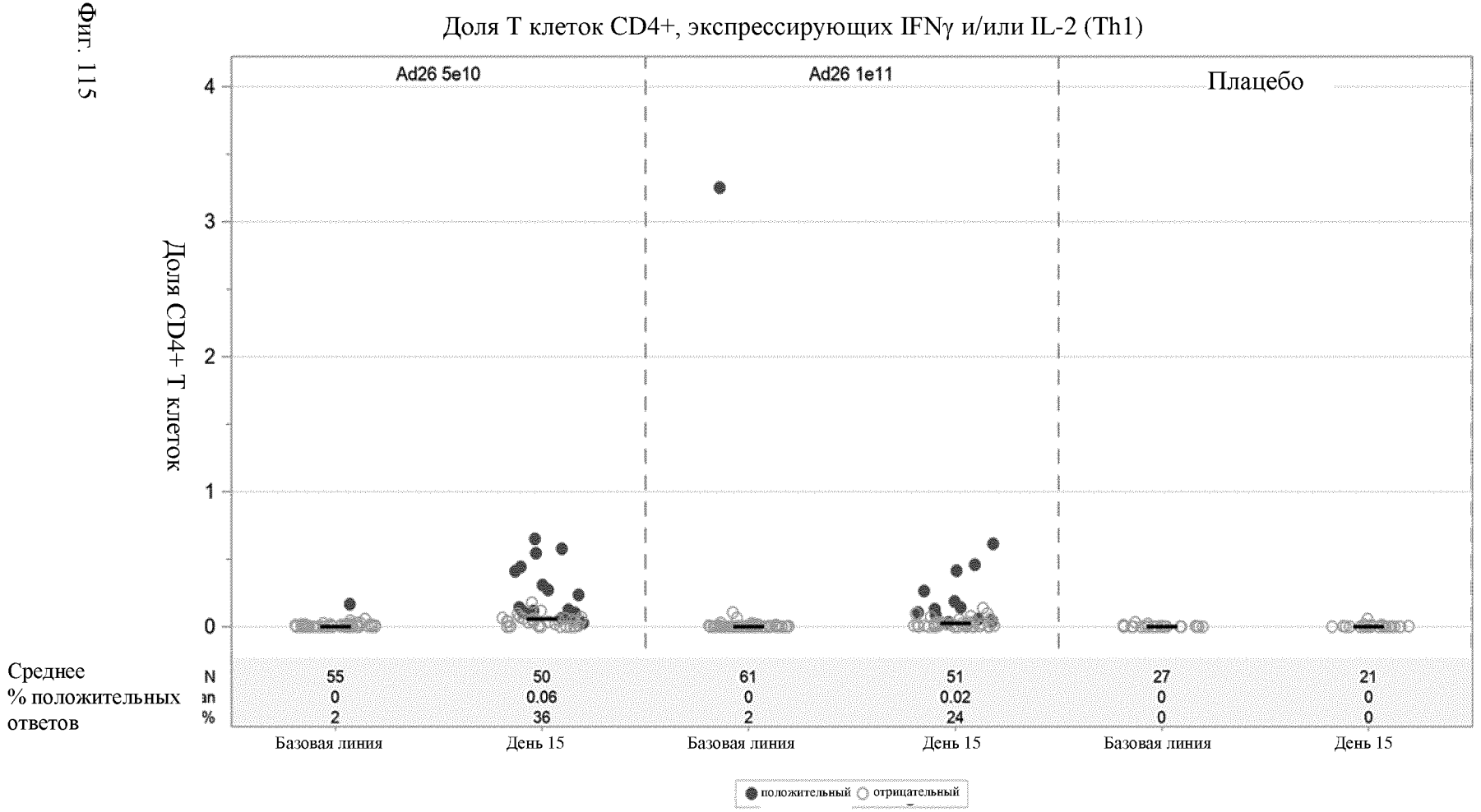


Число субъектов

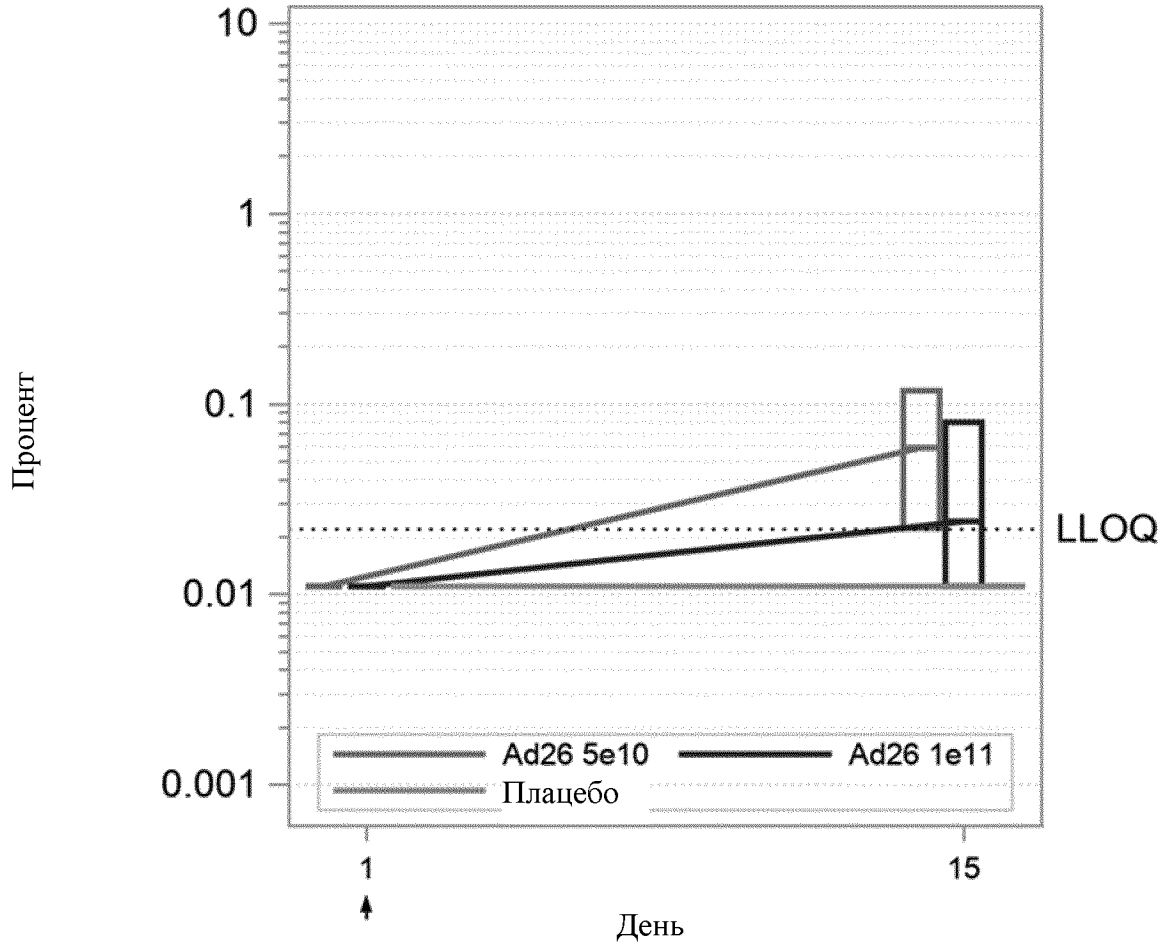
Ad26 5e10	58	53
Ad26 1e11	64	54
Плацебо	30	23

Фиг. 114 (продолжение)

Фиг. 115


Доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1)
Ad26 5e10
Ad26 1e11
Плацебо
Доля CD4+ Т клеток
4
3
2
1
0
Среднее
% положительных
ответов
N
an
%
55
0
2
50
0.06
36
61
0
2
51
0.02
24
27
0
0
21
0
0
Базовая линия
День 15
Базовая линия
День 15
Базовая линия
День 15
положительный
отрицательный

Доля Т клеток CD8+, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1)

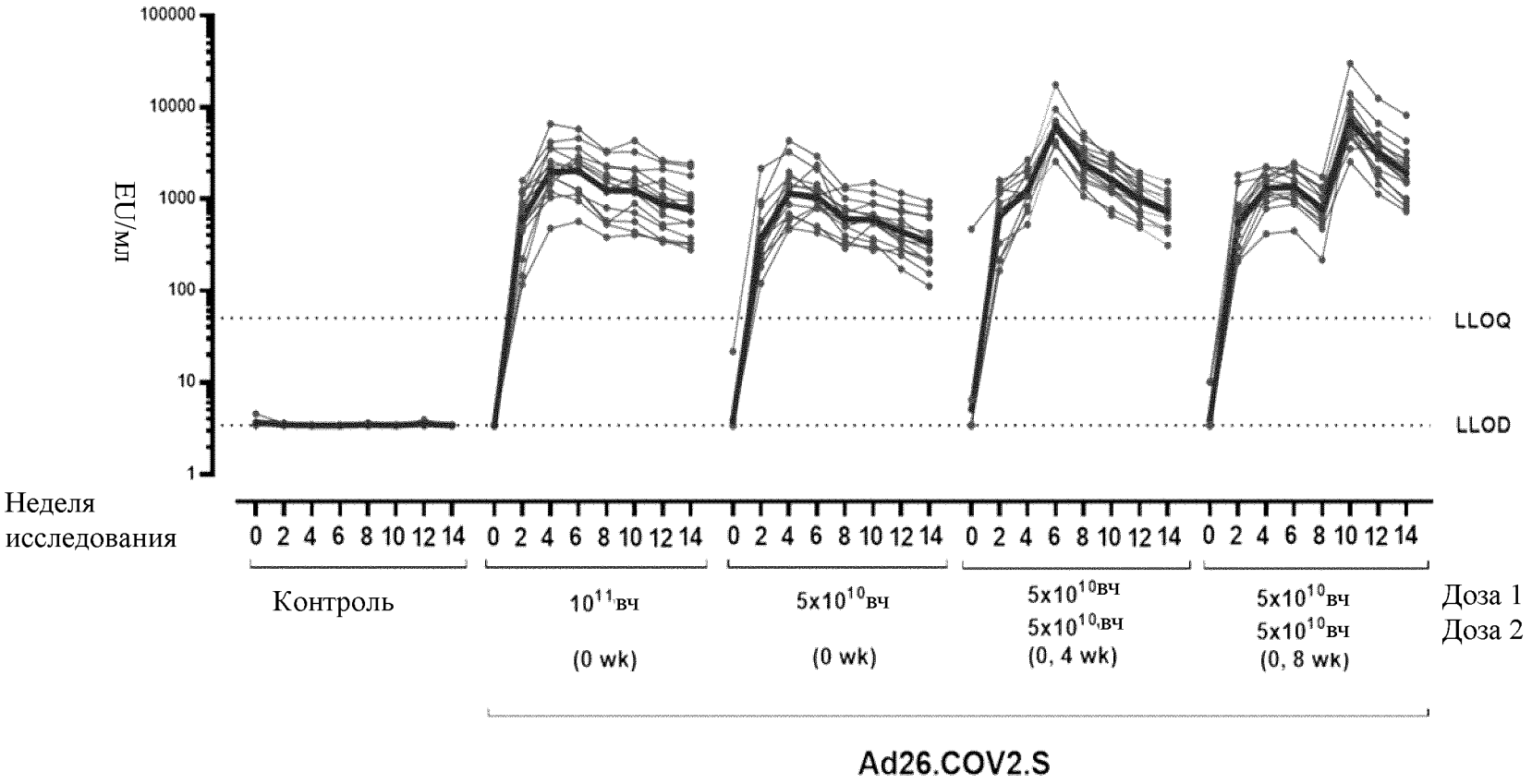


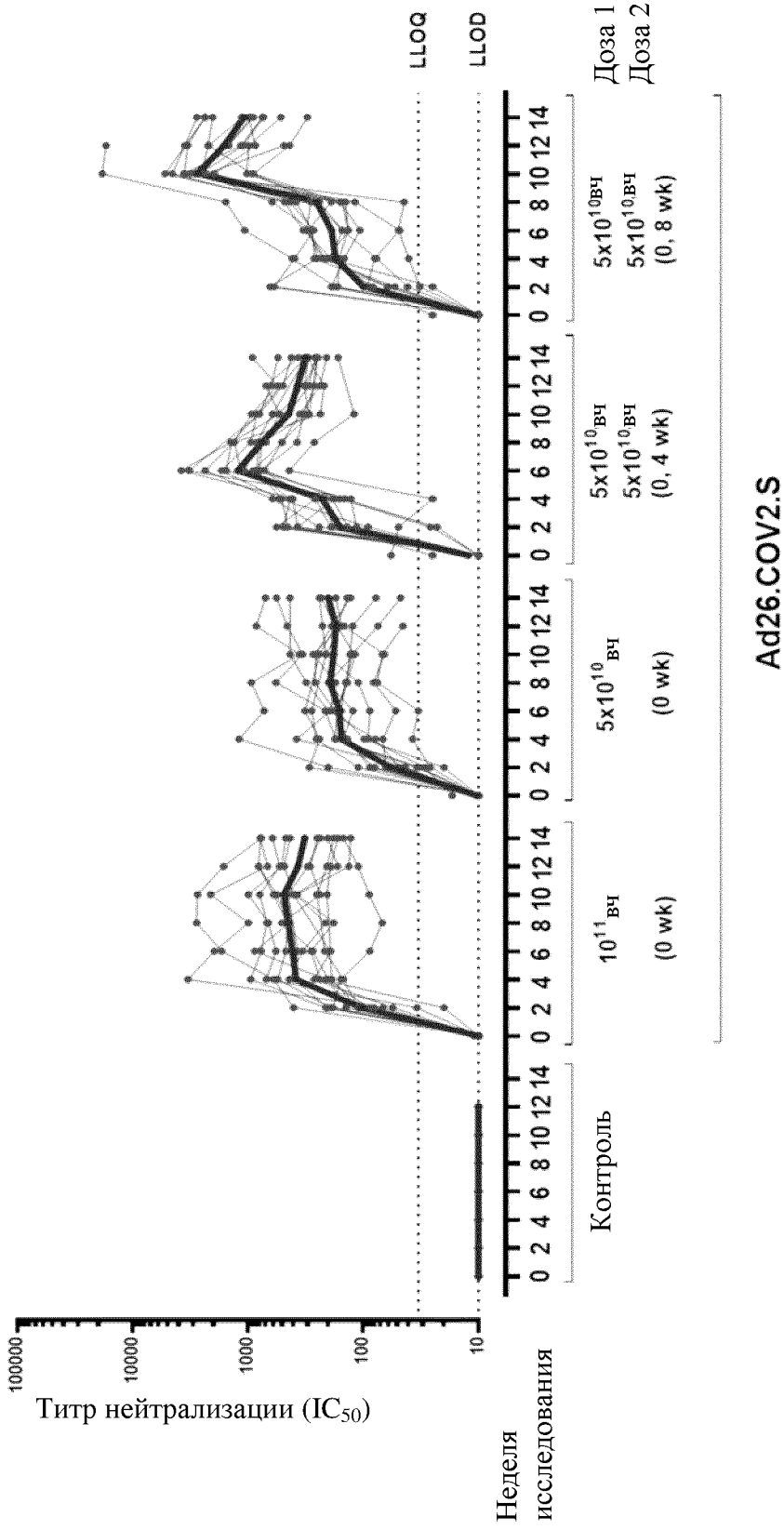
Число субъектов

Ad26 5e10	55	50
Ad26 1e11	61	51
Плацебо	27	21

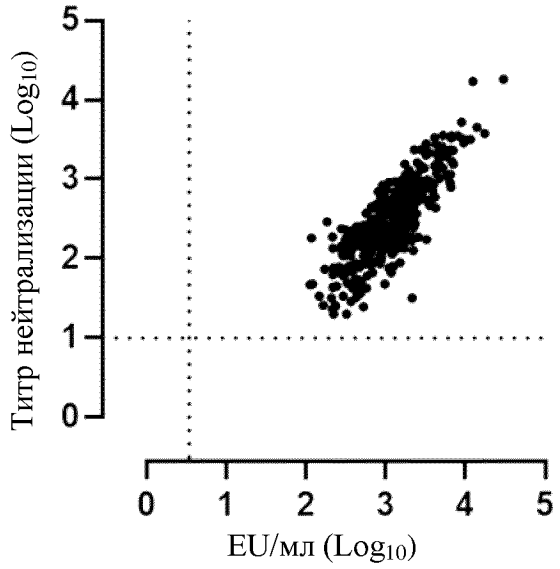
Фиг. 116

Фиг. 117A

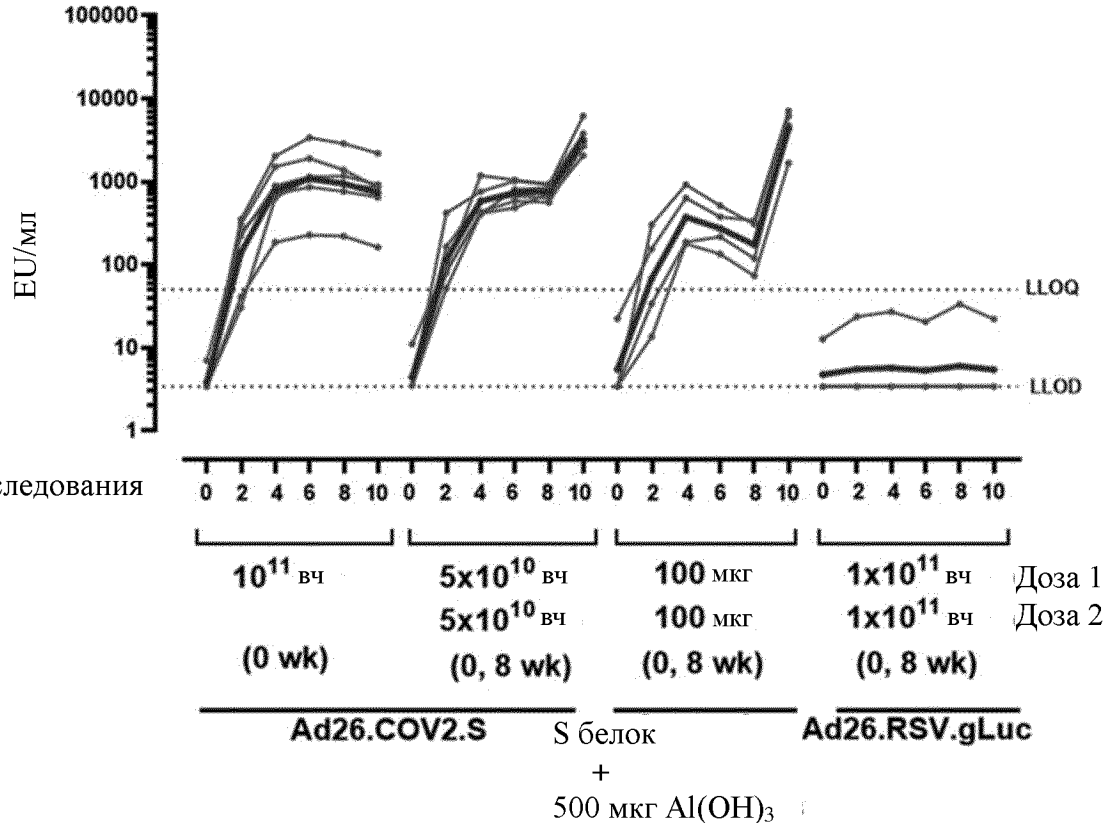

100000
10000
1000
100
10
1
EU/мл
LLOQ
LLOD
Неделя исследования
0 2 4 6 8 10 12 14
Контроль
10^{11}вч
(0 wk)
$5x10^{10}$вч
(0 wk)
$5x10^{10}$вч
$5x10^{10}$вч
(0, 4 wk)
$5x10^{10}$вч
$5x10^{10}$вч
(0, 8 wk)
Доза 1
Доза 2
Ad26.COV2.S


LLOQ
LLOD
100000
10000
1000
100
10
Титр нейтрализации (IC_{50})
0 2 4 6 8 10 12 14 0 2 4 6 8 10 12 14 0 2 4 6 8 10 12 14 0 2 4 6 8 10 12 14
Неделя исследования
Контроль
10^{11} вч (0 wk)
$5x10^{10}$ вч (0 wk)
$5x10^{10}$ вч $5x10^{10}$ вч (0, 4 wk)
$5x10^{10}$ вч $5x10^{10}$ вч (0, 8 wk)
Доза 1
Доза 2
Ad26.COV2.S

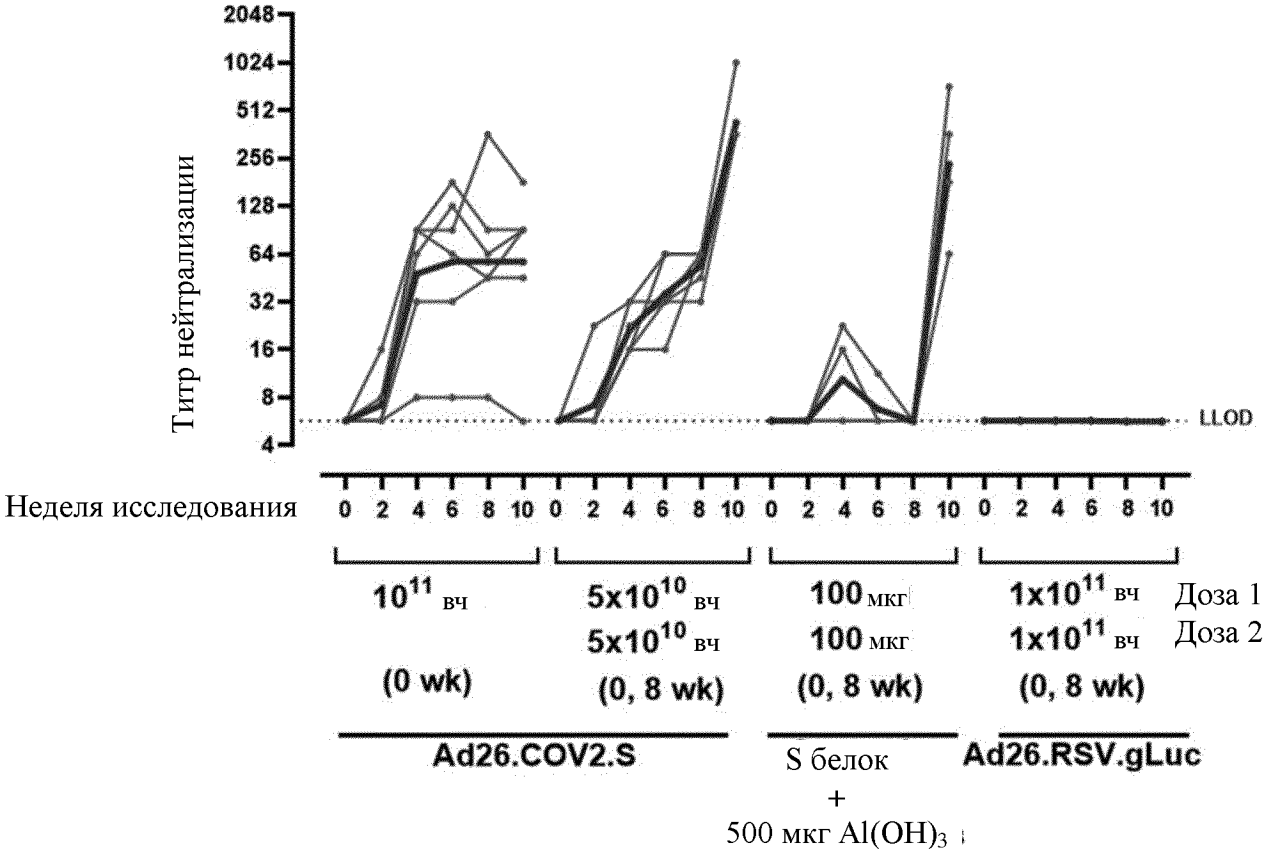
Фиг. 117B



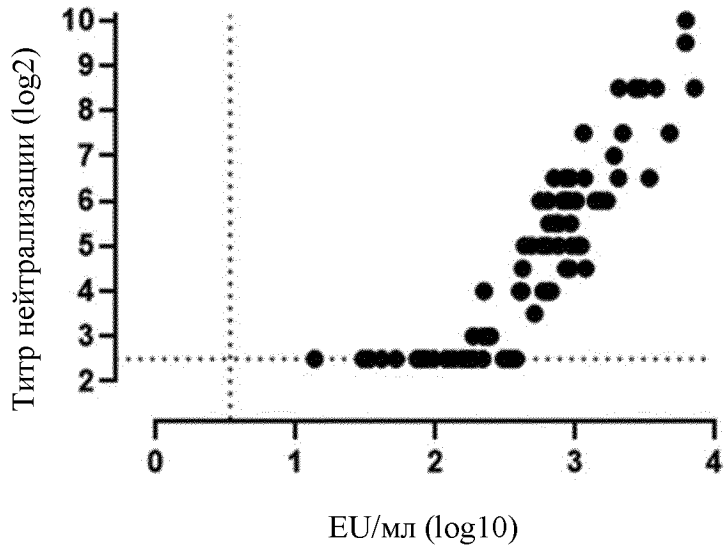
Фиг. 117C



Фиг. 118A

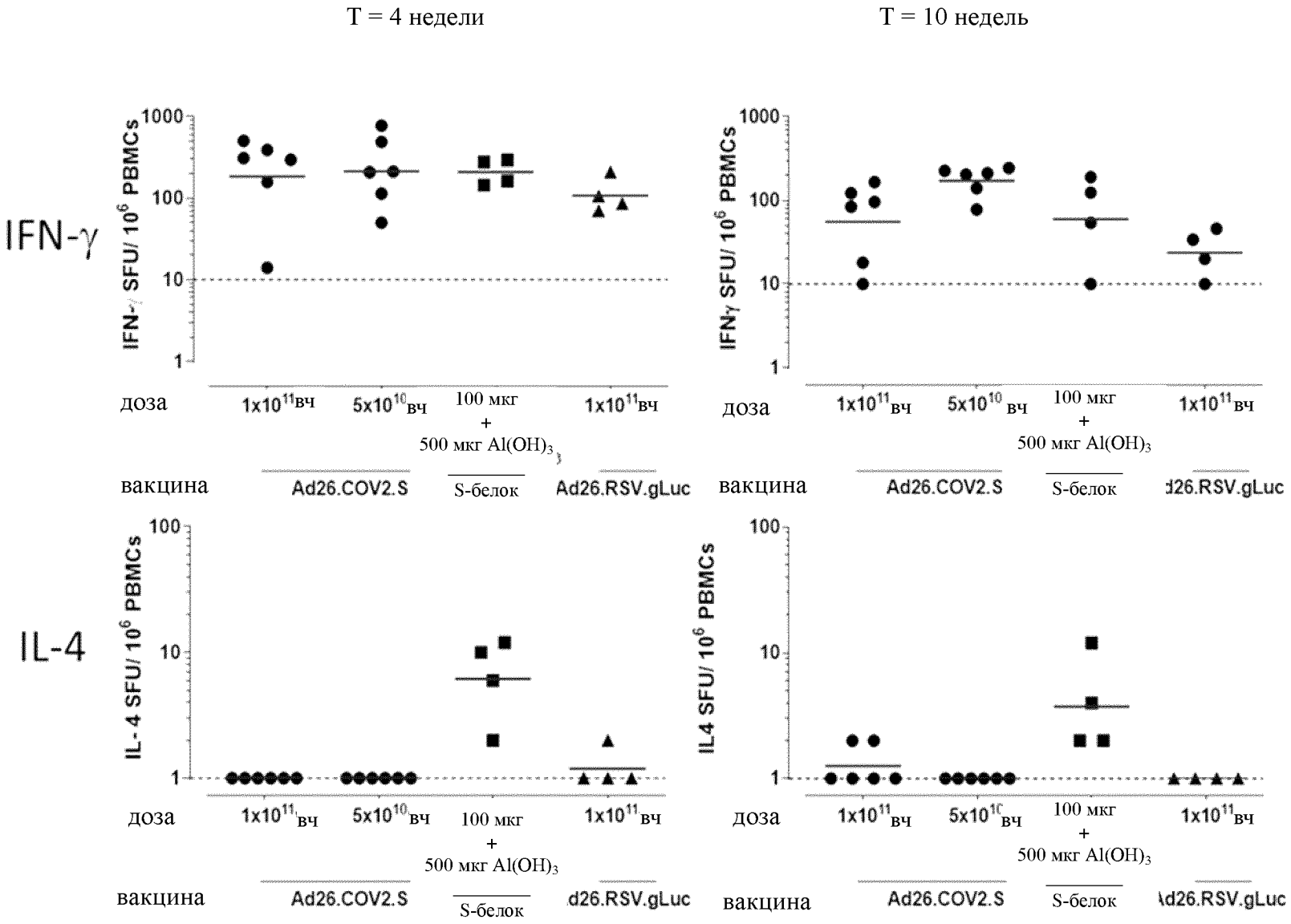


Фиг. 118B

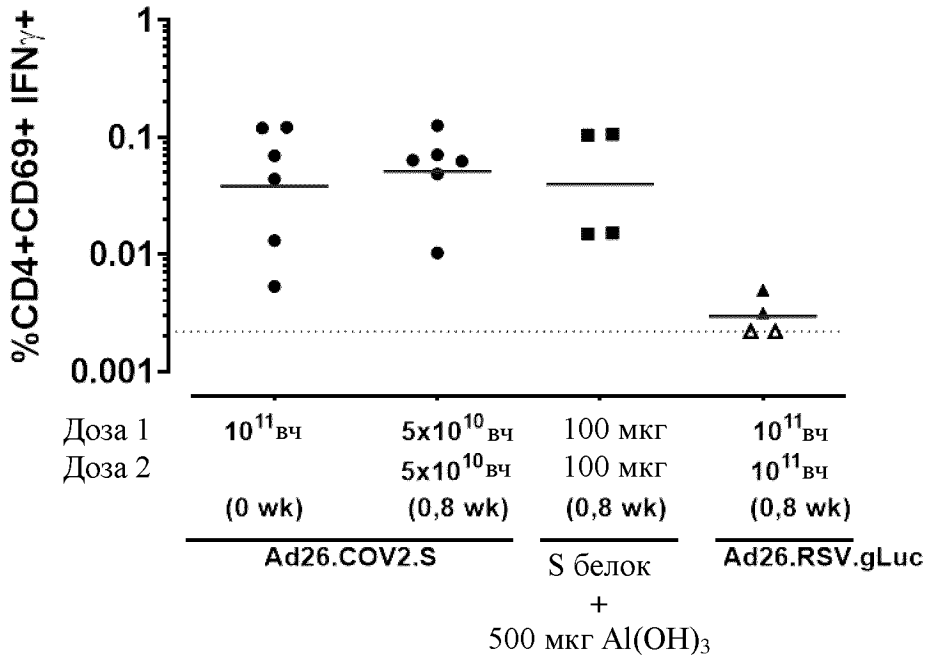


Фиг. 118C

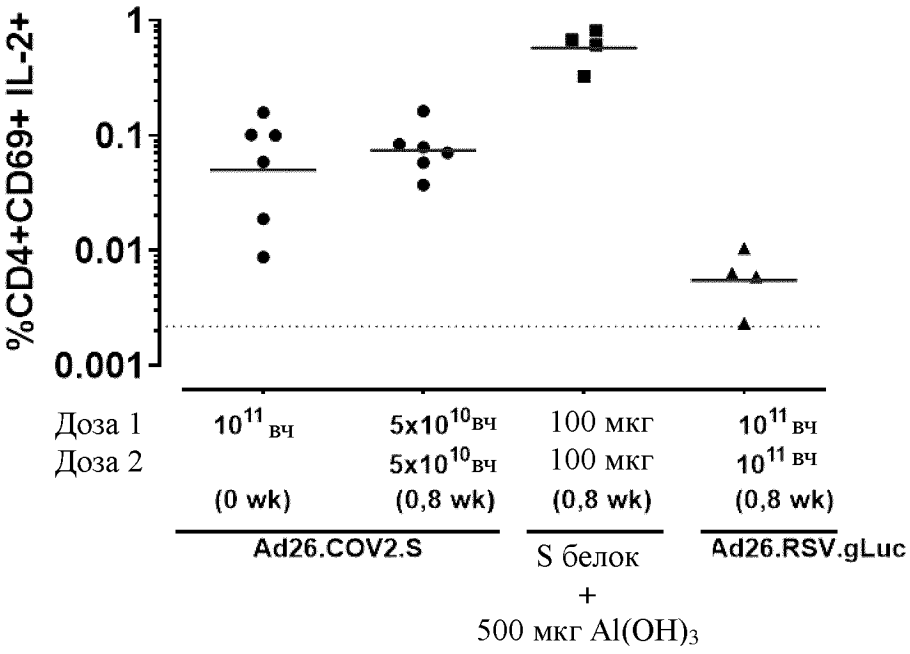
Фиг. 119A


T = 4 недели
T = 10 недель
IFN-γ
IL-4
IFN-γ SFU/ 10^6 PBMCs
IL-4 SFU/ 10^6 PBMCs
IL4 SFU/ 10^6 PBMCs
1000
100
10
1
доза
1x10^11 вч
5x10^10 вч
100 мкг + 500 мкг Al(OH)3
вакцина
Ad26.COV2.S
S-белок
Ad26.RSV.gLuc

Неделя 4 - IFNγ

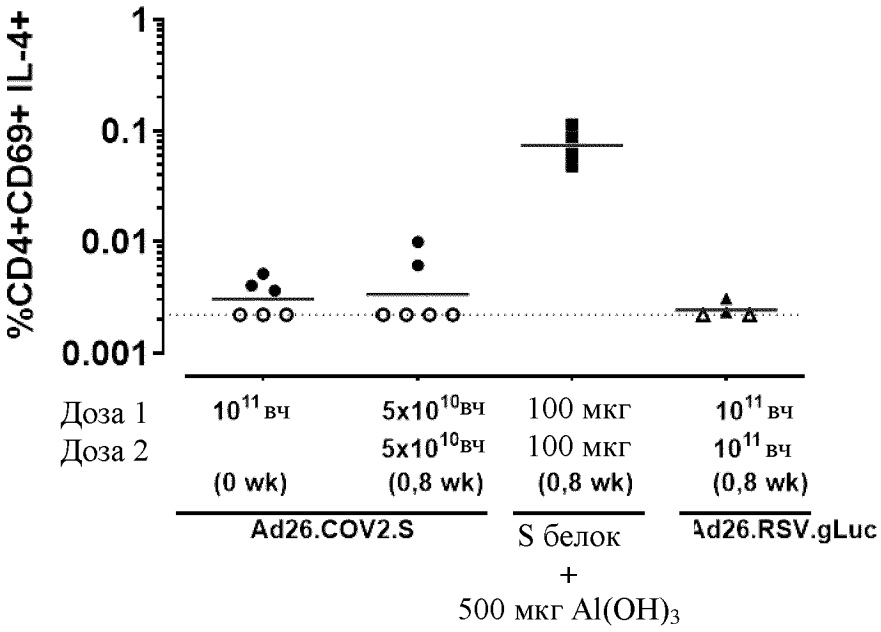


Неделя 4 – IL-2

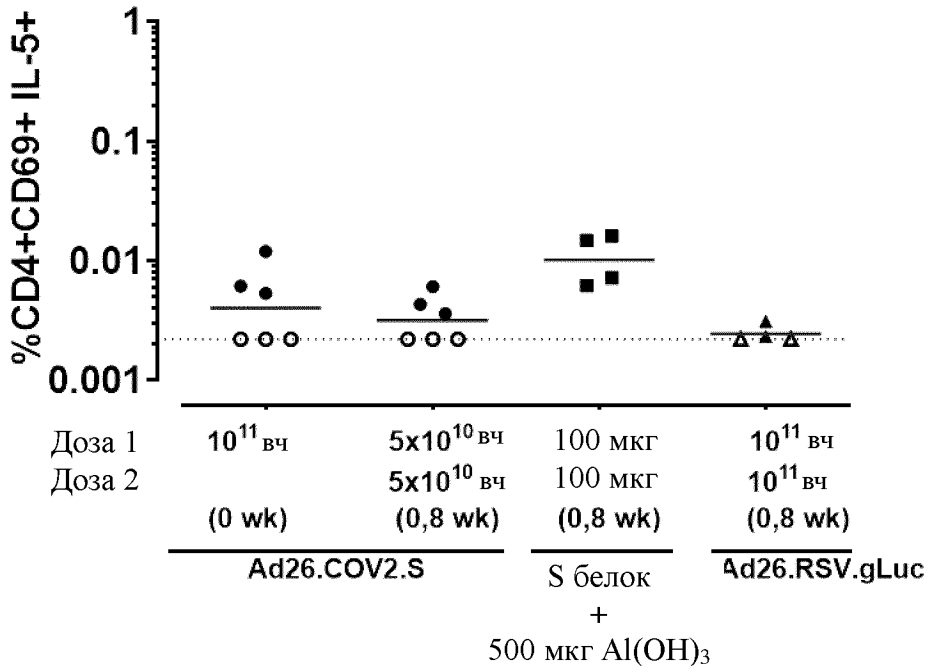


Фиг. 119B

Неделя 4 – IL-4

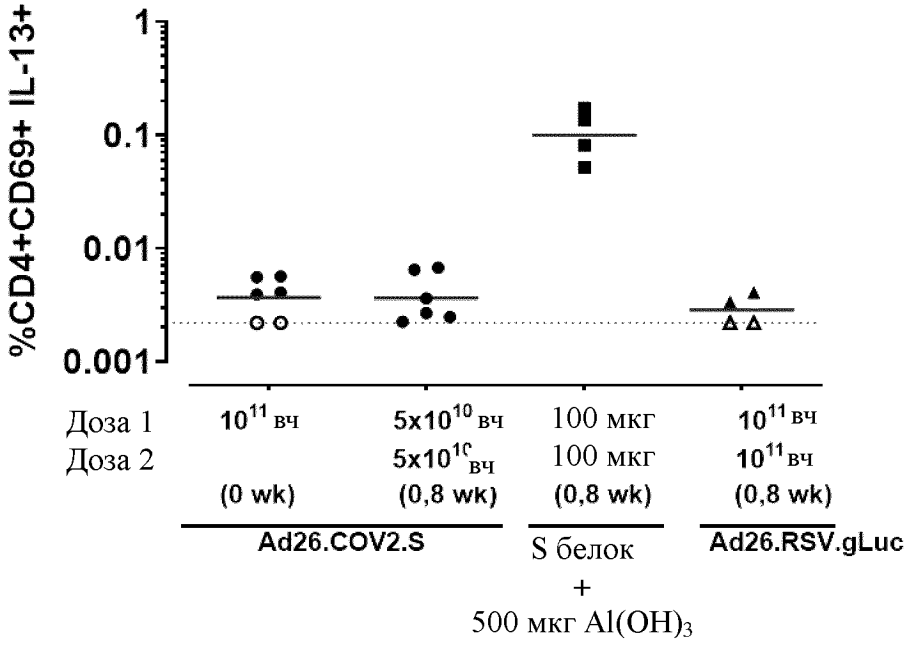


Неделя 4 – IL-5

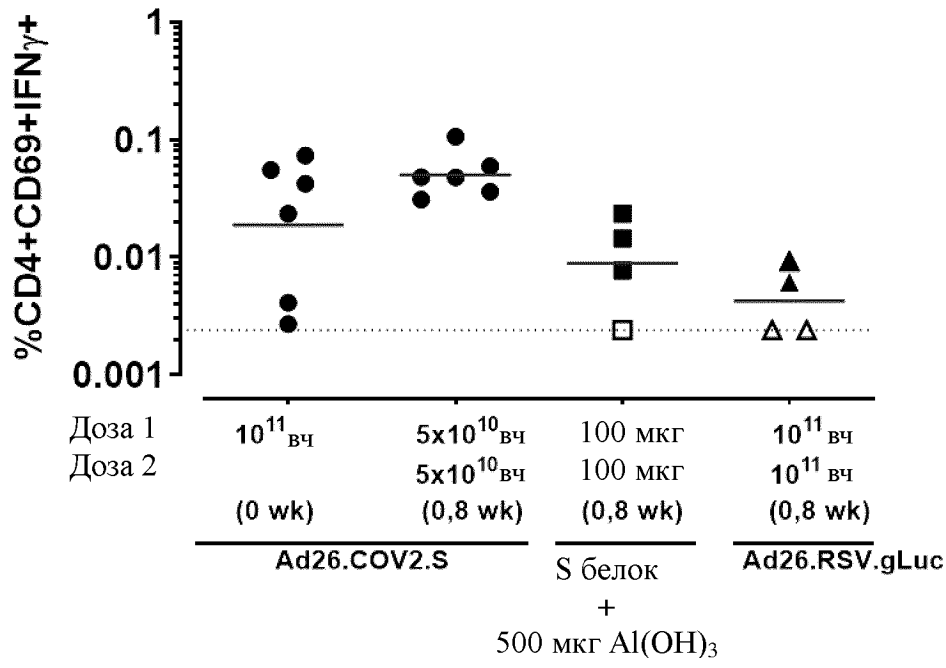


Фиг. 119B (продолжение)

Неделя 4 – IL-13

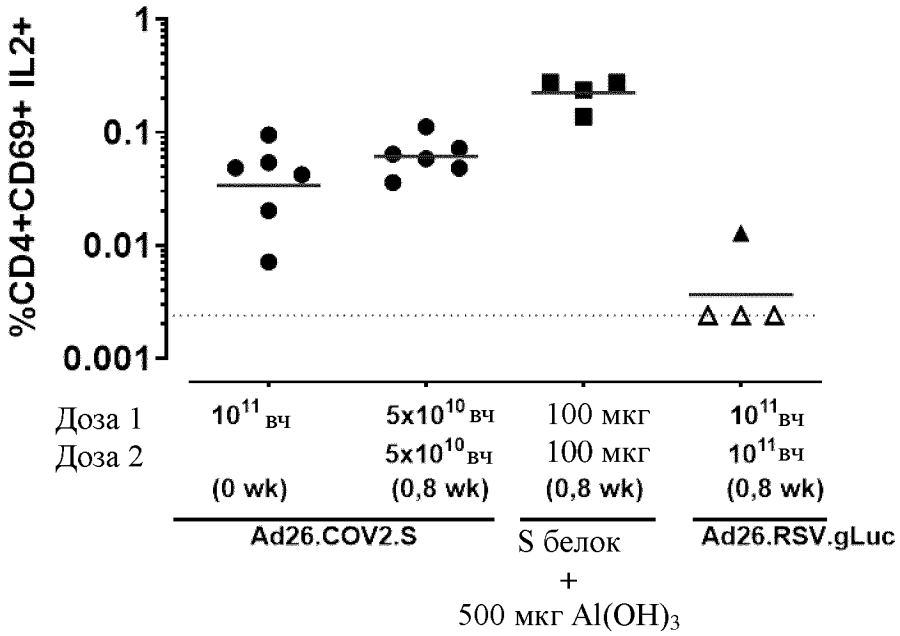


Неделя 10 - IFNγ

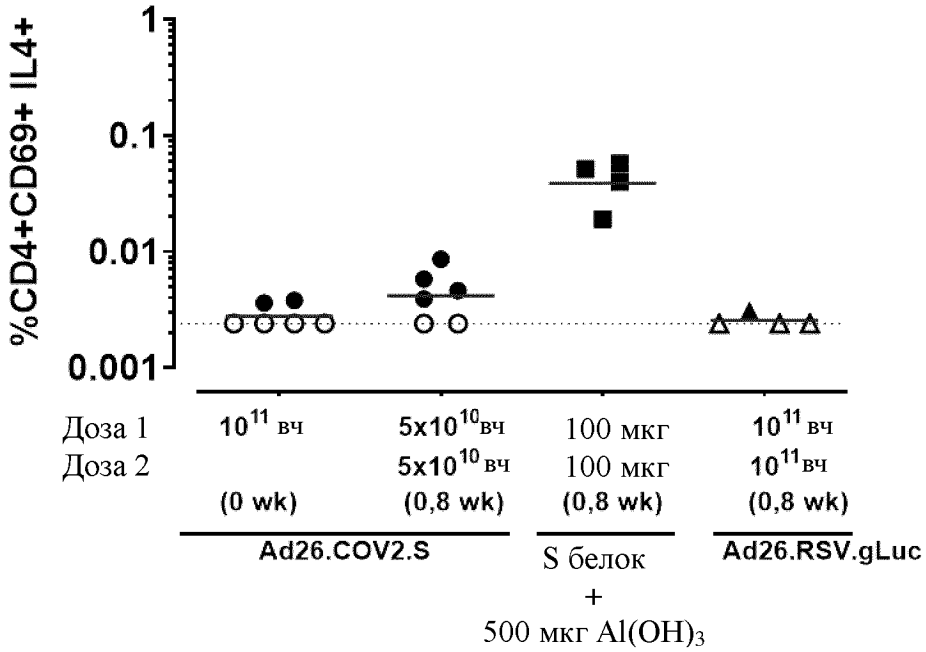


Фиг. 119В (продолжение)

Неделя 10 – IL-2

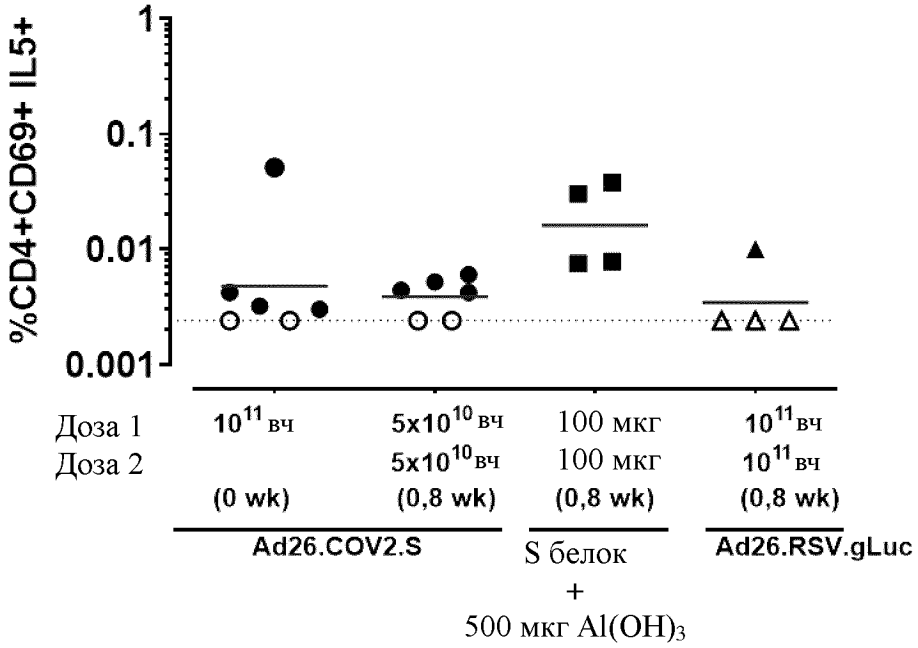


Неделя 10 – IL-4

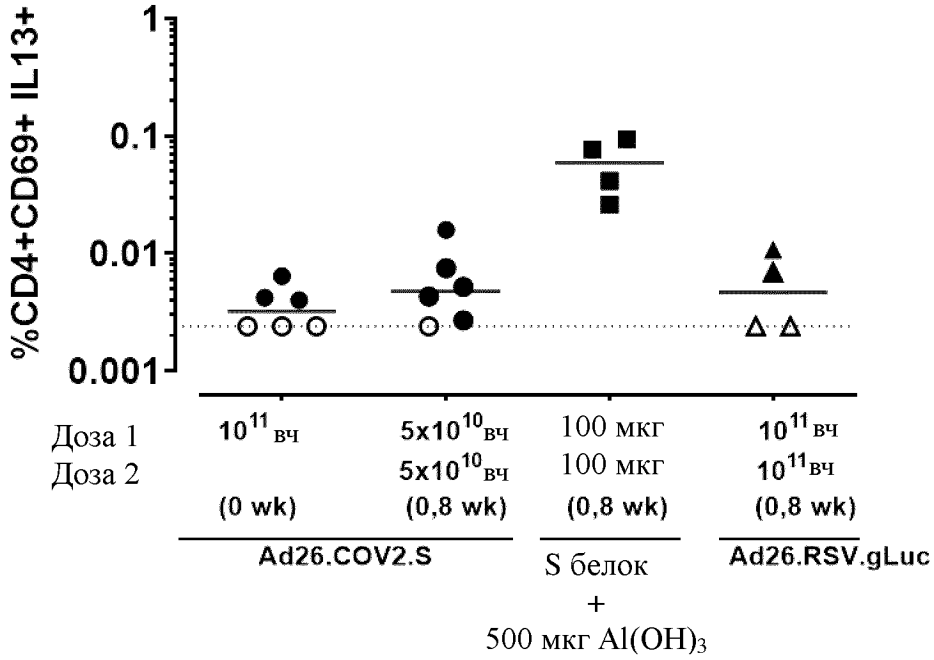


Фиг. 119B (продолжение)

Неделя 10 – IL-5

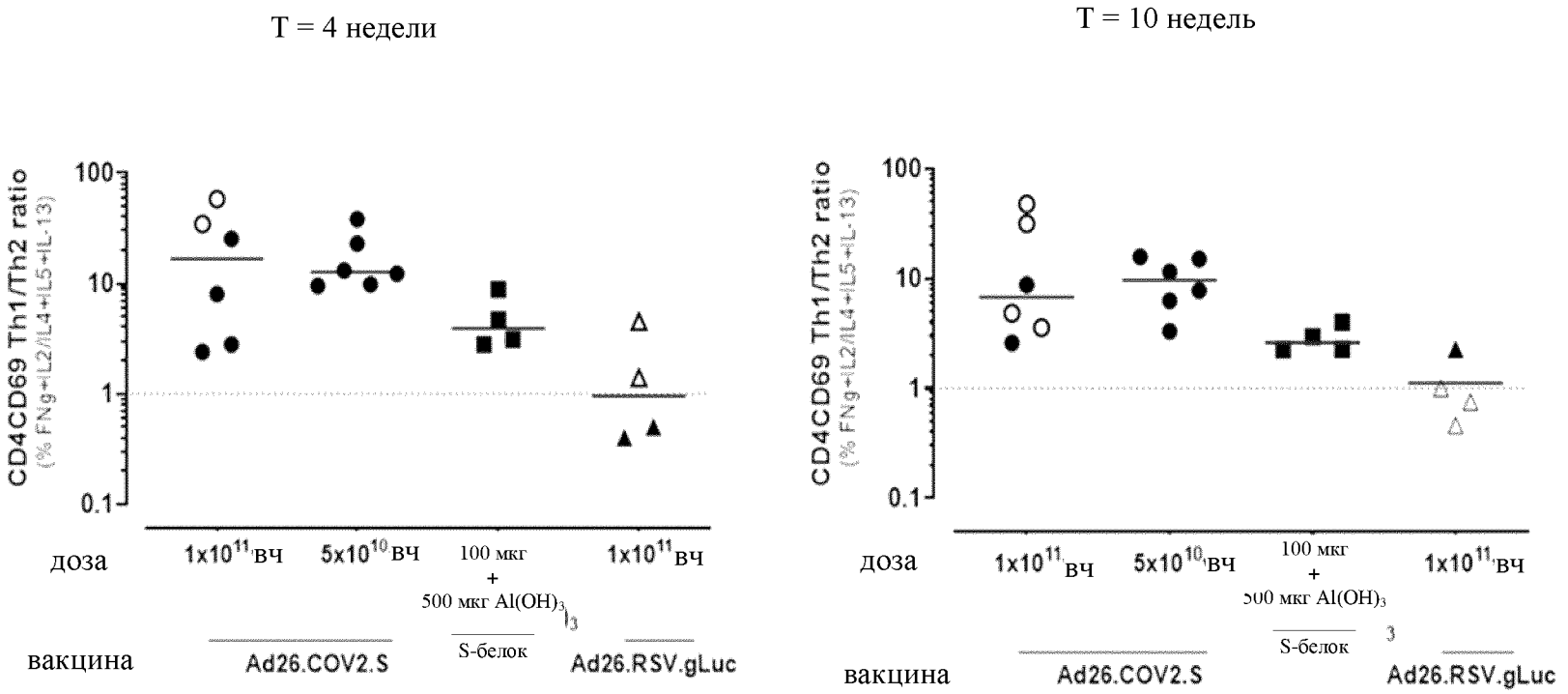


Неделя 10 – IL-13

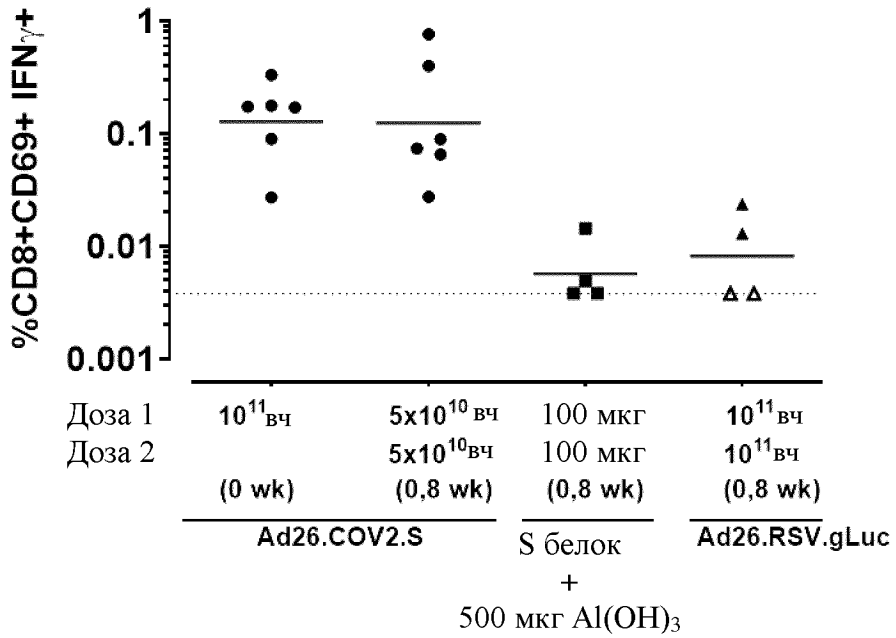


Фиг. 119B (продолжение)

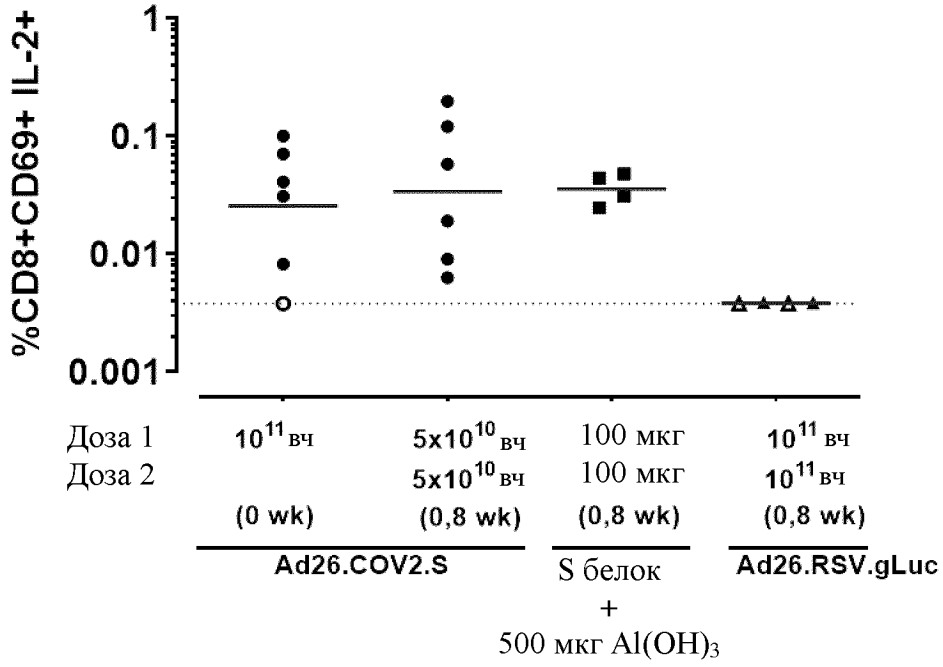
Фиг. 119C


T = 4 недели
T = 10 недель
CD4CD69 Th1/Th2 ratio
(% FNg+IL2/IL4+IL5+IL13)
100
10
1
0.1
доза
1x10^11 вч
5x10^10 вч
100 мкг
+
500 мкг Al(OH)3
1x10^11 вч
вакцина
Ad26.COV2.S
S-белок
Ad26.RSV.gLuc

Неделя 4 - IFNγ

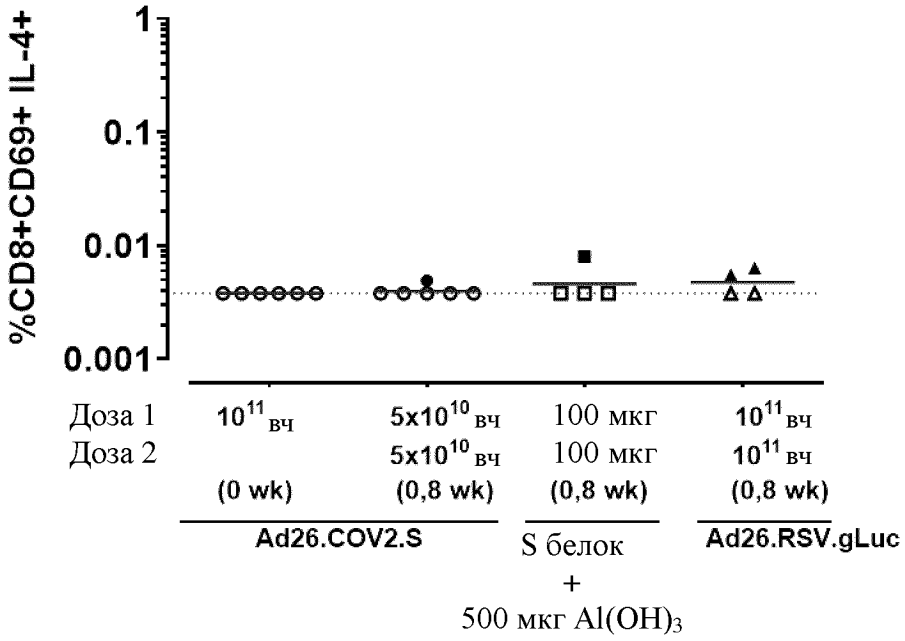


Неделя 4 – IL-2

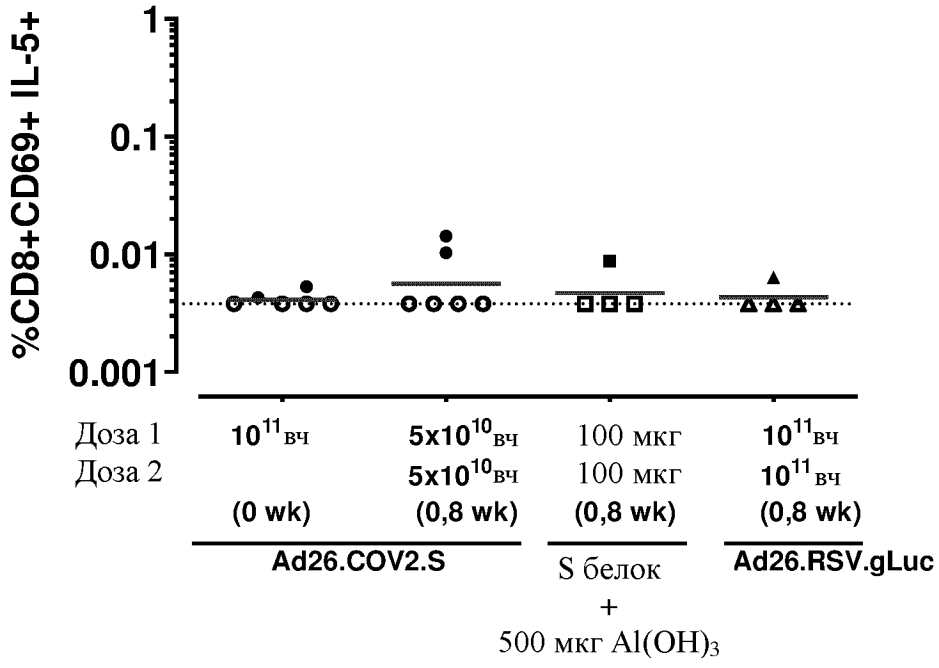


Фиг. 120

Неделя 4 – IL-4

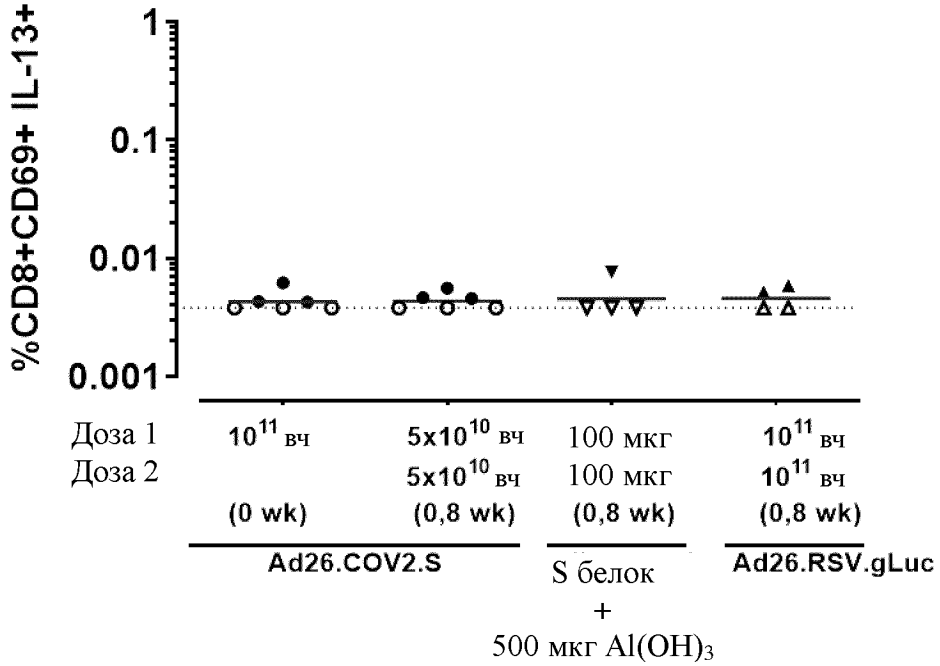


Неделя 4 – IL-5

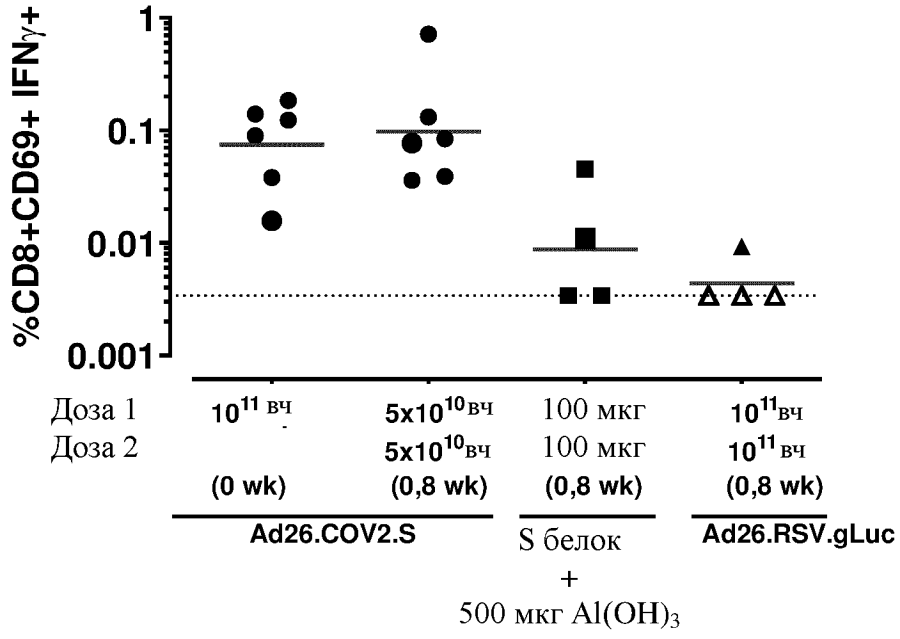


Фиг. 120 (продолжение)

Неделя 4 – IL-13

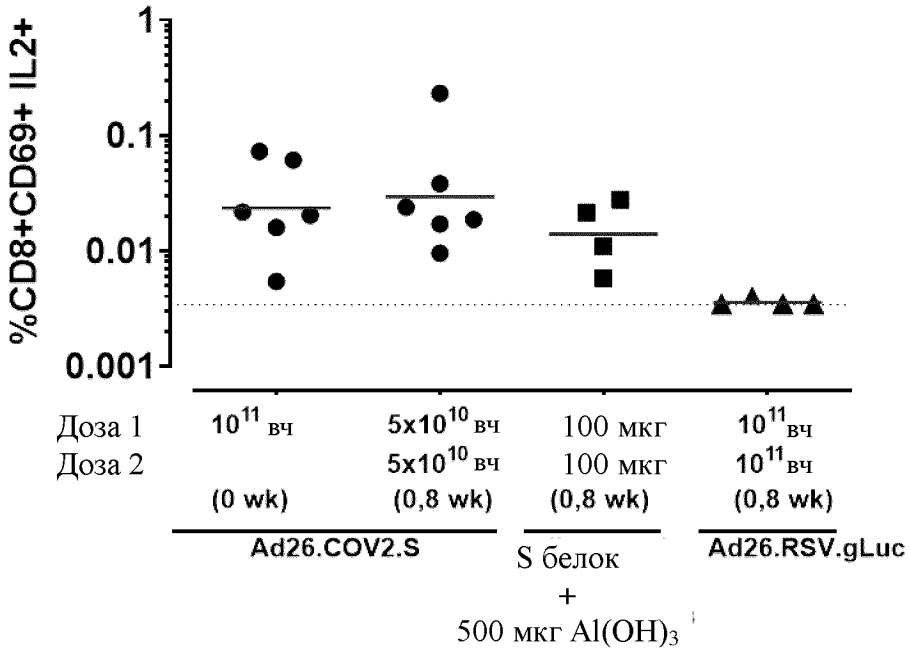


Неделя 10 - IFNγ

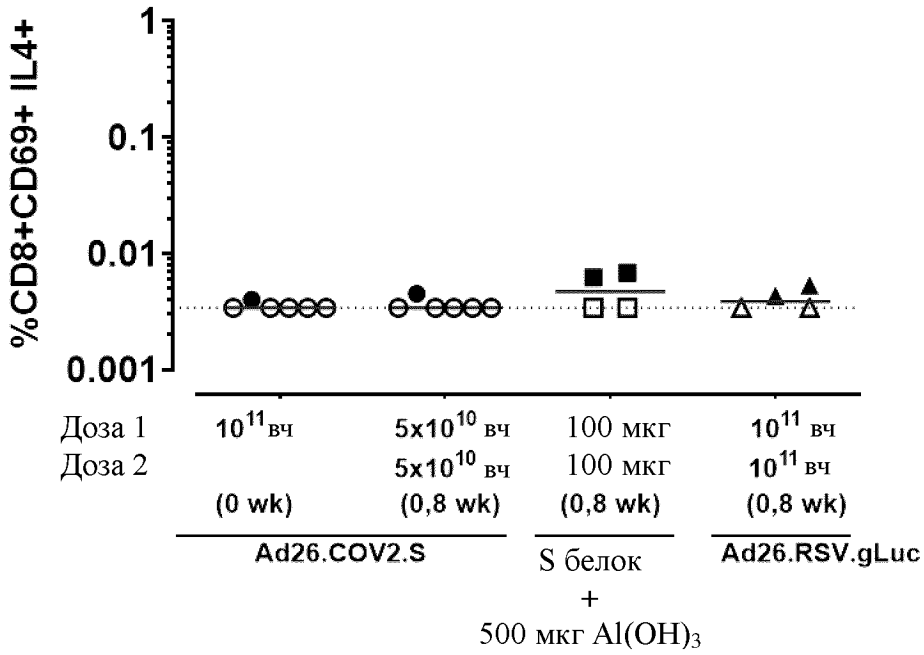


Фиг. 120 (продолжение)

Неделя 10 – IL-2

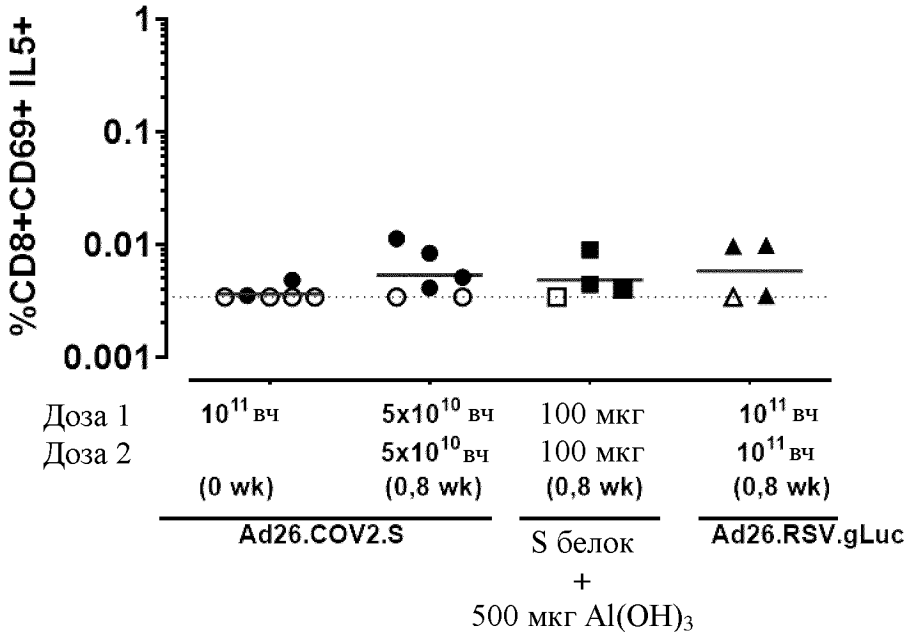


Неделя 10 – IL-4

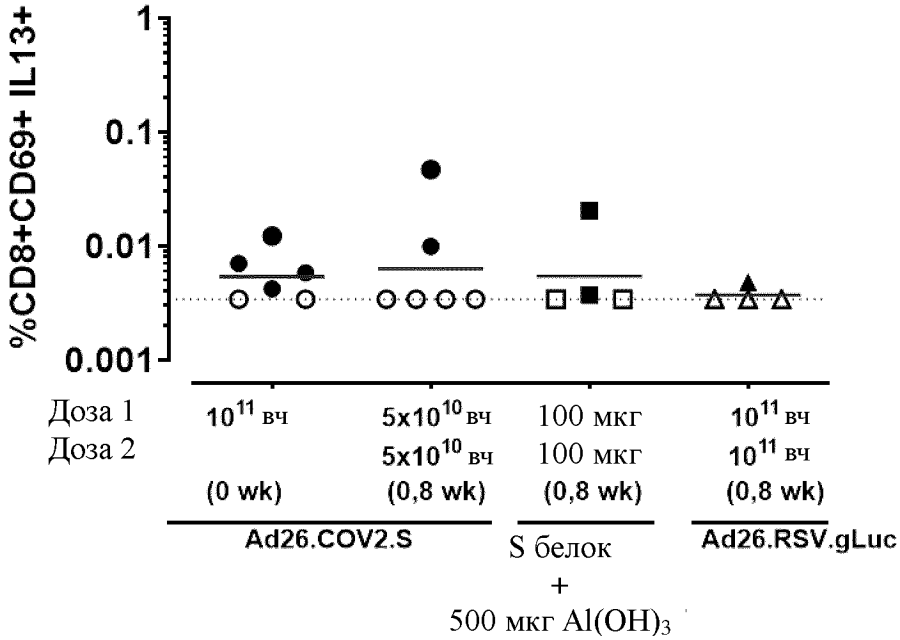


Фиг. 120 (продолжение)

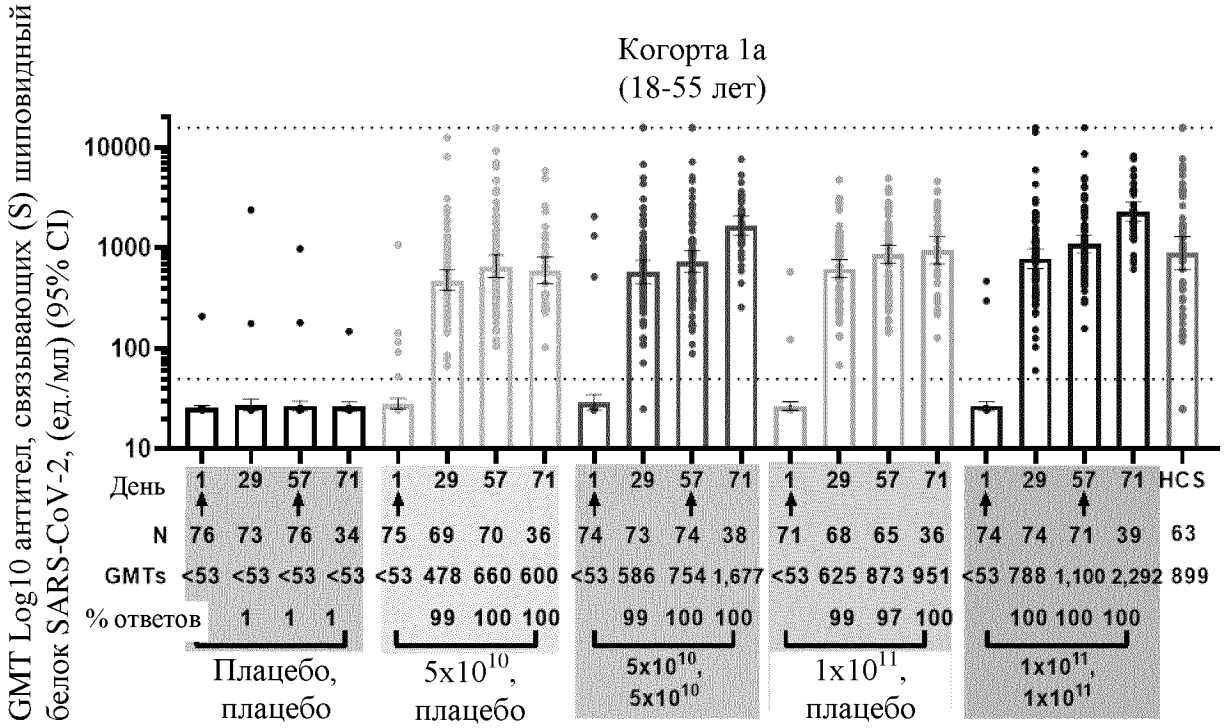
Неделя 10 – IL-5

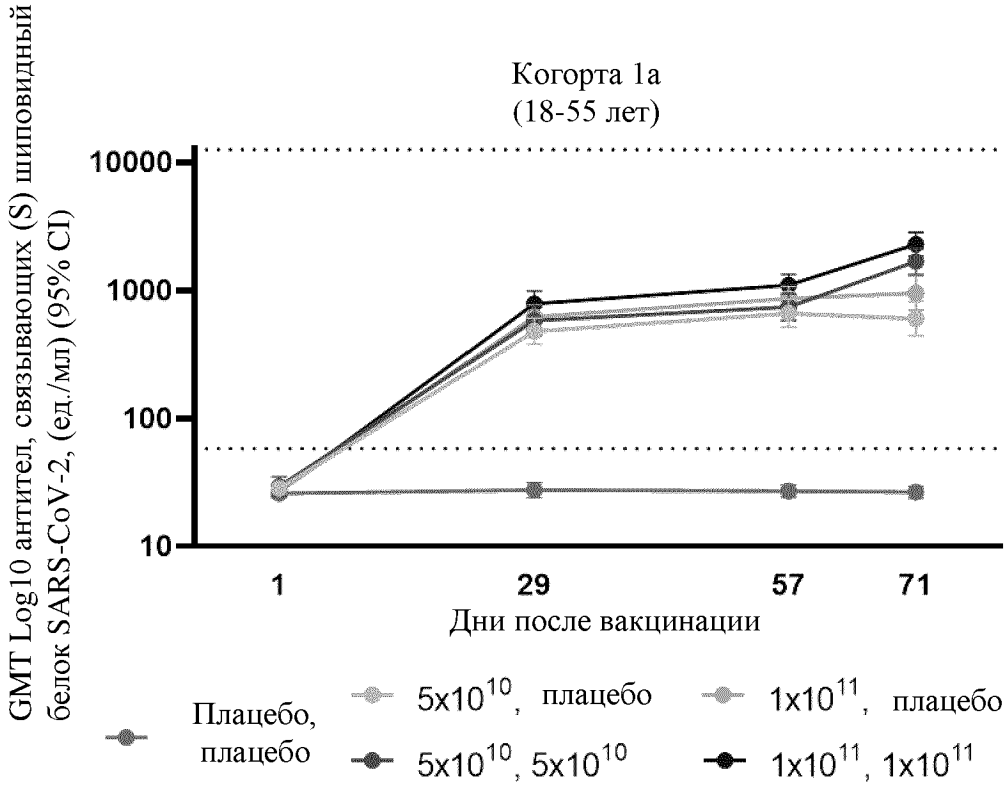


Неделя 10 – IL-13

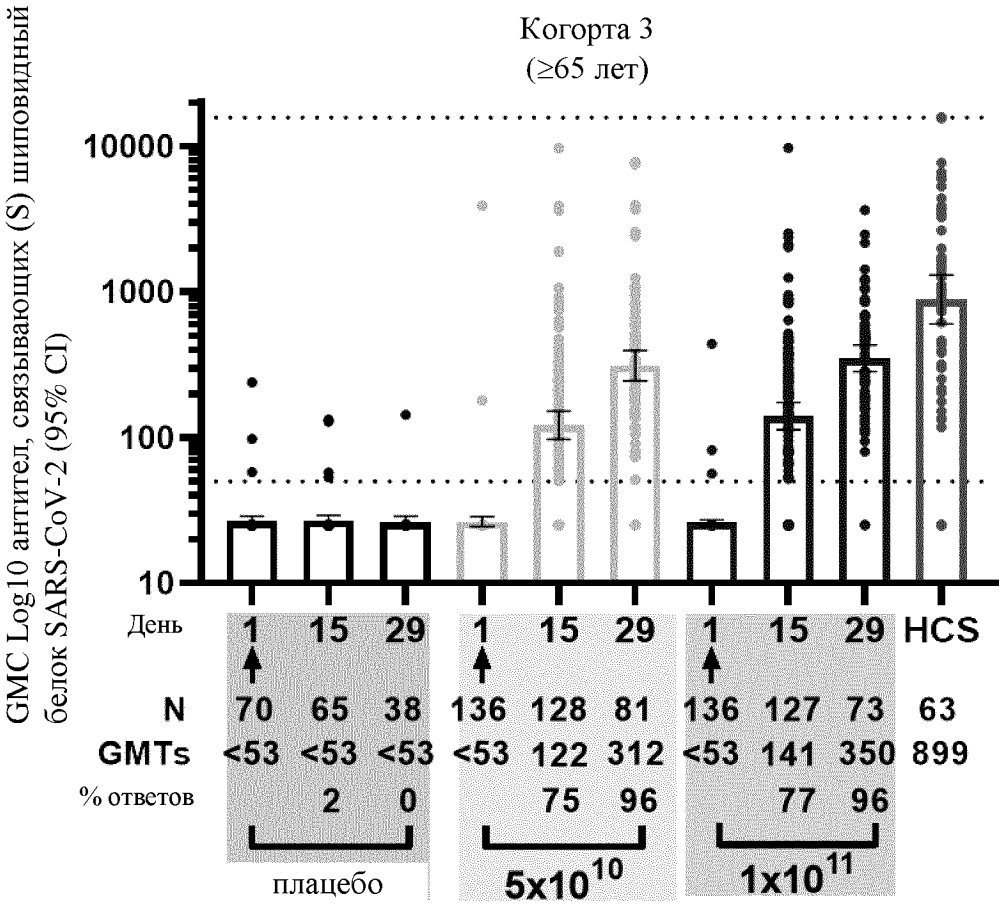


Фиг. 120 (продолжение)

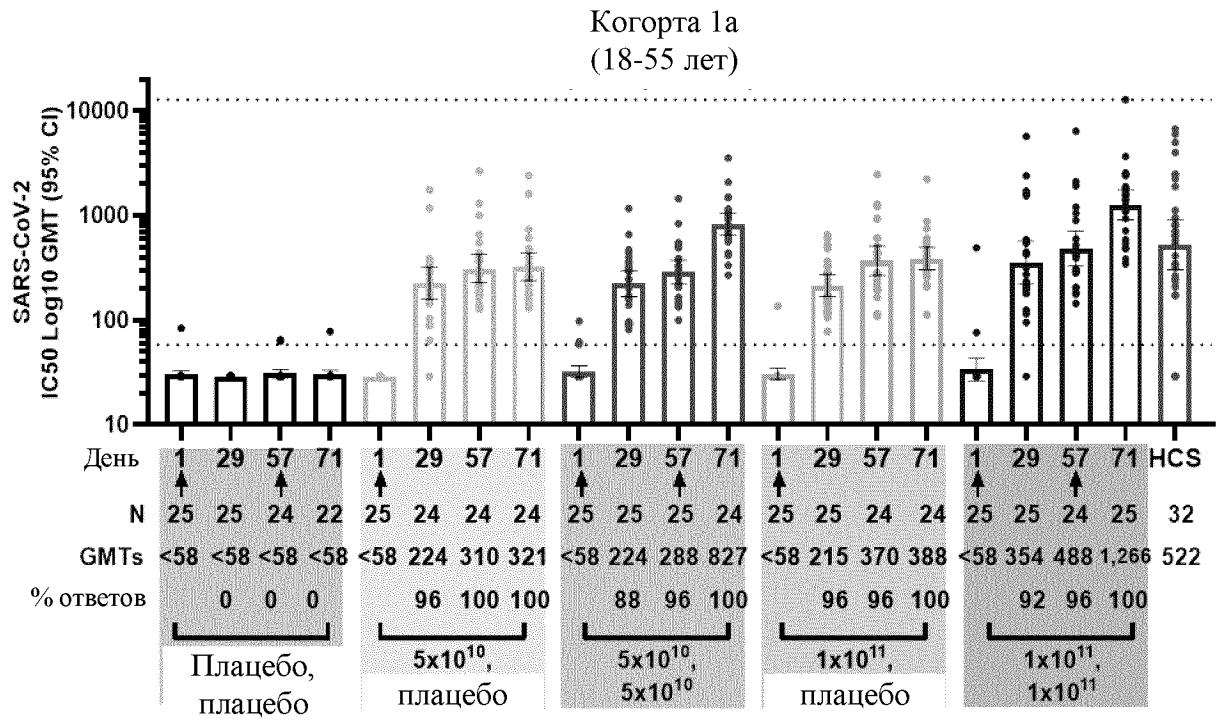

Когорта 1a
(18-55 лет)
GMT Log10 антител, связывающих (S) шиповидный белок SARS-CoV-2, (ед./мл) (95% CI)
10000
1000
100
10
День 1 29 57 71 1 29 57 71 1 29 57 71 1 29 57 71 1 29 57 71 HCS
N 76 73 76 34 75 69 70 36 74 73 74 38 71 68 65 36 74 74 71 39 63
GMTs <53 <53 <53 <53 <53 478 660 600 <53 586 754 1,677 <53 625 873 951 <53 788 1,100 2,292 899
% ответов 1 1 1 99 100 100 99 100 100 99 97 100 100 100 100
Плацебо, плацебо
5x10^10, плацебо
5x10^10, 5x10^10
1x10^11, плацебо
1x10^11, 1x10^11

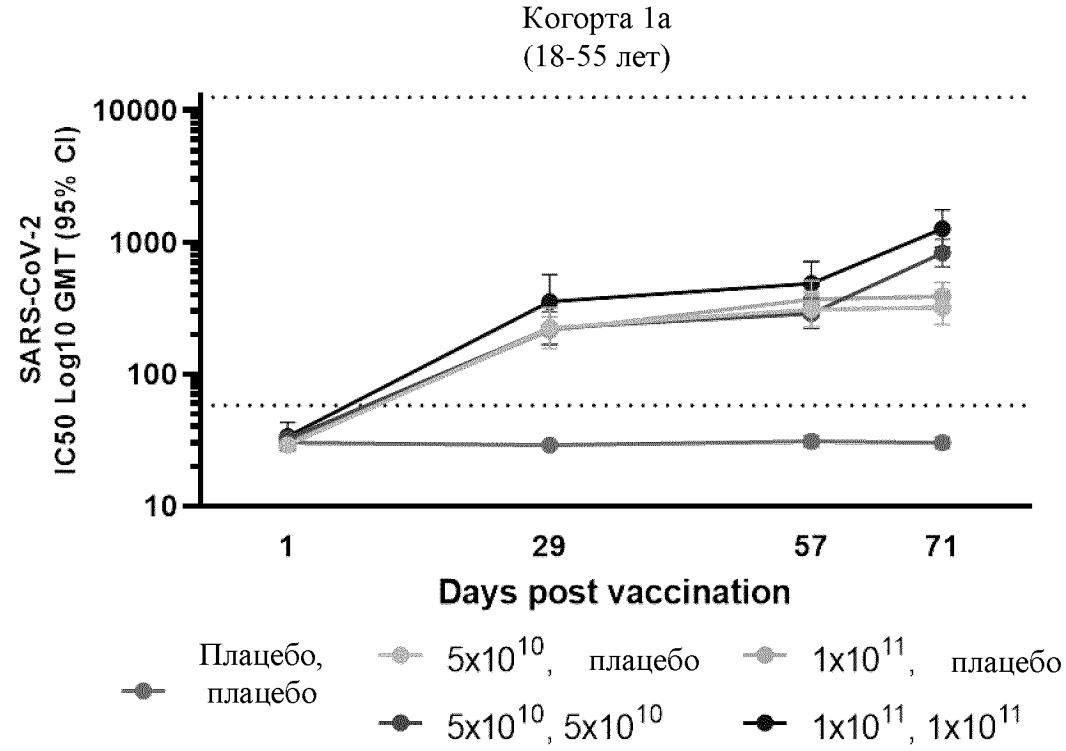

Когорта 1a
(18-55 лет)
GMT Log10 антител, связывающих (S) шиповидный белок SARS-CoV-2, (ед./мл) (95% CI)
10000
1000
100
10
1
29
57
71
Дни после вакцинации
Плацебо, плацебо
5x10^10, плацебо
1x10^11, плацебо
5x10^10, 5x10^10
1x10^11, 1x10^11

Фиг. 121A

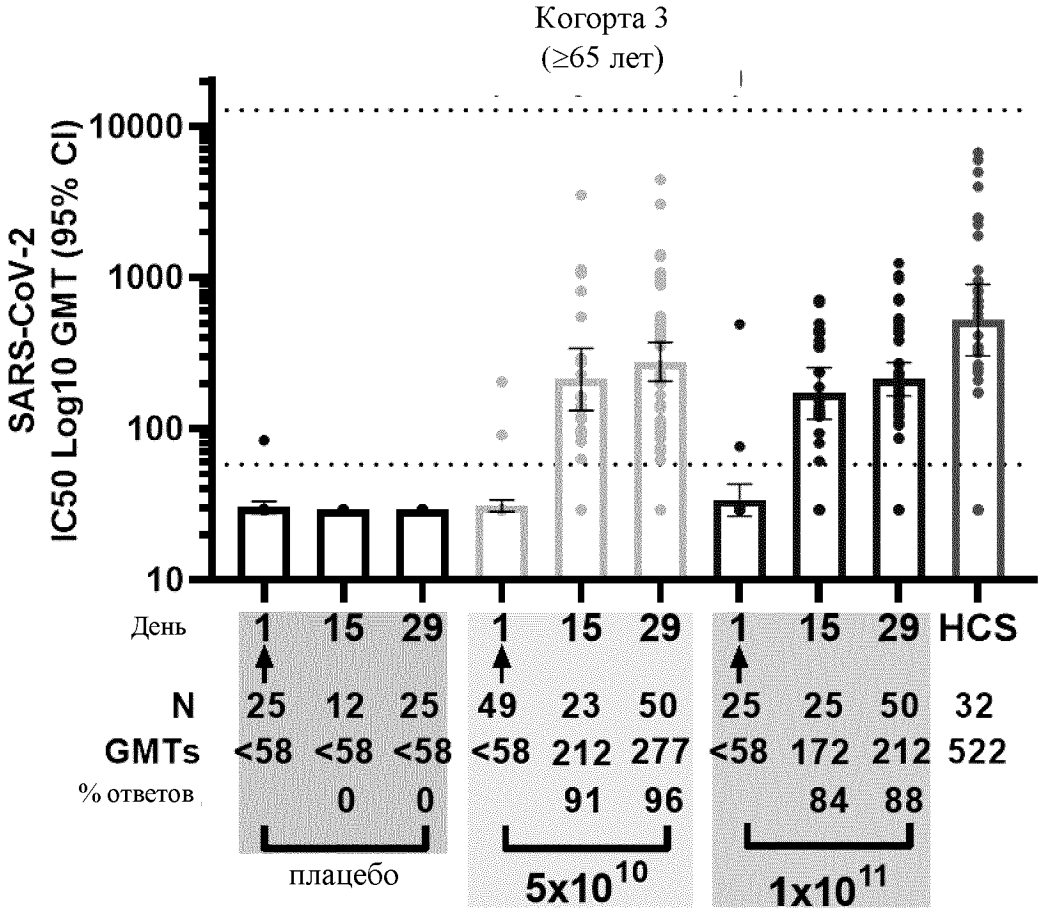

Когорта 3
(≥65 лет)
GMC Log10 антител, связывающих (S) шиповидный белок SARS-CoV-2 (95% CI)
10000
1000
100
10
День
1 15 29 1 15 29 1 15 29 HCS
N
70 65 38 136 128 81 136 127 73 63
GMTs
<53 <53 <53 <53 122 312 <53 141 350 899
% ответов
2 0 75 96 77 96
плацебо
5x10^10
1x10^11

Фиг. 121B

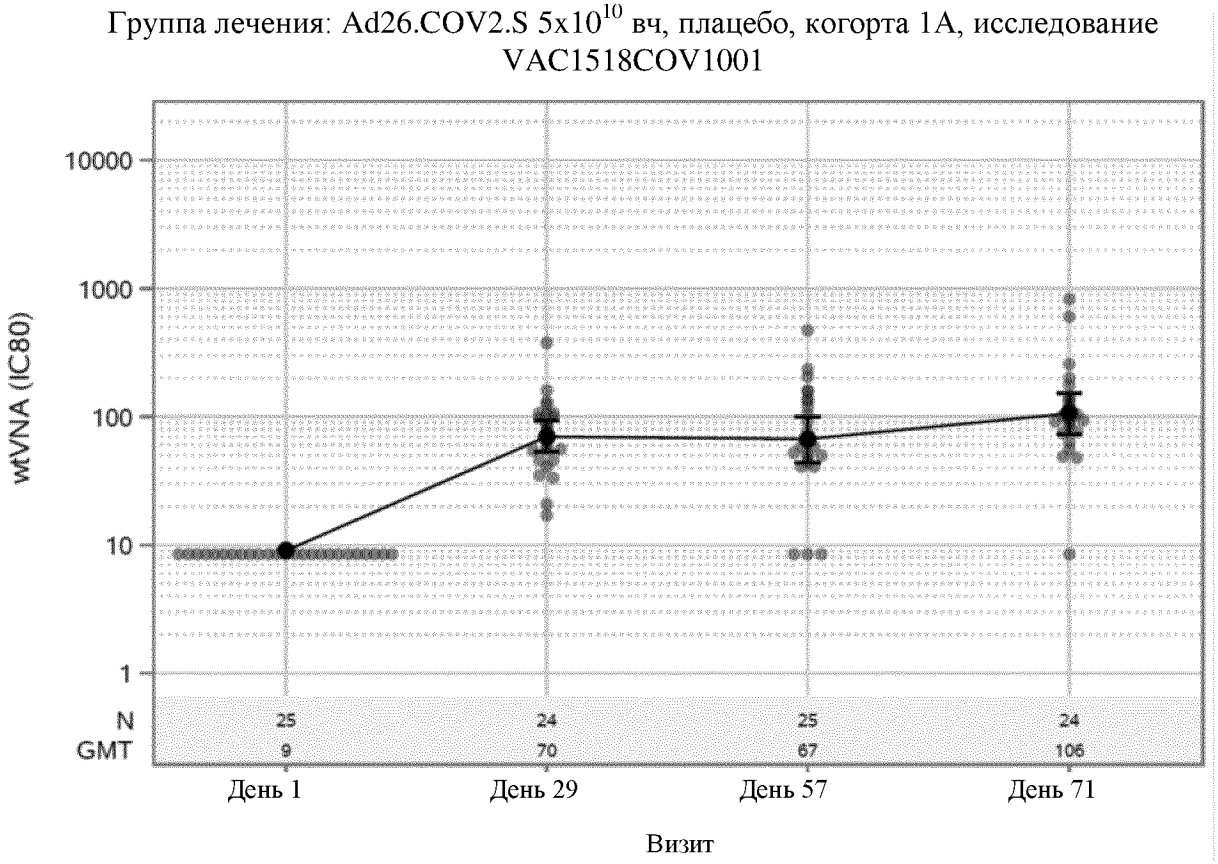

Когорта 1a
(18-55 лет)
SARS-CoV-2
IC50 Log10 GMT (95% CI)
10000
1000
100
10
День 1 29 57 71 1 29 57 71 1 29 57 71 1 29 57 71 1 29 57 71 HCS
N 25 25 24 22 25 24 24 24 25 25 25 24 25 25 24 24 25 25 24 25 32
GMTs <58 <58 <58 <58 <58 224 310 321 <58 224 288 827 <58 215 370 388 <58 354 488 1,266 522
% ответов 0 0 0 96 100 100 88 96 100 96 96 100 92 96 100
Плацебо, плацебо
5x10^10, плацебо
5x10^10, 5x10^10
1x10^11, плацебо
1x10^11, 1x10^11


Когорта 1a
(18-55 лет)
SARS-CoV-2
IC50 Log10 GMT (95% CI)
10000
1000
100
10
1
29
57
71
Days post vaccination
Плацебо, плацебо
5x10^10, плацебо
1x10^11, плацебо
5x10^10, 5x10^10
1x10^11, 1x10^11

Фиг. 121 C

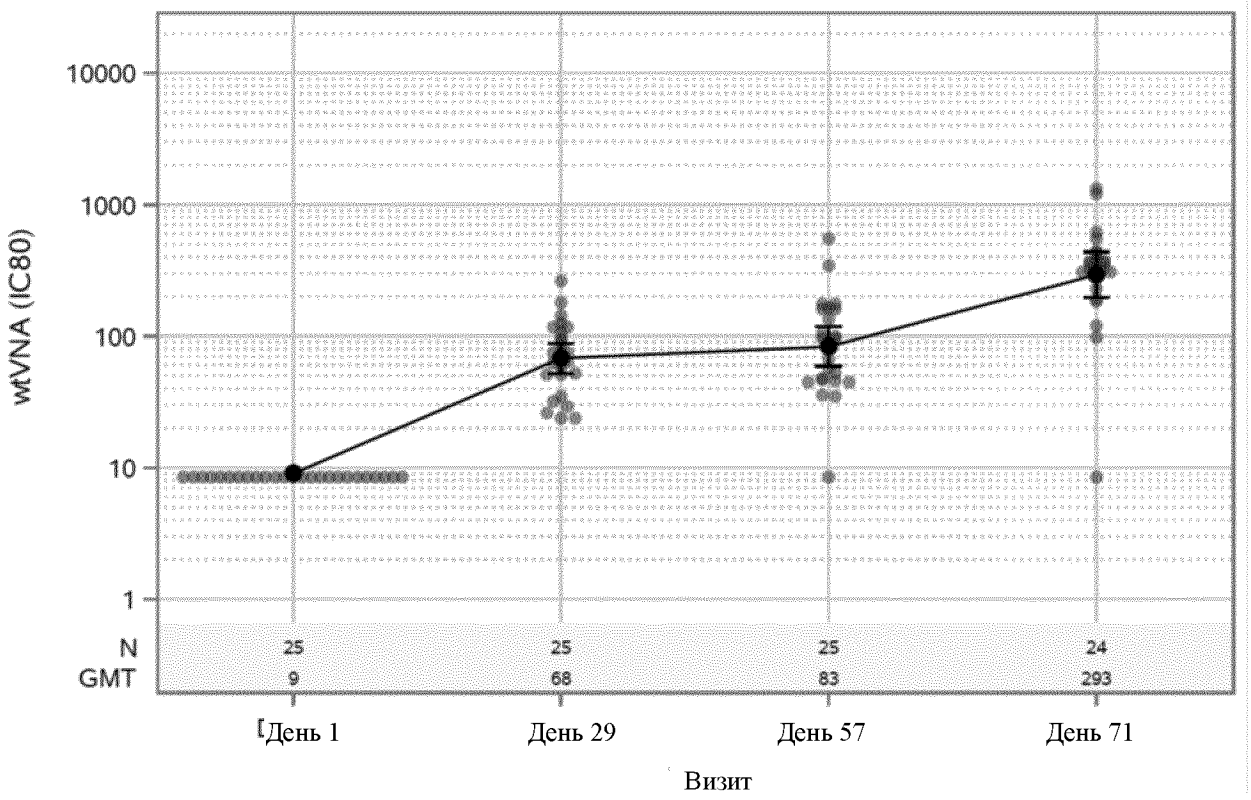

Когорта 3
(≥65 лет)
SARS-CoV-2
IC50 Log10 GMT (95% CI)
10000
1000
100
10
День
1 15 29 1 15 29 1 15 29 HCS
N
25 12 25 49 23 50 25 25 50 32
GMTs
<58 <58 <58 <58 212 277 <58 172 212 522
% ответов
0 0 91 96 84 88
плацебо
5x10^10
1x10^11

Фиг. 121D


Группа лечения: Ad26.COV2.S 5x10^10 вч, плацебо, когорта 1A, исследование VAC1518COV1001
wtVNA (IC80)
10000
1000
100
10
1
N
GMT
25
9
24
70
25
67
24
106
День 1
День 29
День 57
День 71
Визит

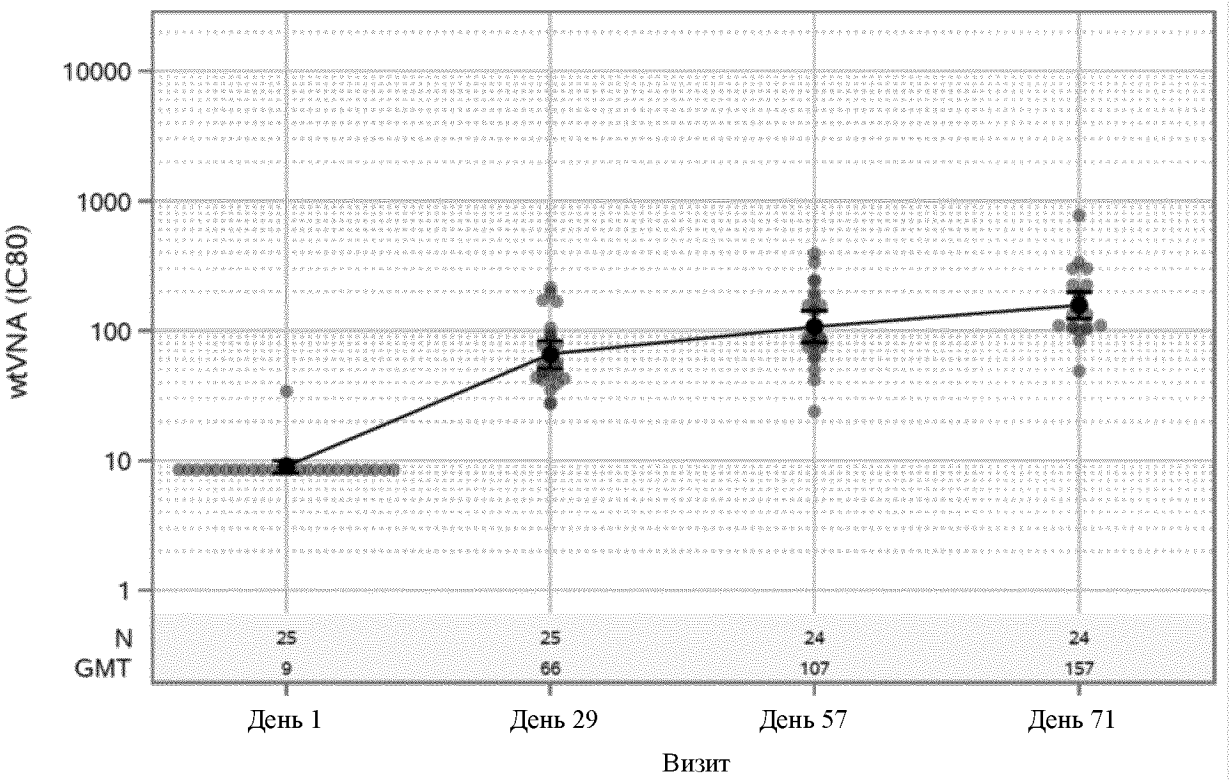
Фиг. 122A

Группа лечения: Ad26.COV2.S $5x10^{10}$ вч, Ad26.COV2.S $5x10^{10}$ вч, когорта 1A, исследование VAC31518COV1001

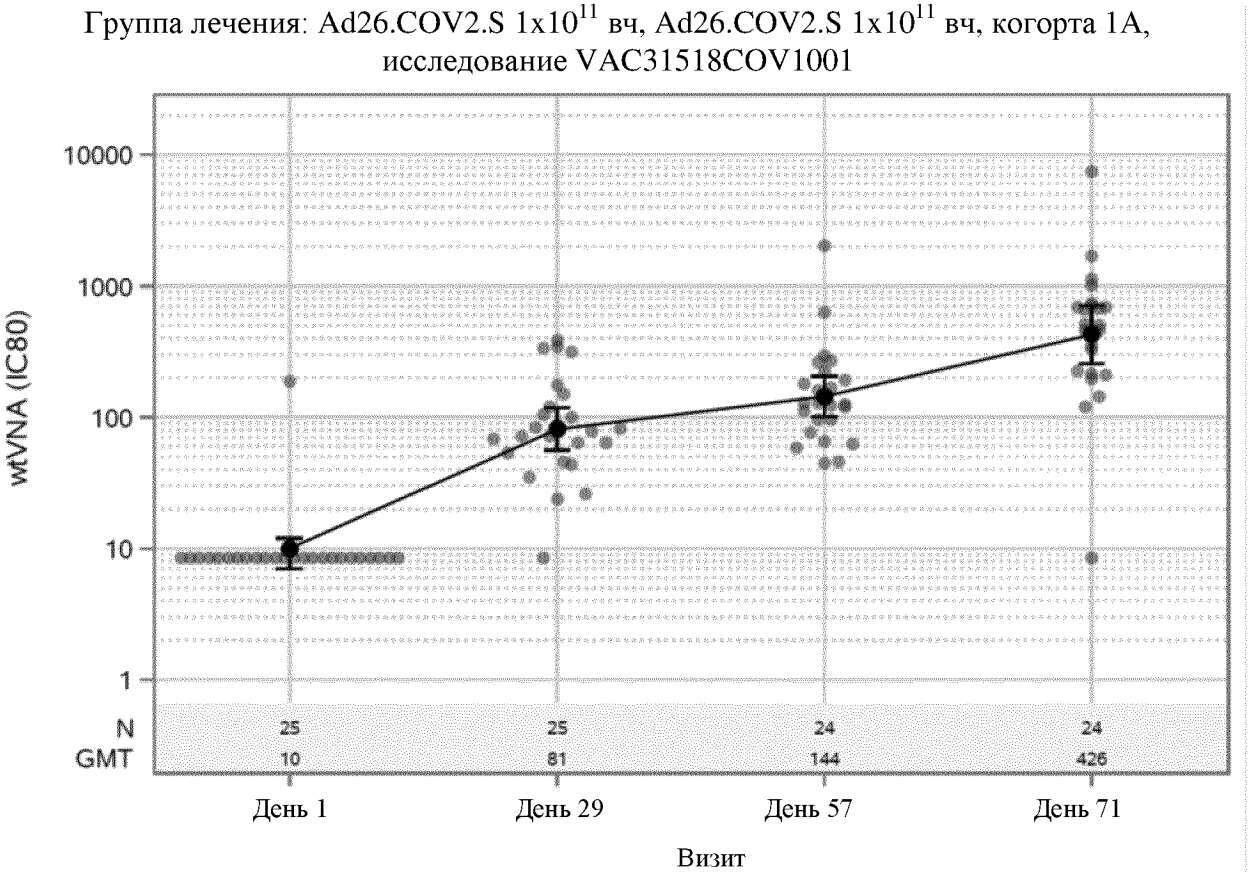


Фиг. 122B

Группа лечения: Ad26.COV2.S 1x10^{11} вч, плацебо, когорта 1A, исследование VAC31518COV1001

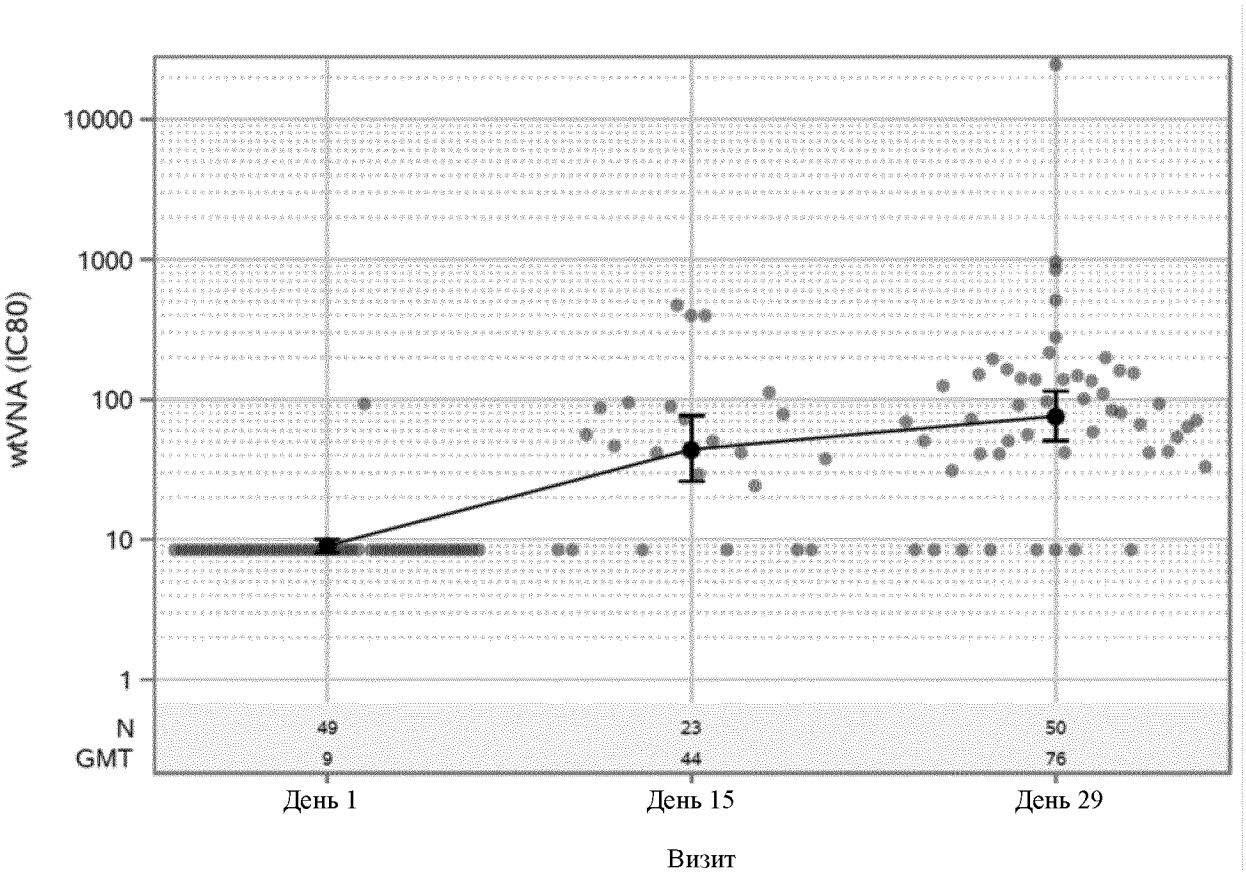


Фиг. 122C


Группа лечения: Ad26.COV2.S 1x10^11 вч, Ad26.COV2.S 1x10^11 вч, когорта 1A, исследование VAC31518COV1001
wtVNA (IC80)
10000
1000
100
10
1
N
GMT
25
10
25
81
24
144
24
426
День 1
День 29
День 57
День 71
Визит

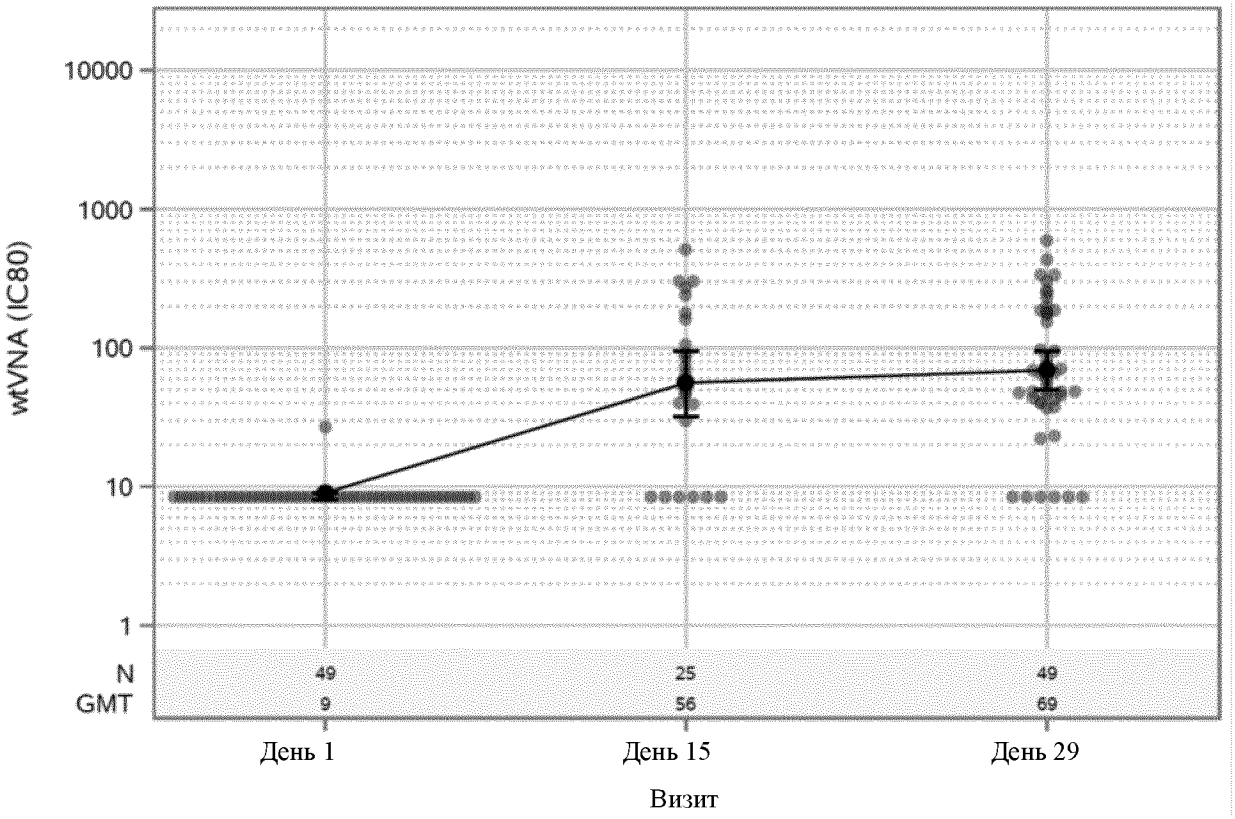
Фиг. 122D

Группа лечения: Ad26.COV2.S $5x10^{10}$ вч, когорта 3, исследование VAC1518COV1001

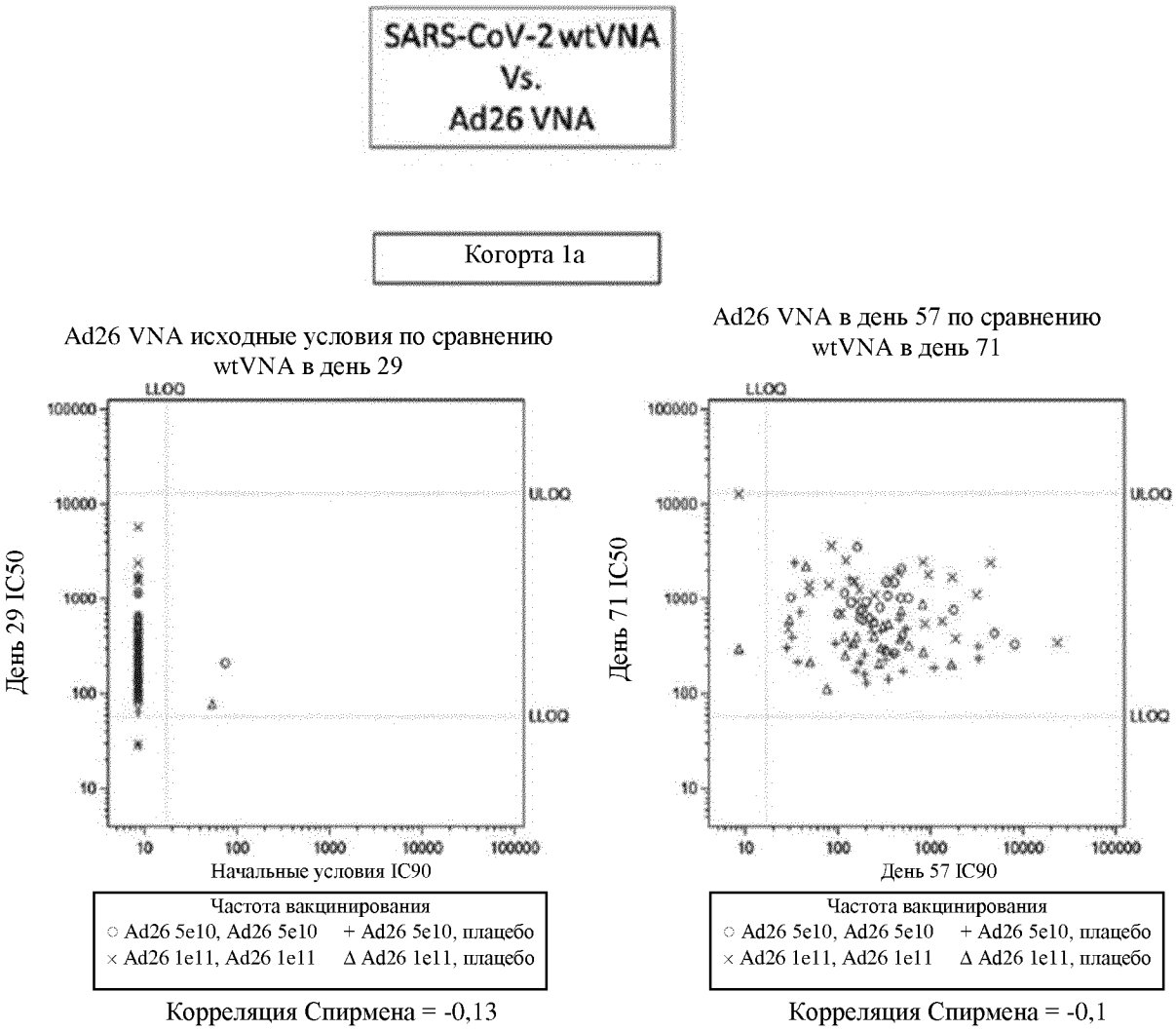


Фиг. 122E

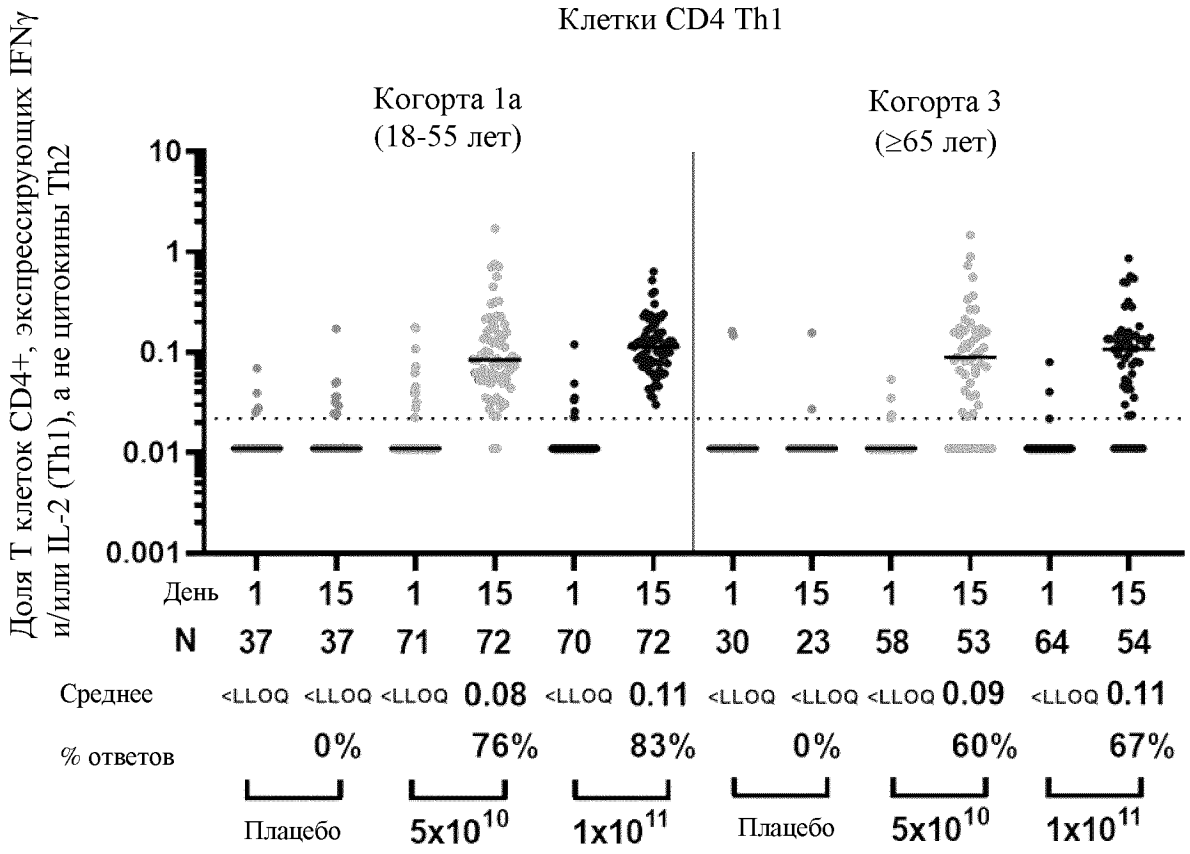
Группа лечения: Ad26.COV2.S $1x10^{11}$ вч, когорта 3, исследование VAC31518COV1001



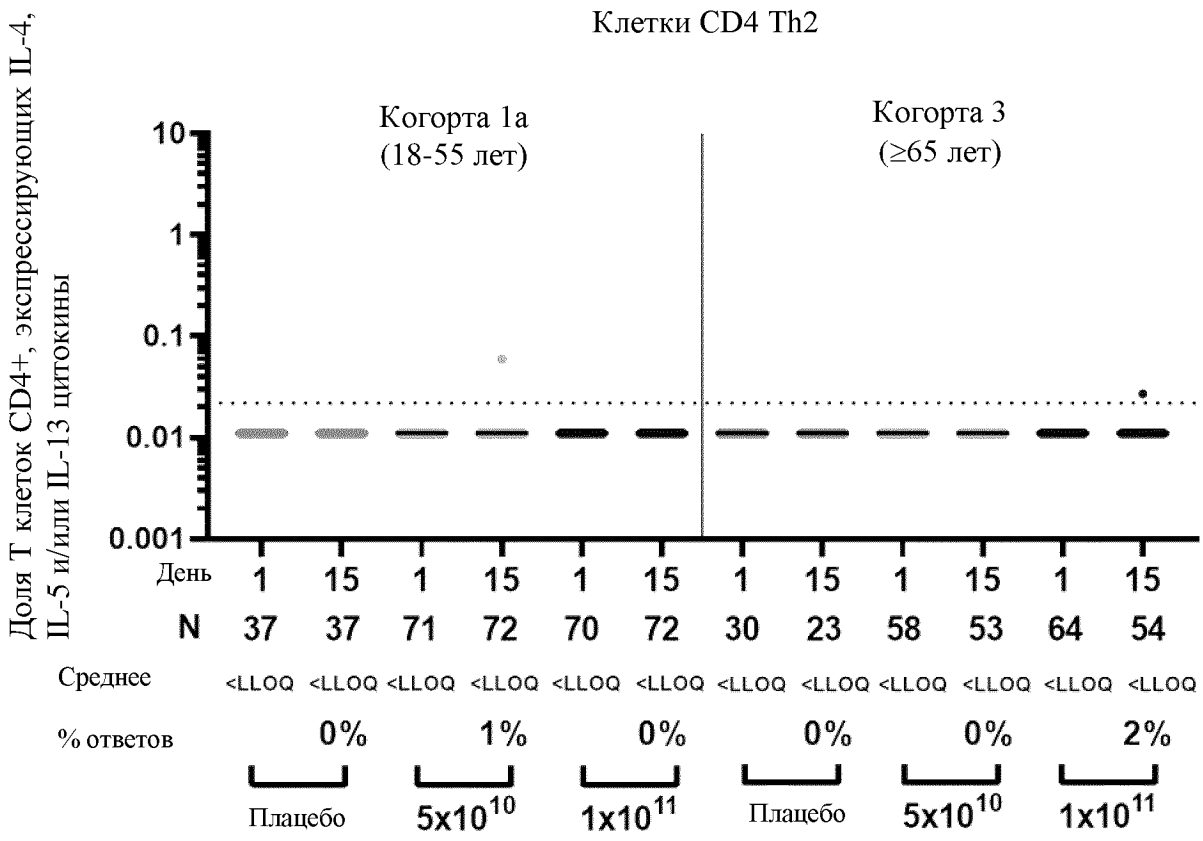
Фиг. 122F


SARS-CoV-2 wtVNA
Vs.
Ad26 VNA
Когорта 1a
Ad26 VNA исходные условия по сравнению wtVNA в день 29
Ad26 VNA в день 57 по сравнению wtVNA в день 71
LLOQ
ULOQ
100000
10000
1000
100
10
День 29 IC50
Начальные условия IC90
День 71 IC50
День 57 IC90
Частота вакцинирования
○ Ad26 5e10, Ad26 5e10
+ Ad26 5e10, плацебо
× Ad26 1e11, Ad26 1e11
Δ Ad26 1e11, плацебо
Корреляция Спирмена = -0,13
Корреляция Спирмена = -0,1

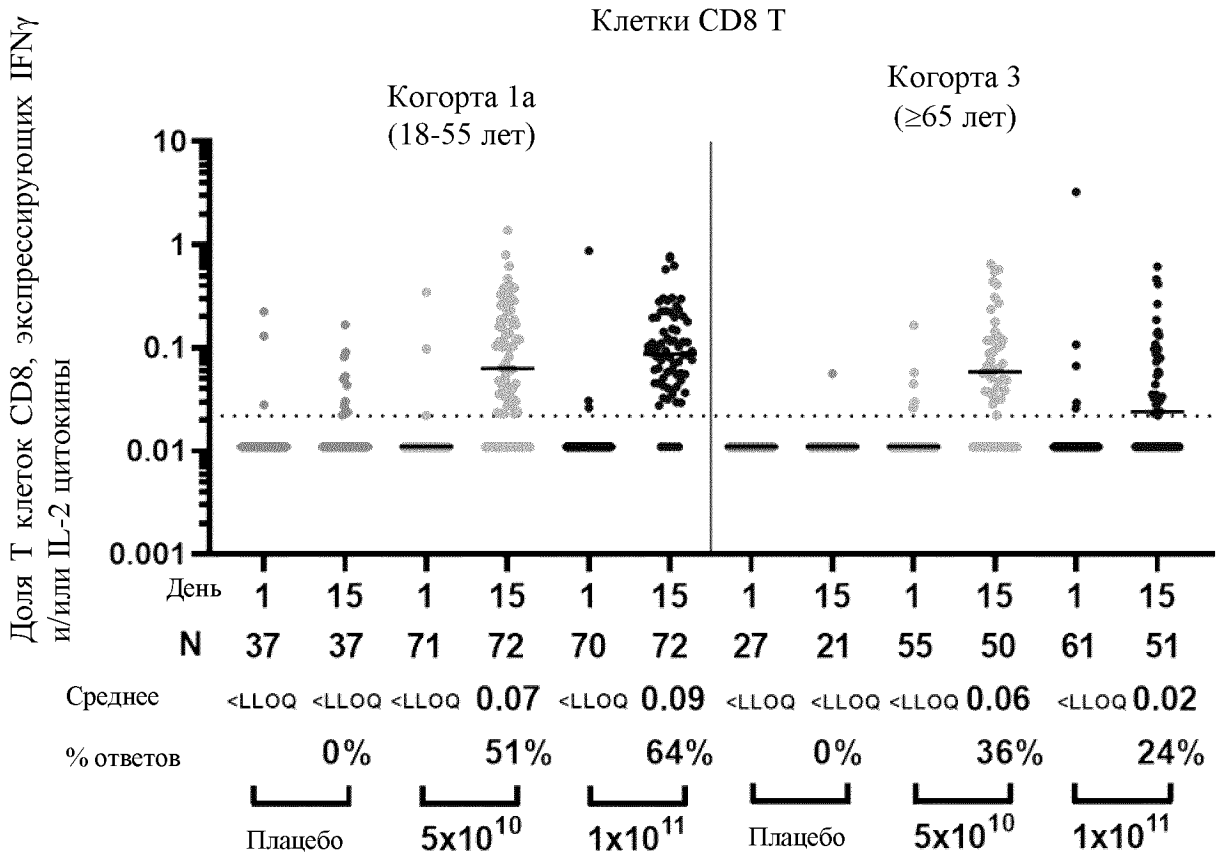
Фиг. 123


Клетки CD4 Th1
Когорта 1a
(18-55 лет)
Когорта 3
(≥65 лет)
Доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 (Th1), а не цитокины Th2
10
1
0.1
0.01
0.001
День 1 15 1 15 1 15 1 15 1 15 1 15
N 37 37 71 72 70 72 30 23 58 53 64 54
Среднее <LLOQ <LLOQ <LLOQ 0.08 <LLOQ 0.11 <LLOQ <LLOQ <LLOQ 0.09 <LLOQ 0.11
% ответов 0% 76% 83% 0% 60% 67%
Плацебо
5x10^10
1x10^11
Плацебо
5x10^10
1x10^11

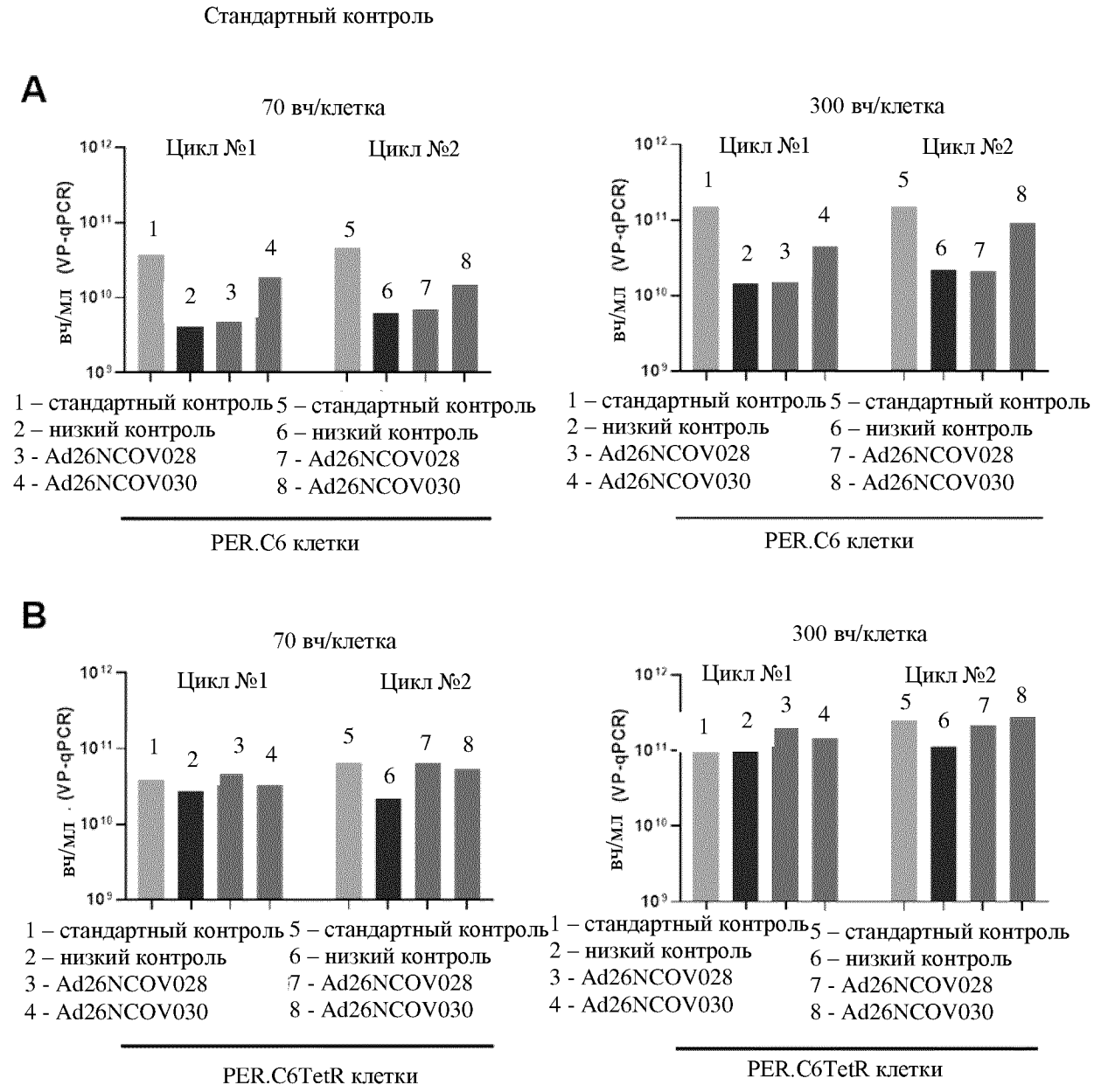
Фиг. 124A


Клетки CD4 Th2
Доля Т клеток CD4+, экспрессирующих IL-4, IL-5 и/или IL-13 цитокины
Когорта 1a (18-55 лет)
Когорта 3 (≥65 лет)
10
1
0.1
0.01
0.001
День 1 15 1 15 1 15 1 15 1 15 1 15
N 37 37 71 72 70 72 30 23 58 53 64 54
Среднее <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ <LLOQ
% ответов 0% 1% 0% 0% 0% 2%
Плацебо
5x10^10
1x10^11
Плацебо
5x10^10
1x10^11

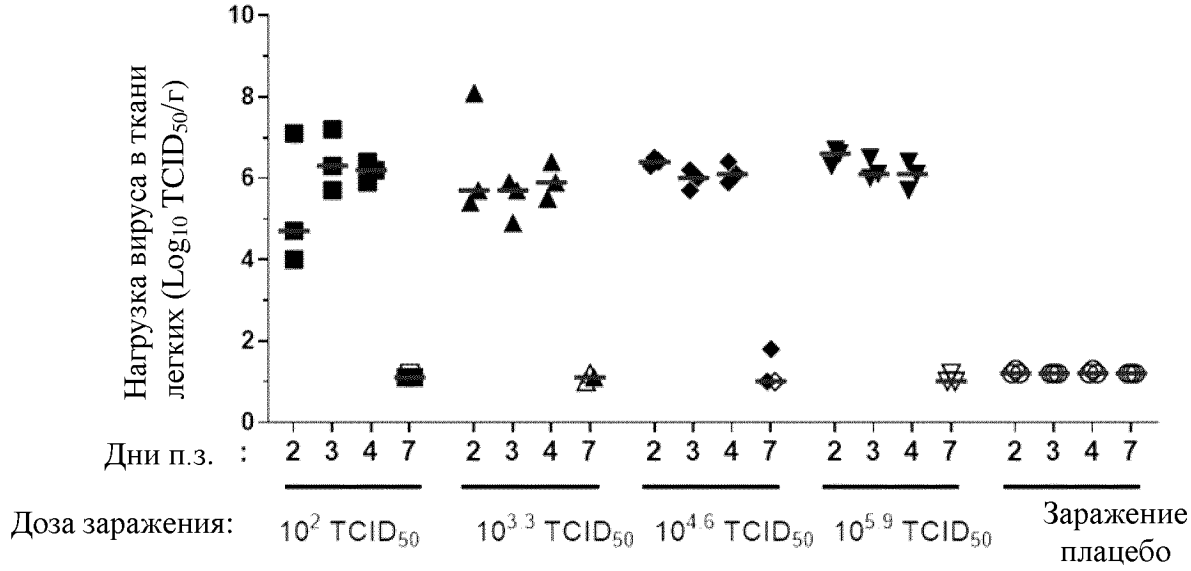
Фиг. 124B


Клетки CD8 T
Когорта 1a
(18-55 лет)
Когорта 3
(≥65 лет)
Доля Т клеток CD8, экспрессирующих IFNγ и/или IL-2 цитокины
10
1
0.1
0.01
0.001
День 1 15 1 15 1 15 1 15 1 15 1 15
N 37 37 71 72 70 72 27 21 55 50 61 51
Среднее <LLOQ <LLOQ <LLOQ 0.07 <LLOQ 0.09 <LLOQ <LLOQ <LLOQ 0.06 <LLOQ 0.02
% ответов 0% 51% 64% 0% 36% 24%
Плацебо
5x10^10
1x10^11
Плацебо
5x10^10
1x10^11

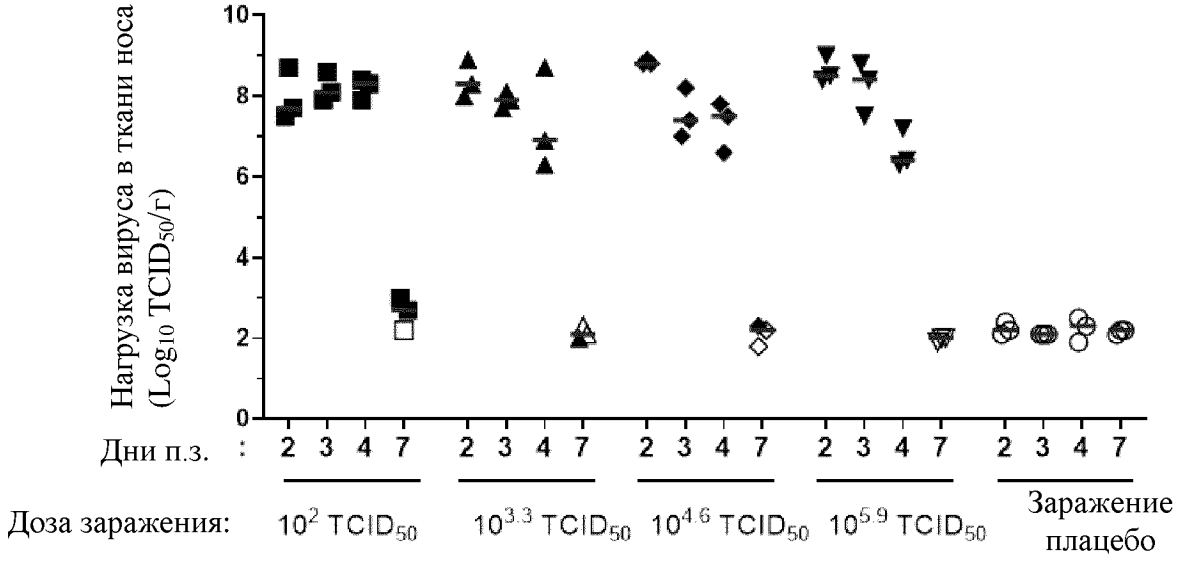
Фиг. 124C


Стандартный контроль
A
70 вч/клетка
300 вч/клетка
Цикл №1
Цикл №2
вч/мл (VP-qPCR)
1 – стандартный контроль
2 – низкий контроль
3 - Ad26NCOV028
4 - Ad26NCOV030
5 – стандартный контроль
6 – низкий контроль
7 - Ad26NCOV028
8 - Ad26NCOV030
PER.C6 клетки
B
70 вч/клетка
300 вч/клетка
PER.C6TetR клетки

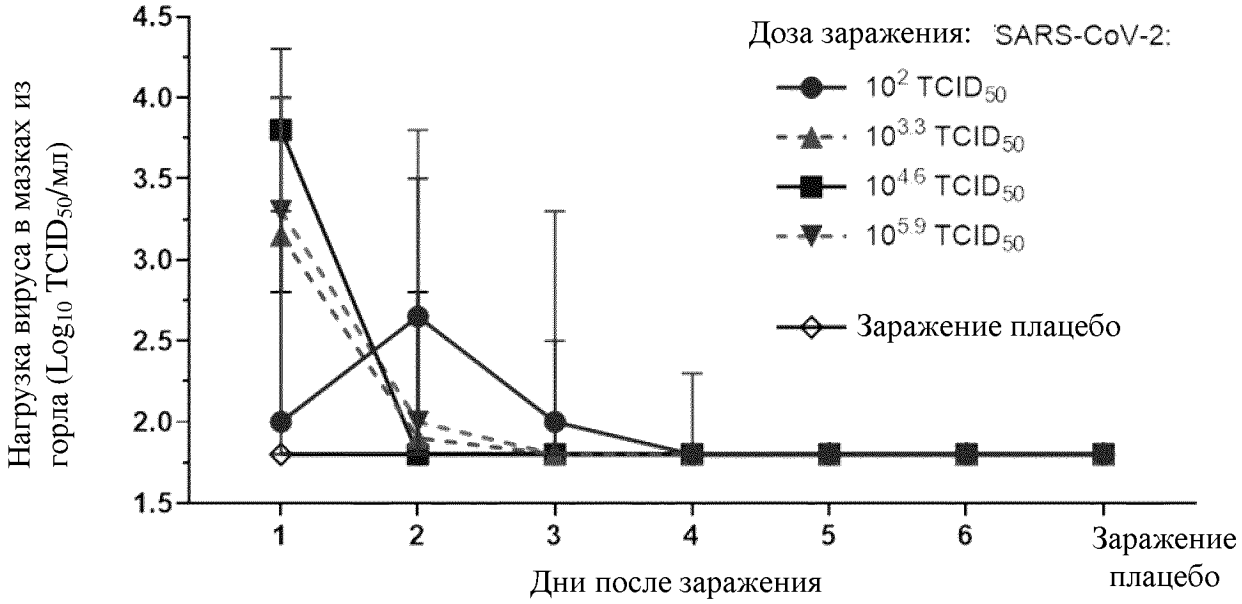
Фиг. 125



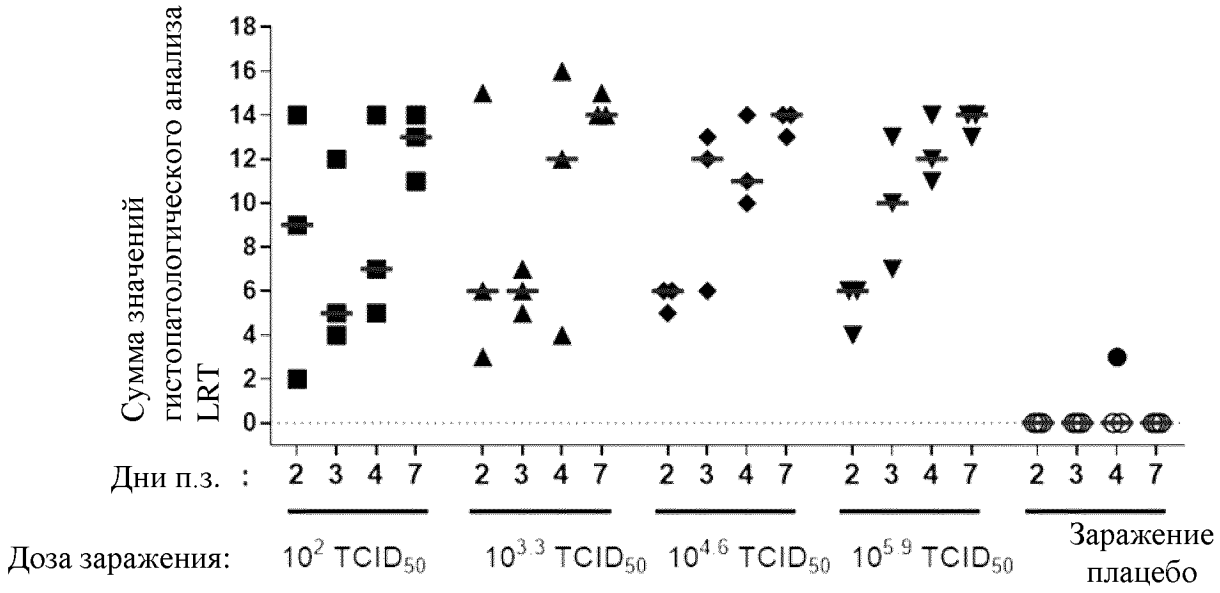
Фиг. 126A



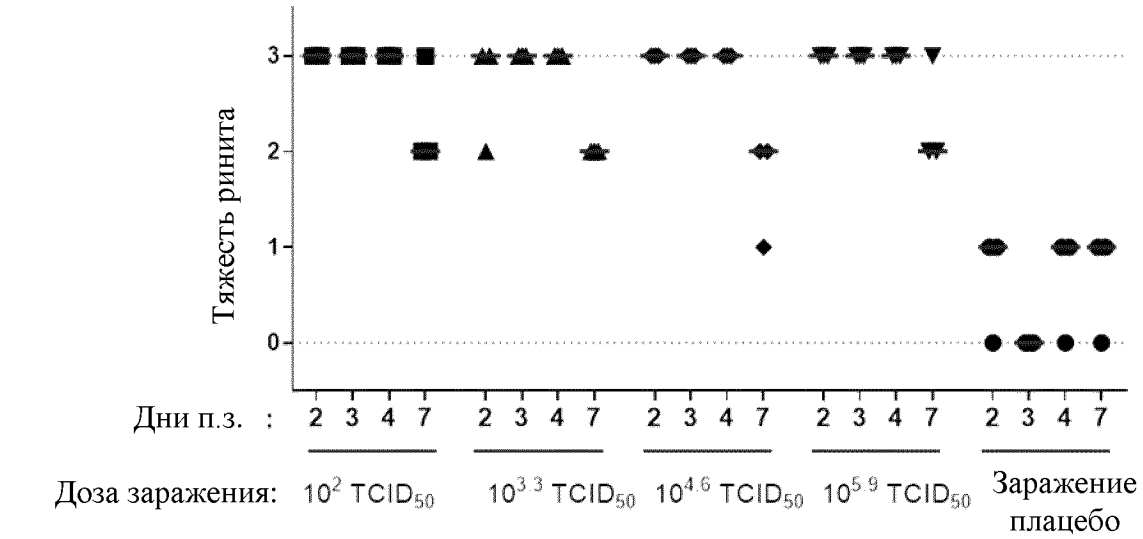
Фиг. 126B



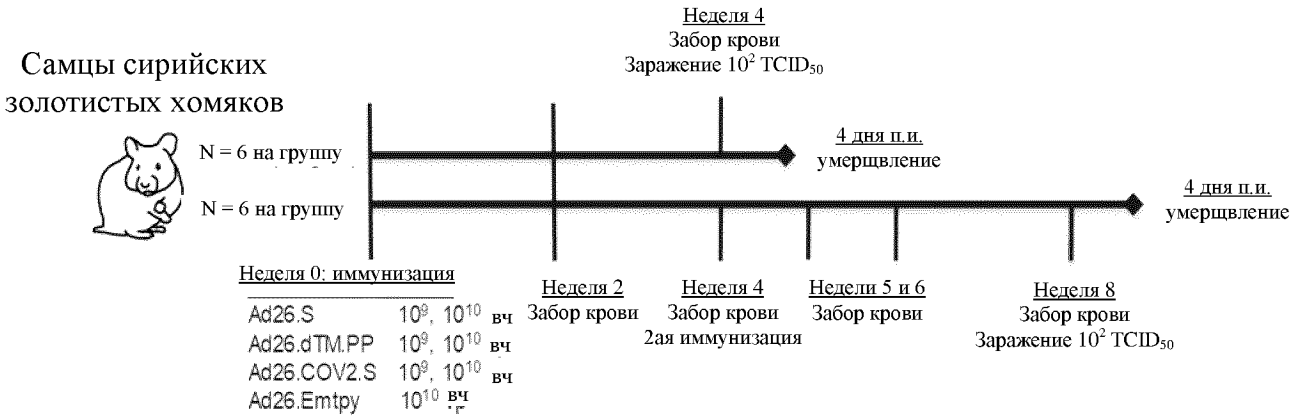
Фиг. 126C



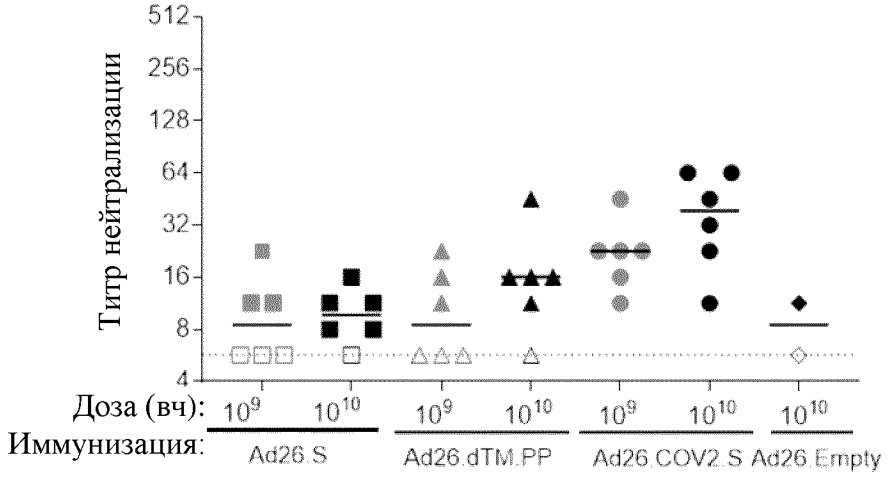
Фиг. 126D



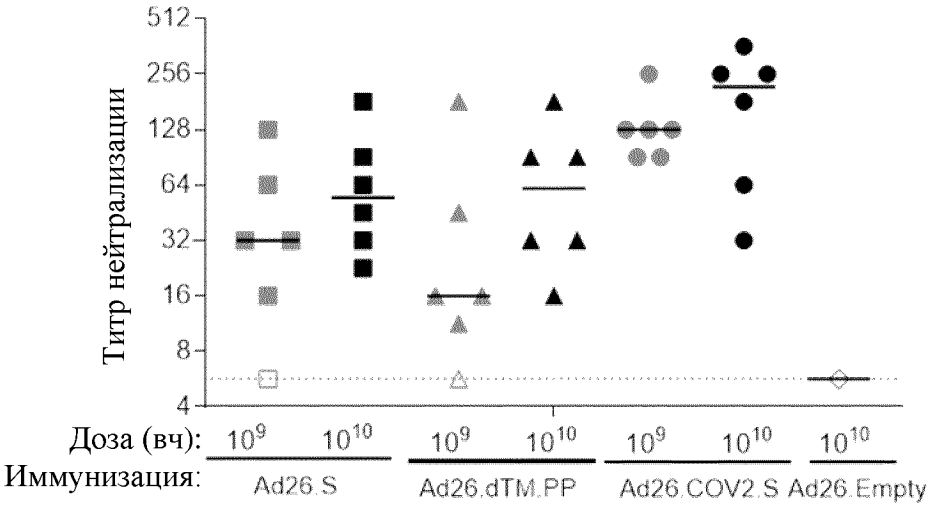
Фиг. 126E



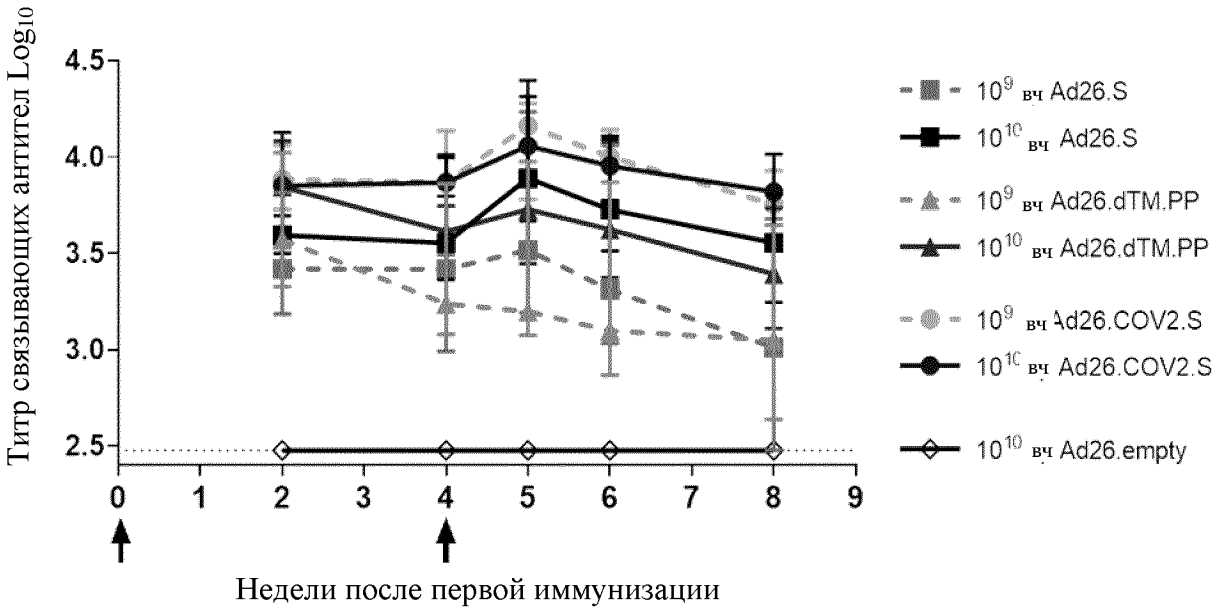
Фиг. 127A



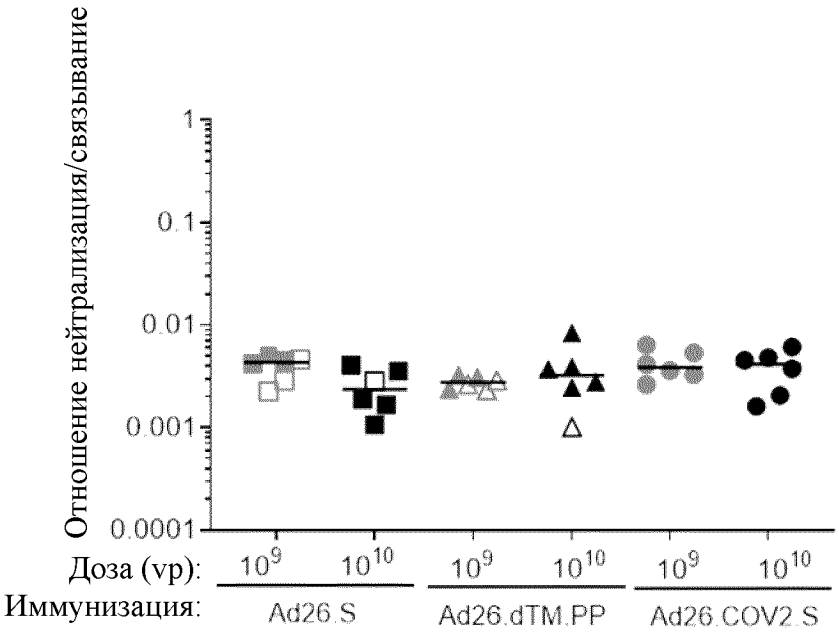
Фиг. 127B



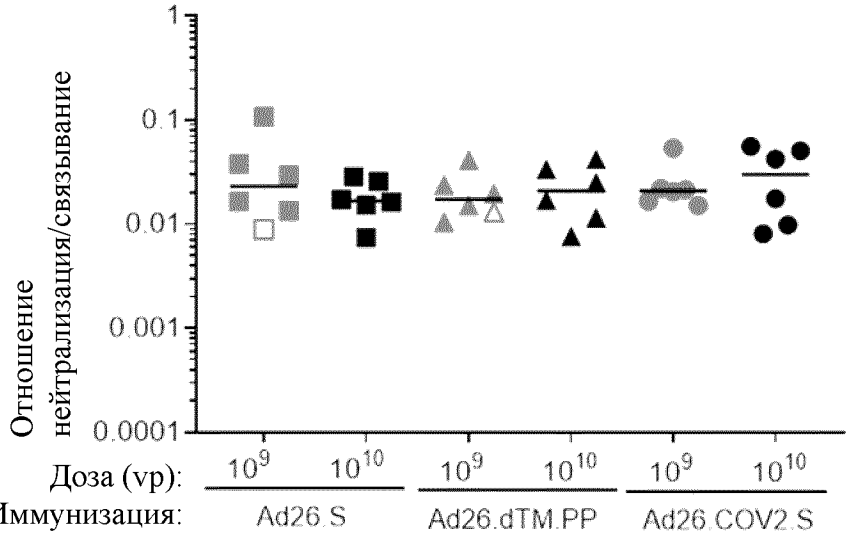
Фиг. 127C



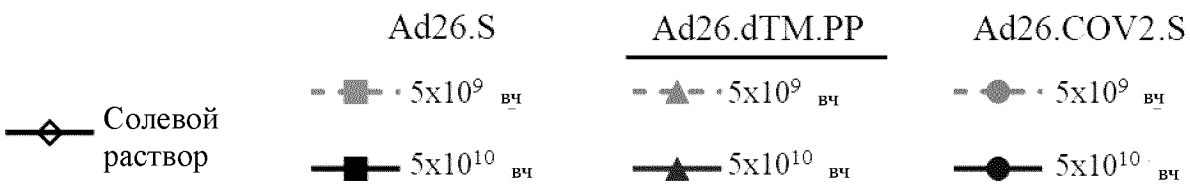
Фиг. 128A



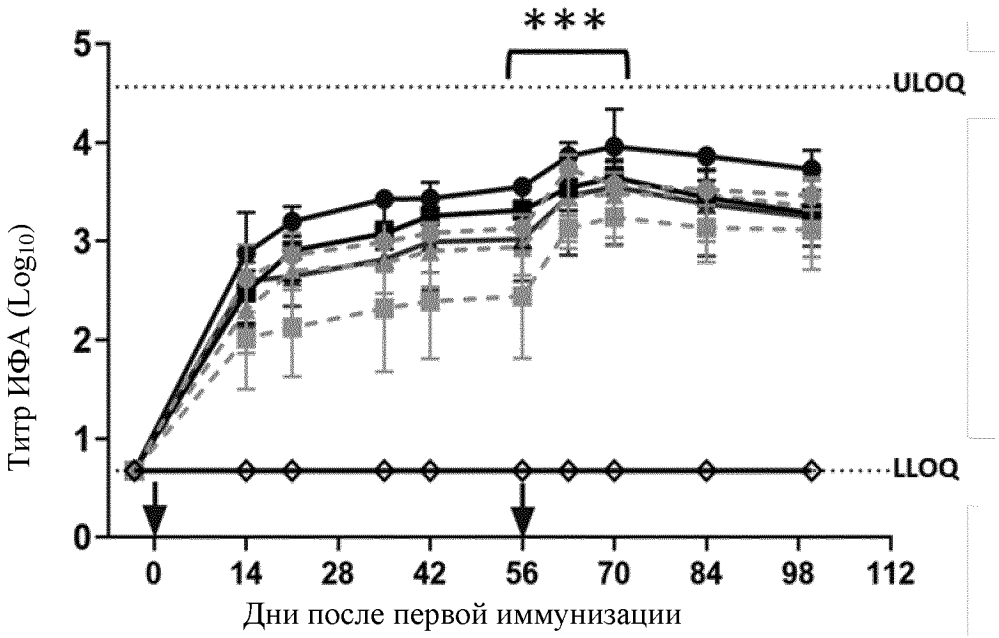
Фиг. 128B



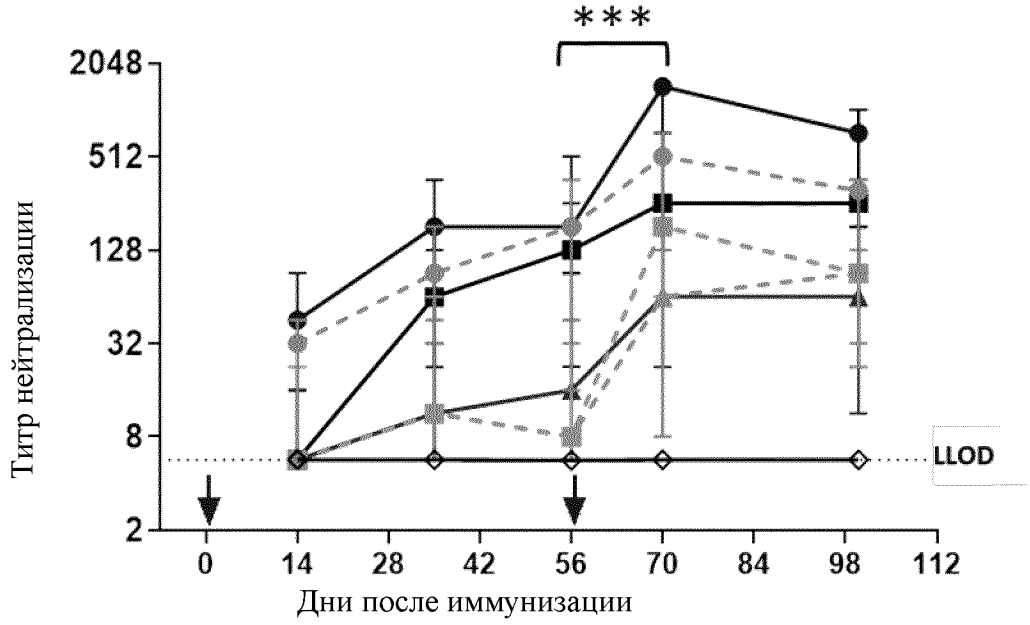
Фиг. 128C



Фиг. 129A

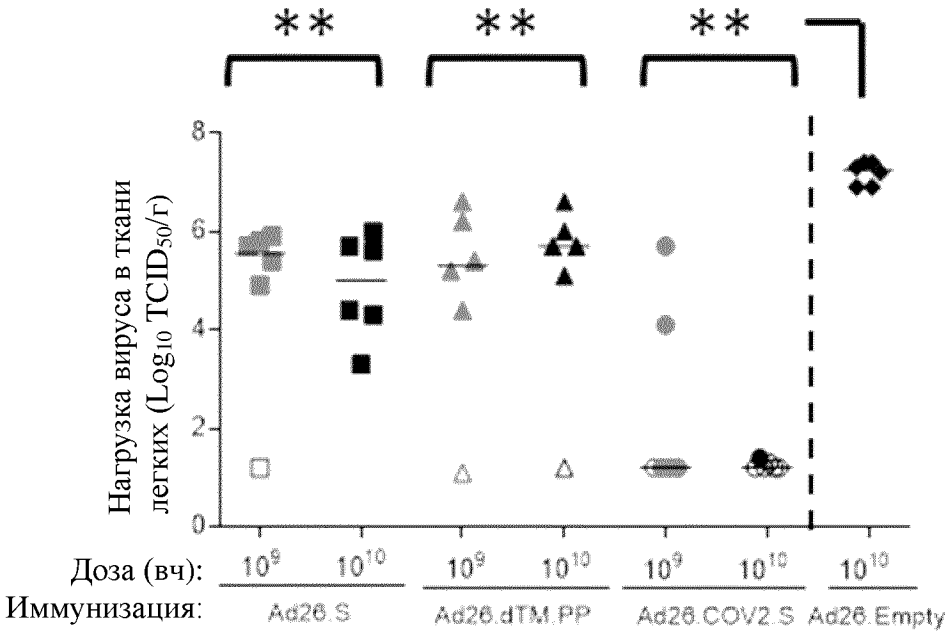


Фиг. 129B



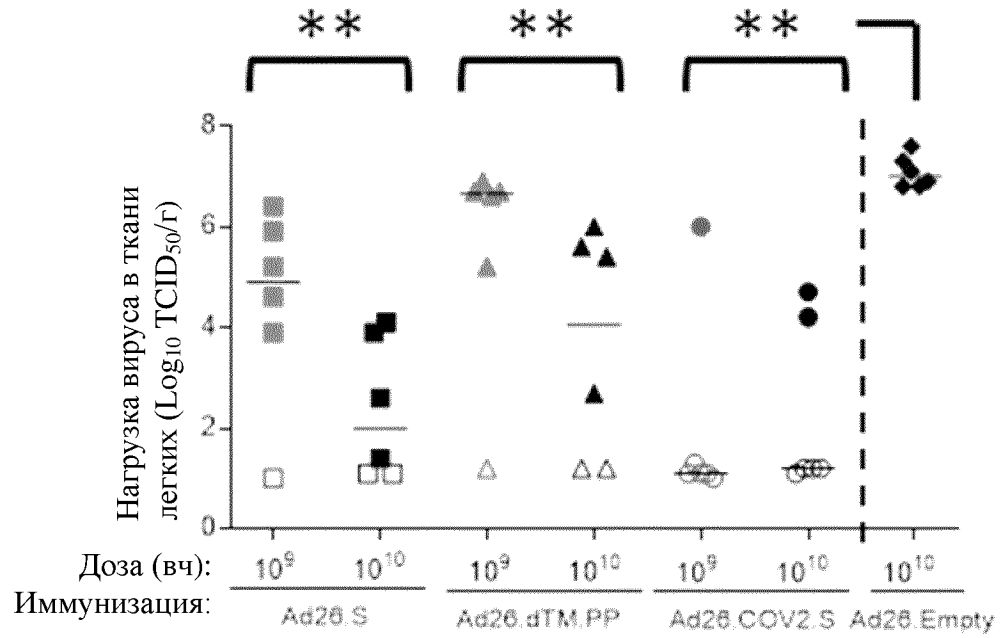
Фиг. 129C

a) Доза 1 легкое VL



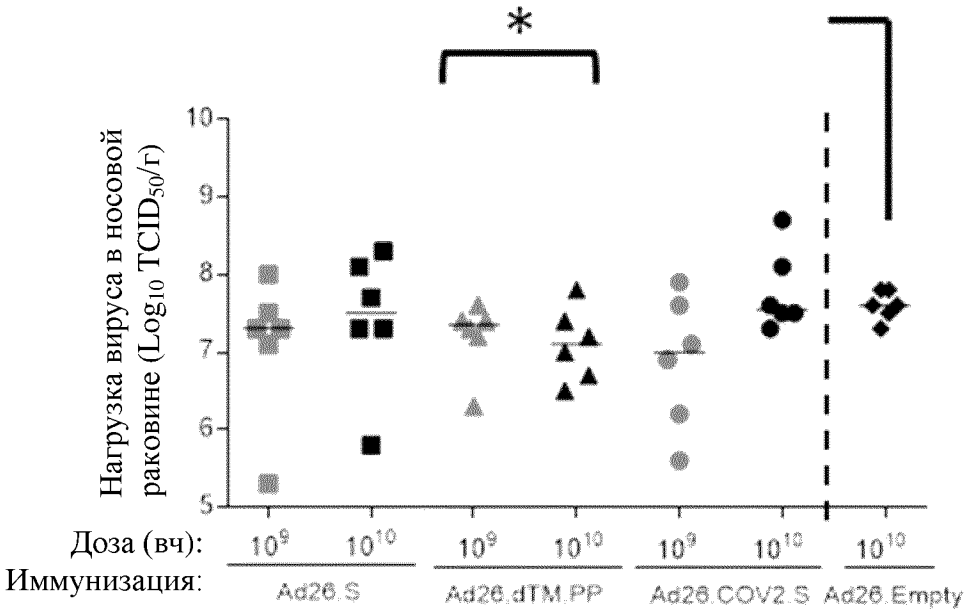
Фиг. 130A

b) Доза 2 легкое VL



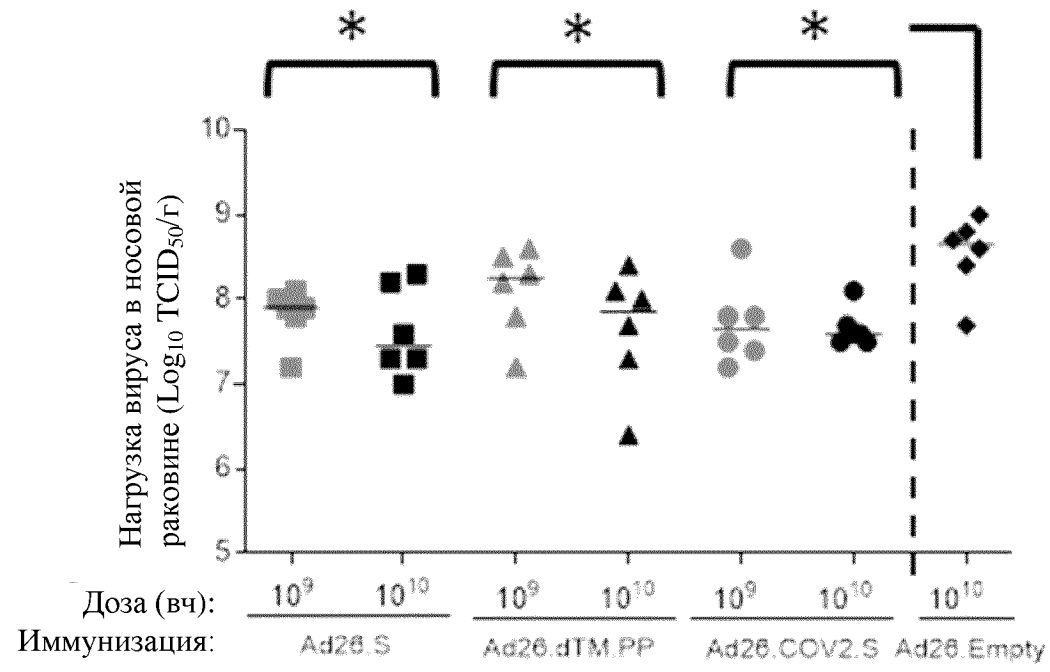
Фиг. 130B

c) Доза 1 нос VL



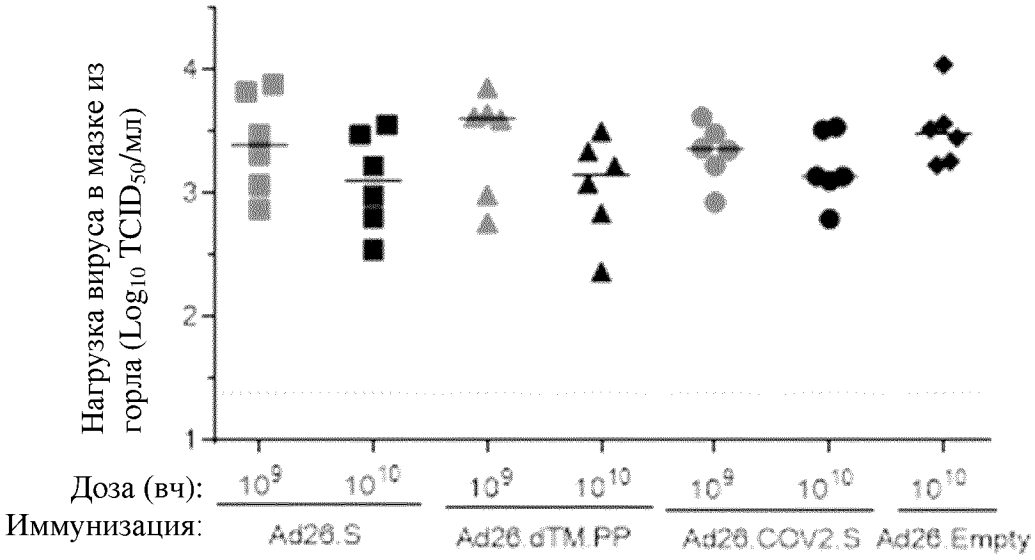
Фиг. 130C

d) Доза 2 нос VL



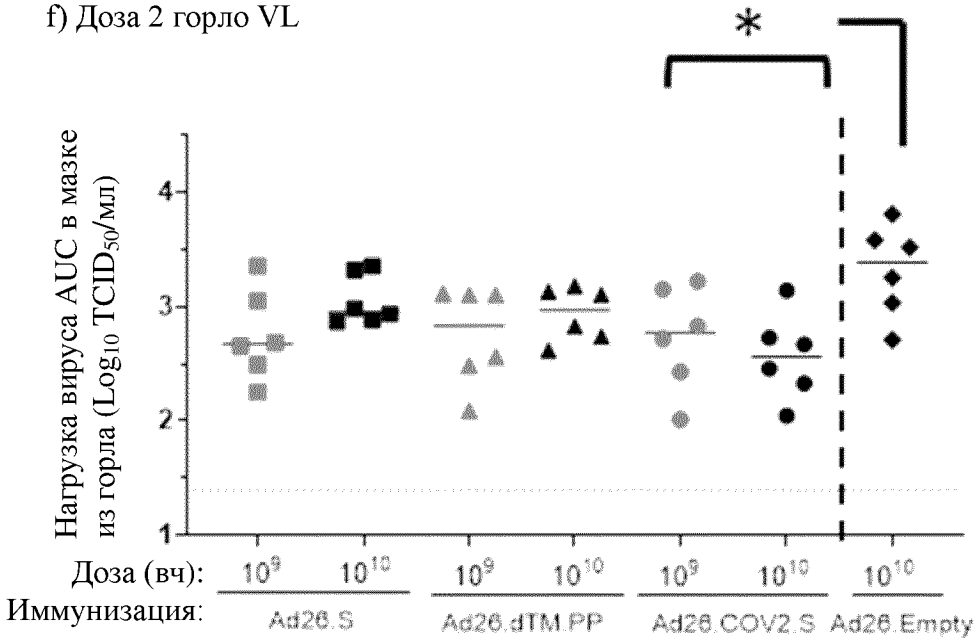
Фиг. 130D

e) Доза 1 горло VL



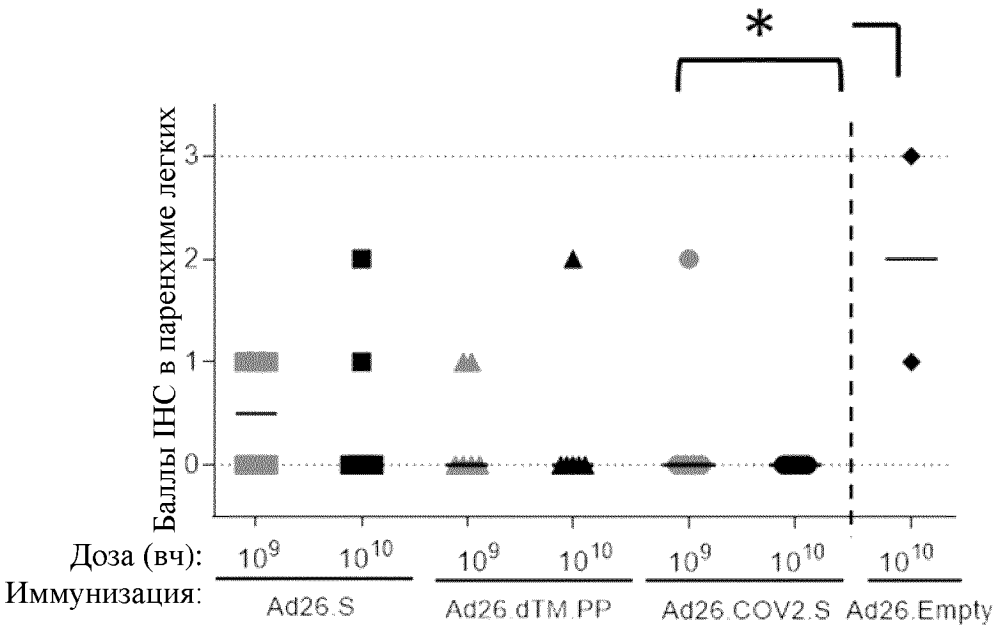
Фиг. 130E

f) Доза 2 горло VL



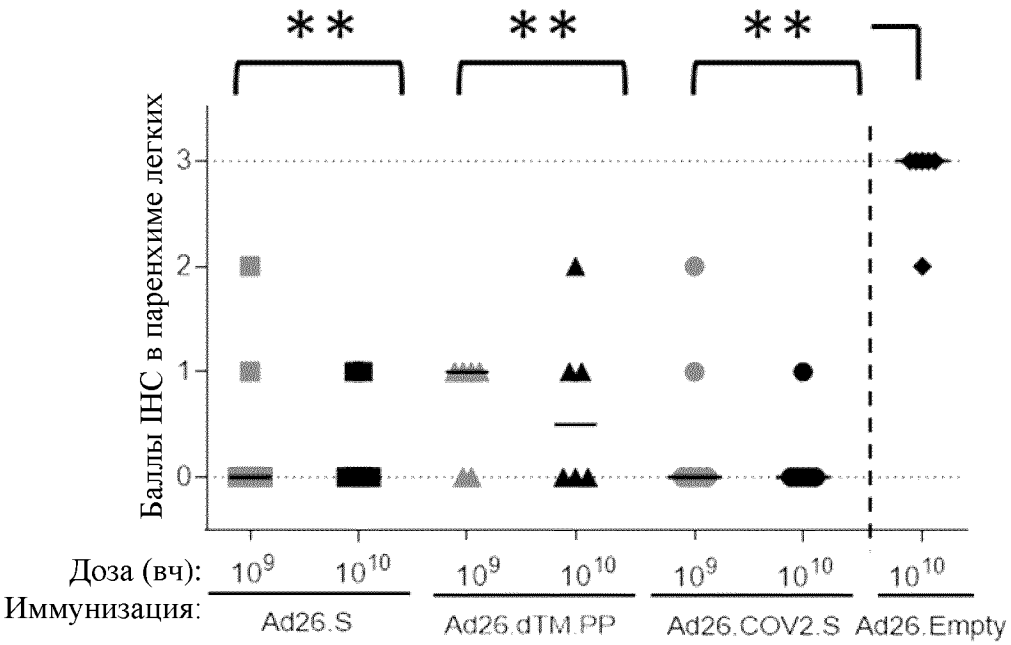
Фиг. 130F

a) Доза 1 легкое IHC



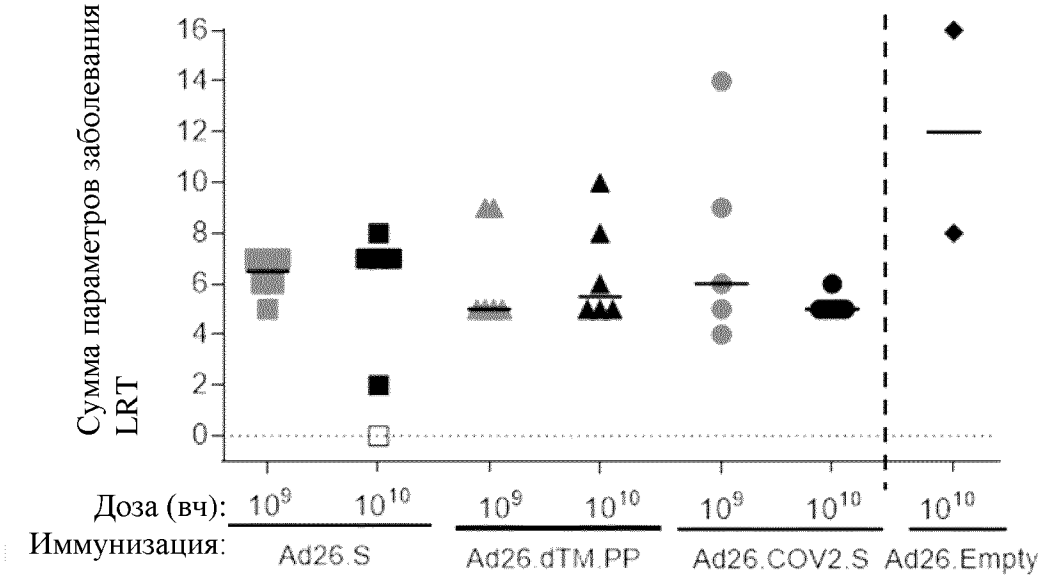
Фиг. 131A

b) Доза 2 легкое IHC



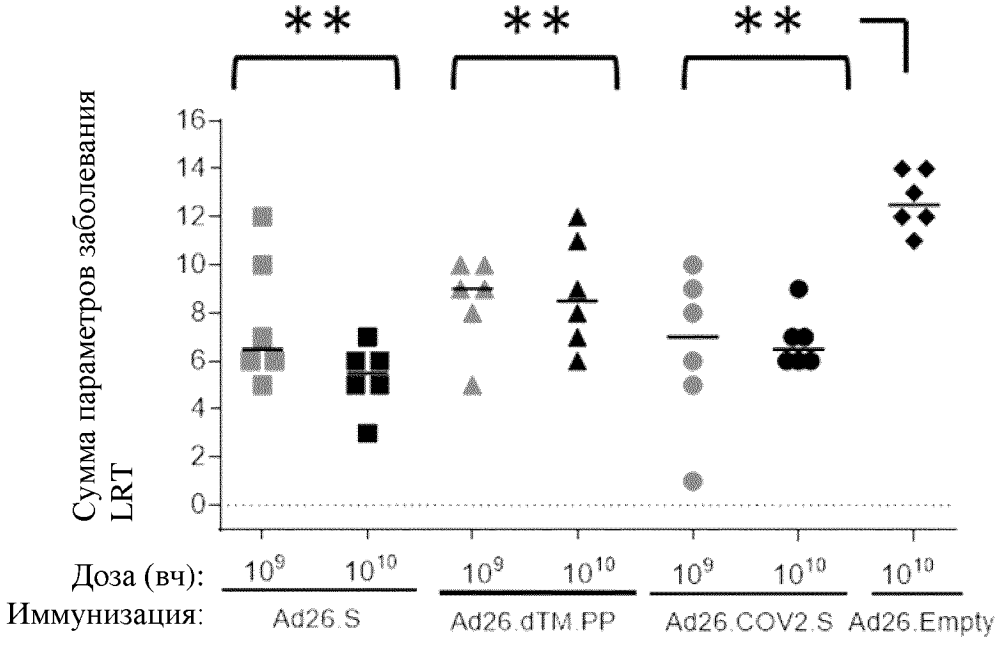
Фиг. 131B

c) Доза 1, гистопатология LRT легкого



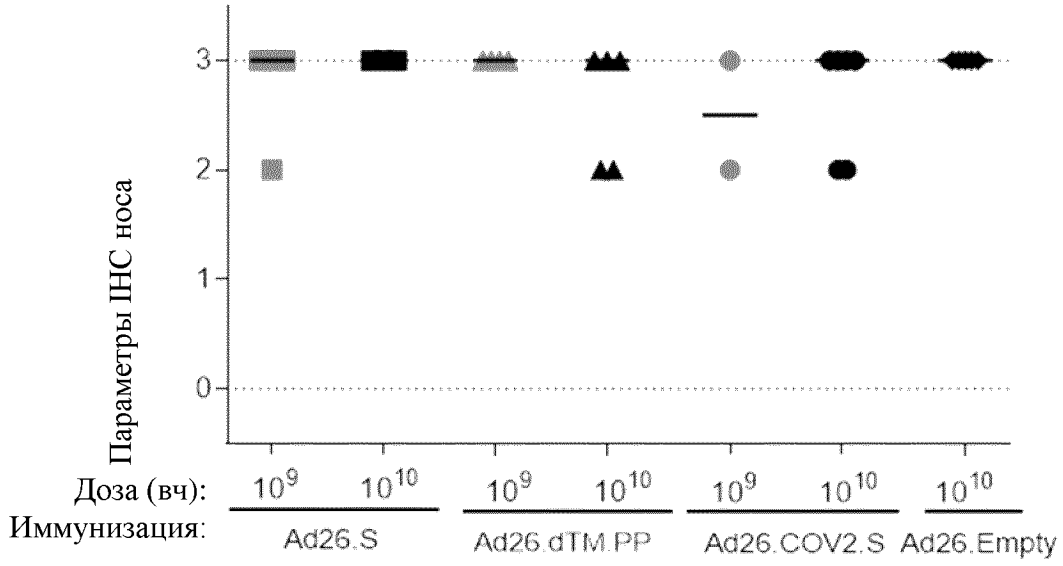
Фиг. 131C

d) Доза 2, гистопатология LRT легкого



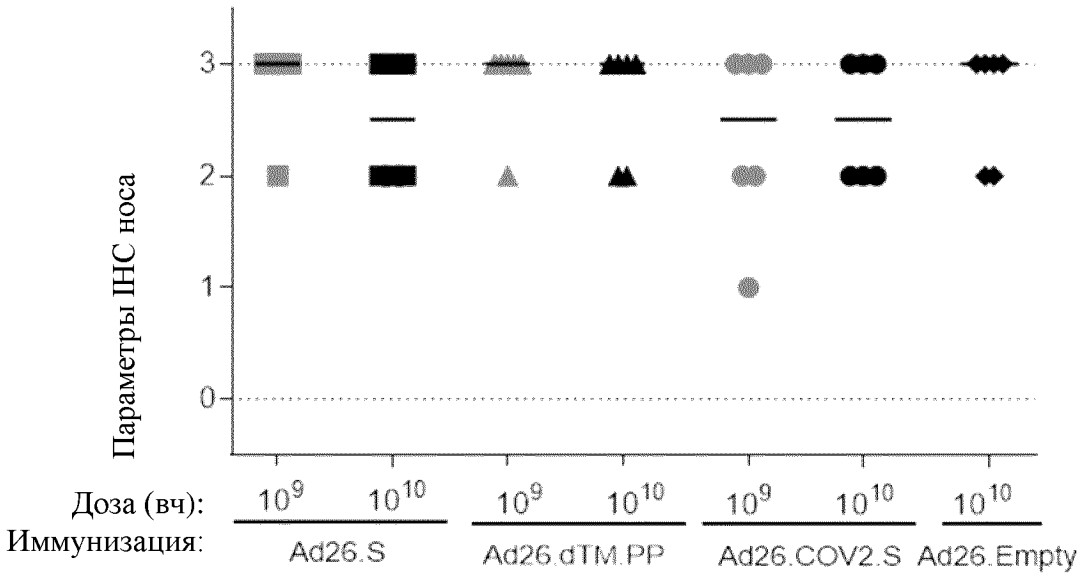
Фиг. 131D

a) Доза 1, нос IHC



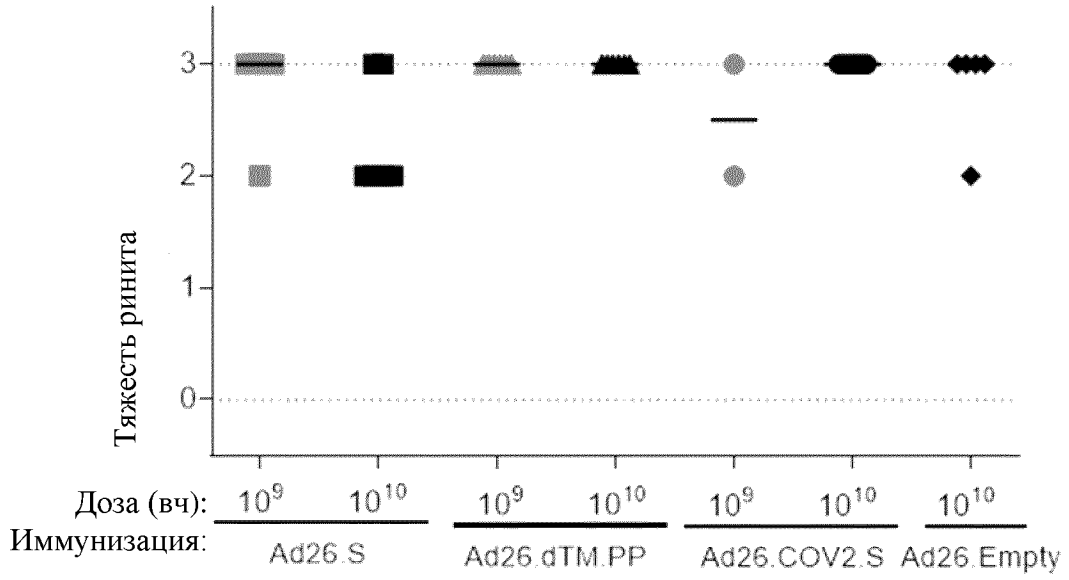
Фиг. 132A

d) Доза 2, нос IHC



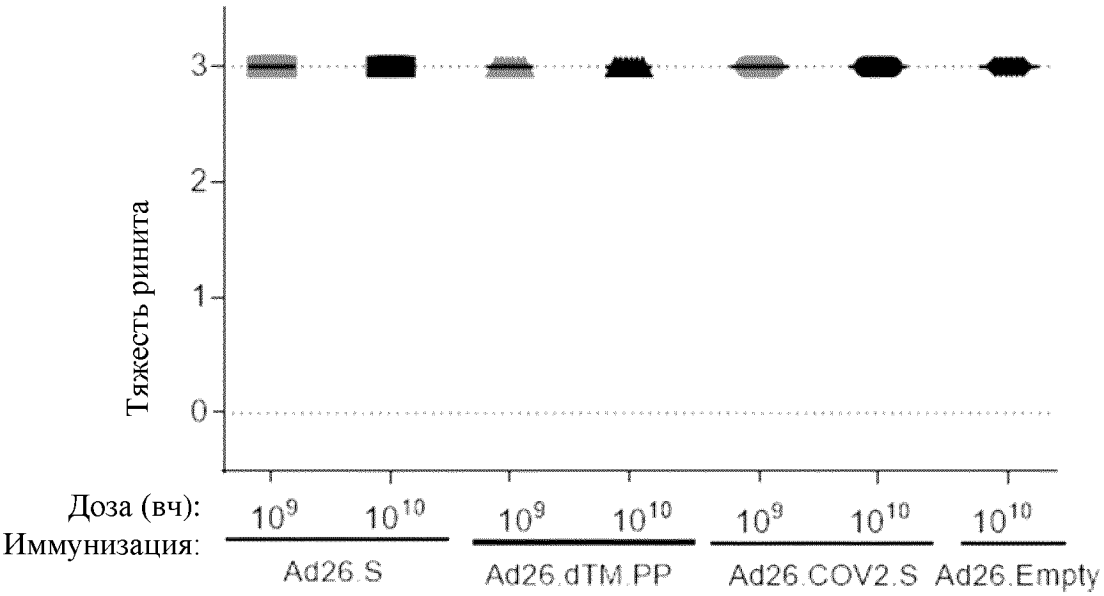
Фиг. 132B

c) Доза 1, параметры гистопатологии носа



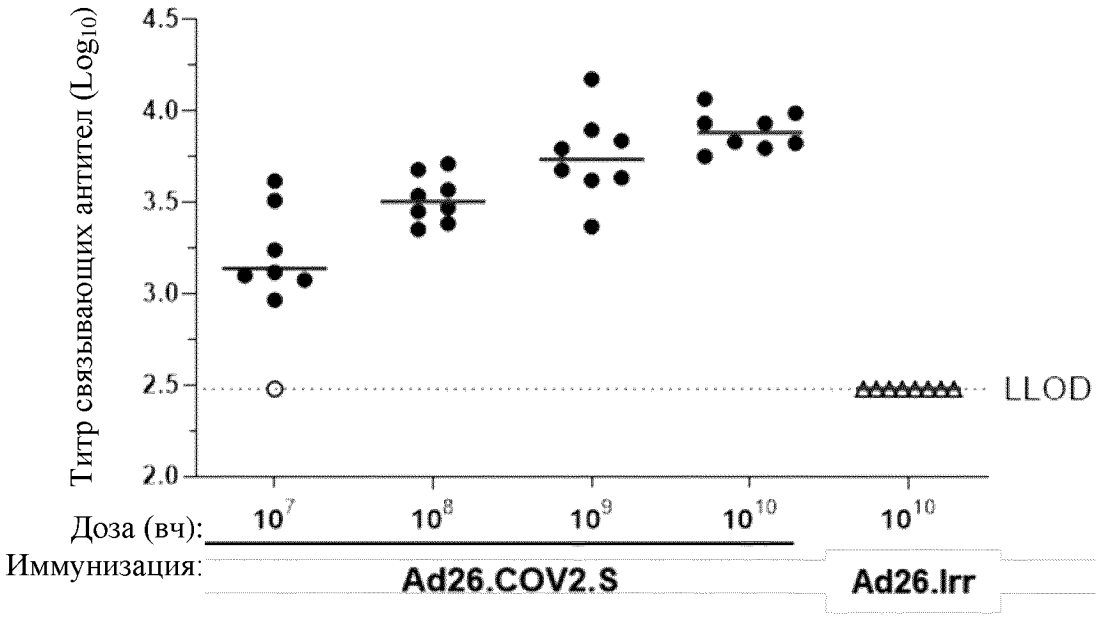
Фиг. 132C

d) Доза 2, параметры гистопатологии носа



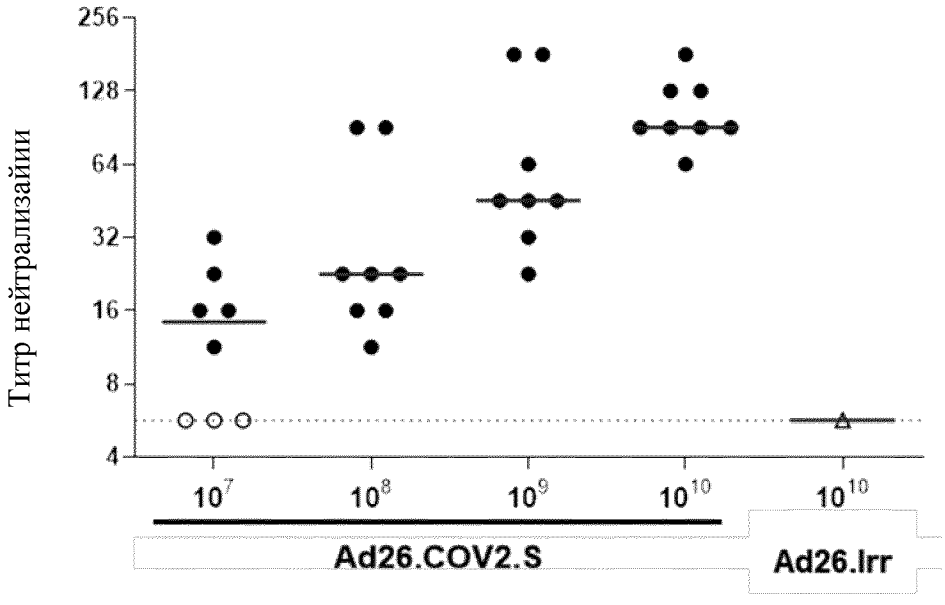
Фиг. 132D

a) Связывающие антитела



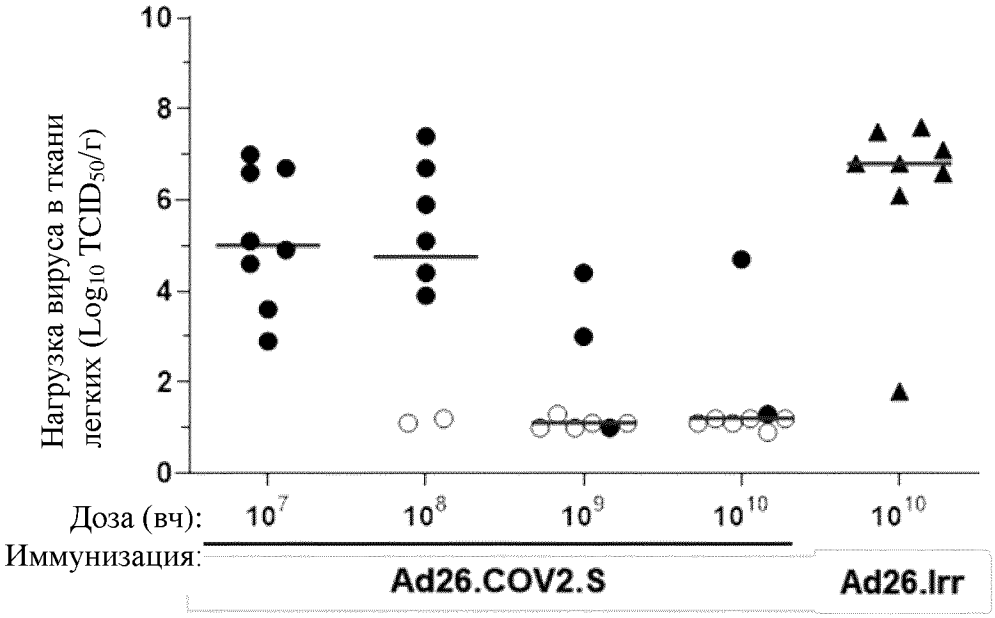
Фиг. 133A

b) nAbs



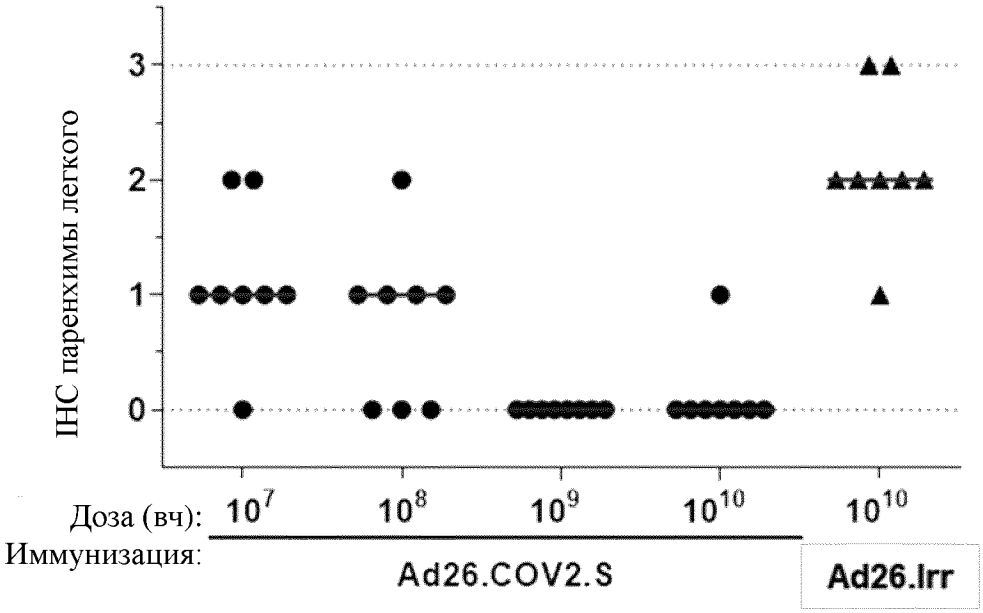
Фиг. 133B

c) Легкое VL



Фиг. 133C

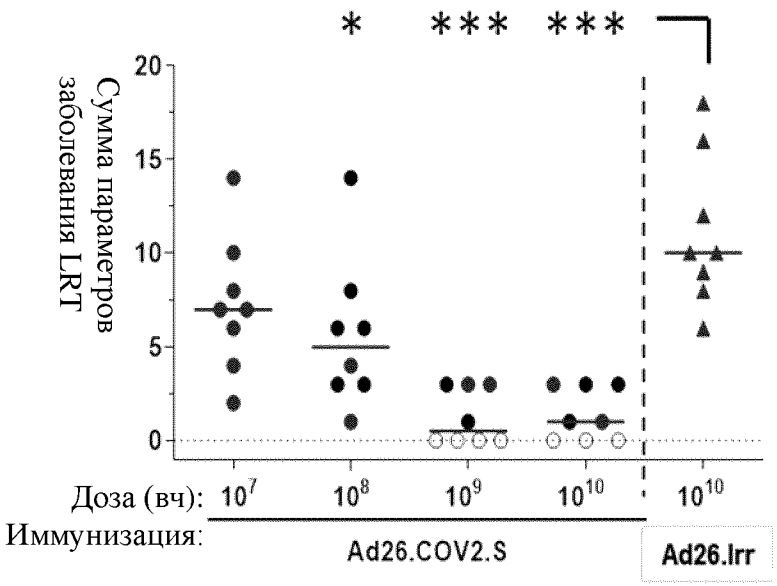
d) IHC паренхимы легкого



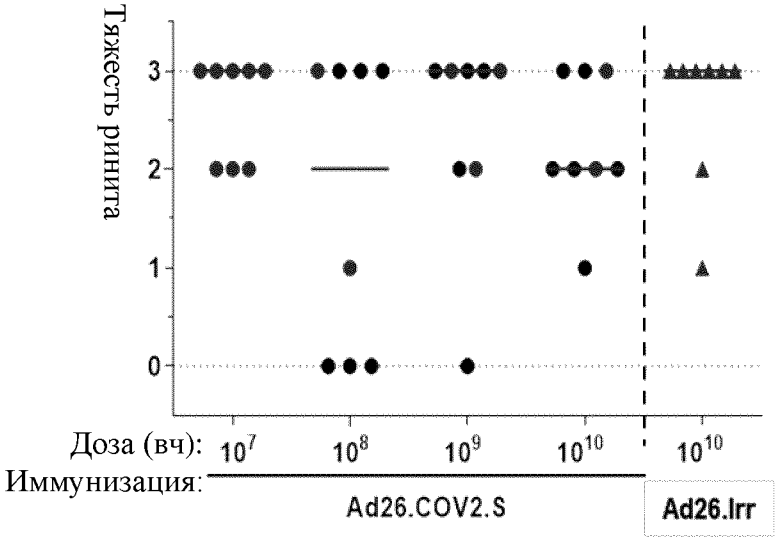
Фиг. 133D

Фиг. 134

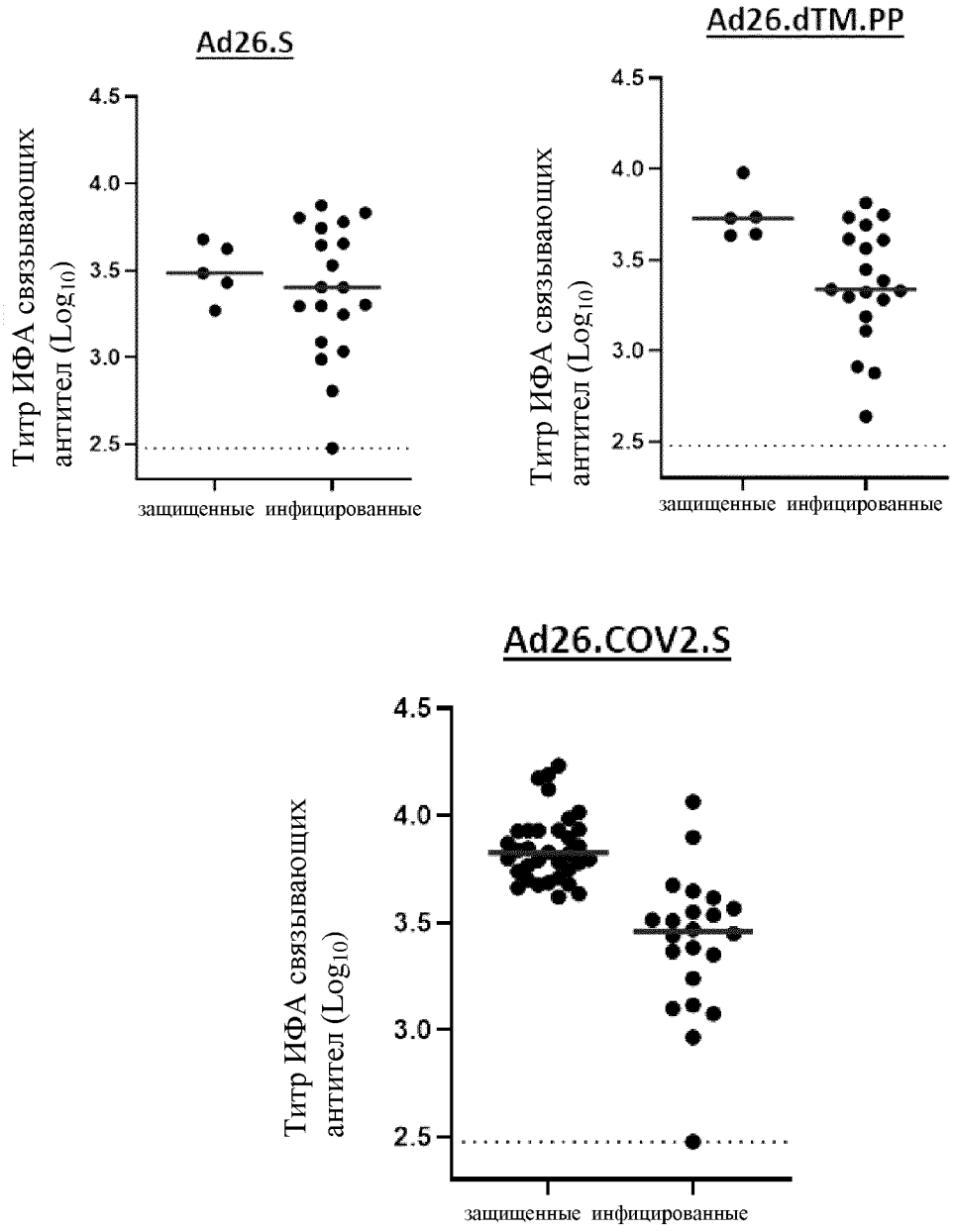
a) Параметры LRT



b) Воспаление ткани носа

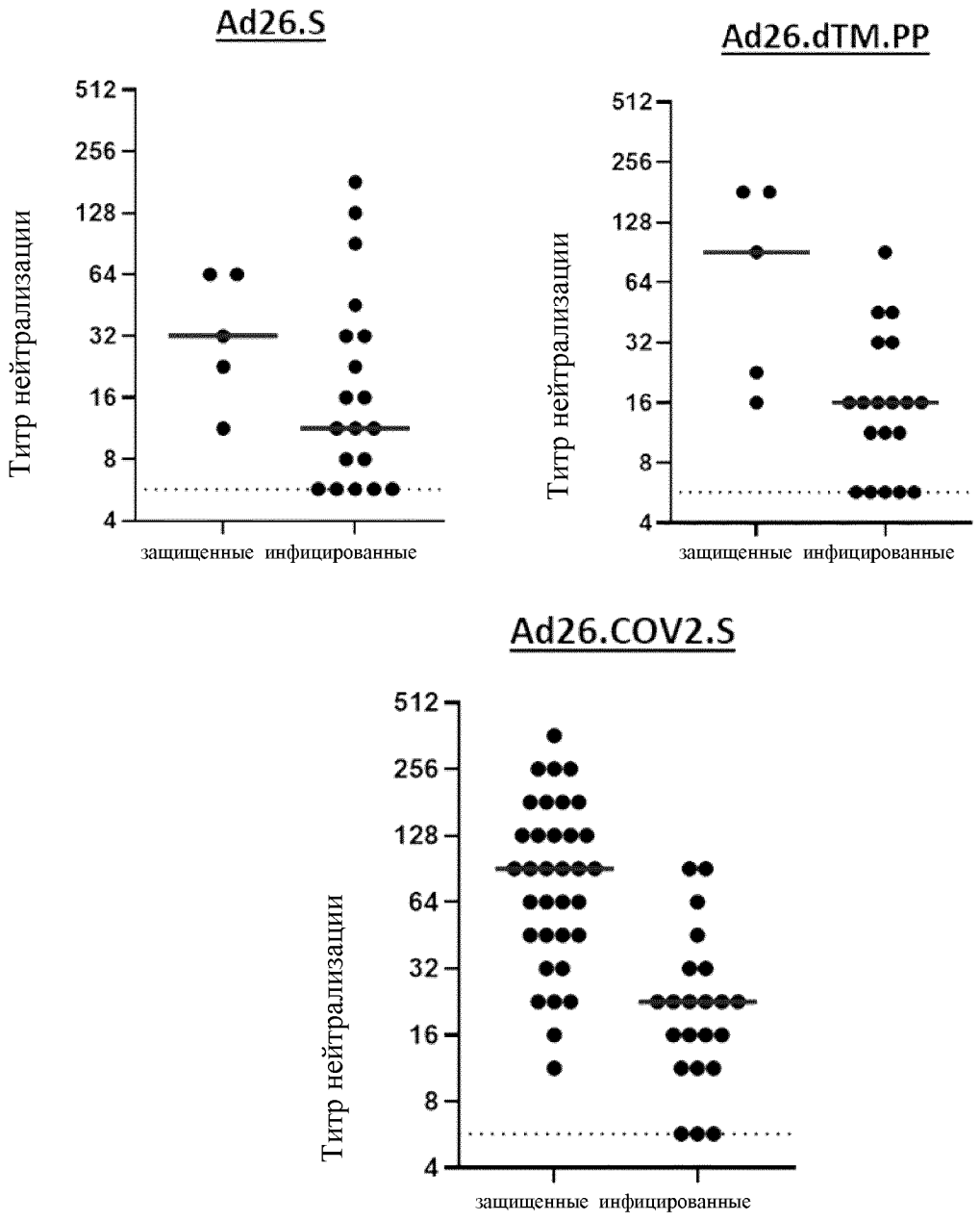


A) VL легкого по сравнению с ИФА



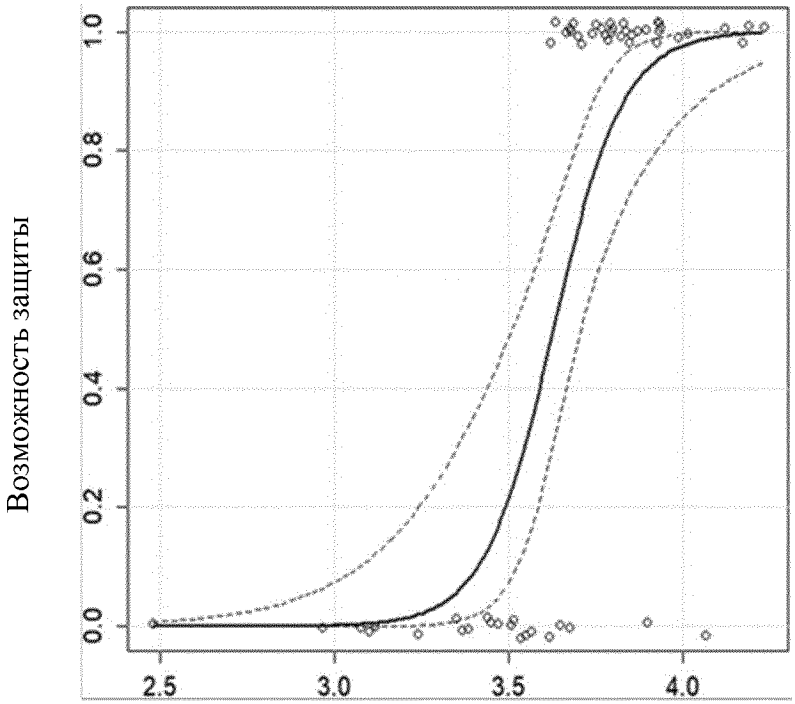
Фиг. 135A

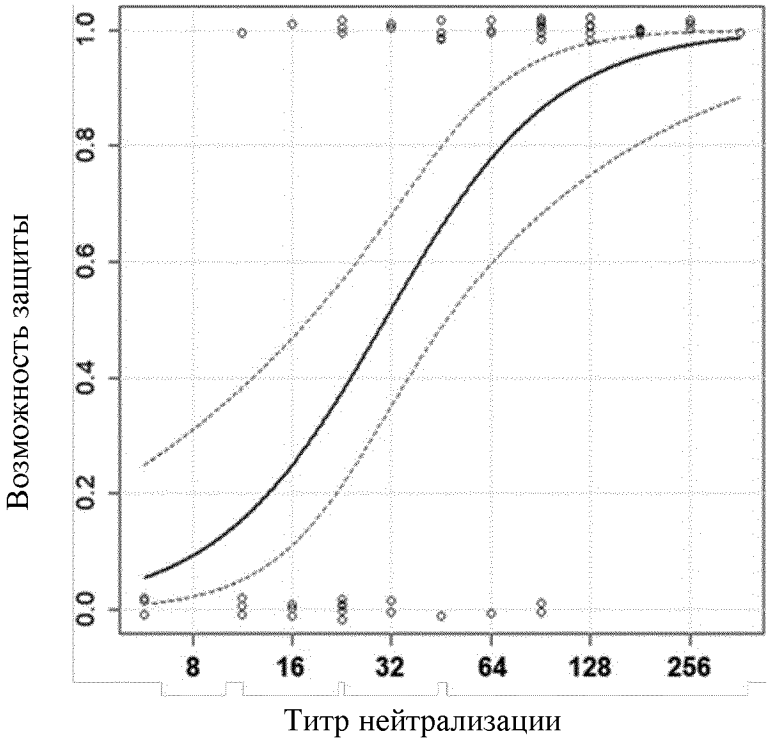
B) VL легкого по сравнению с wtVNA



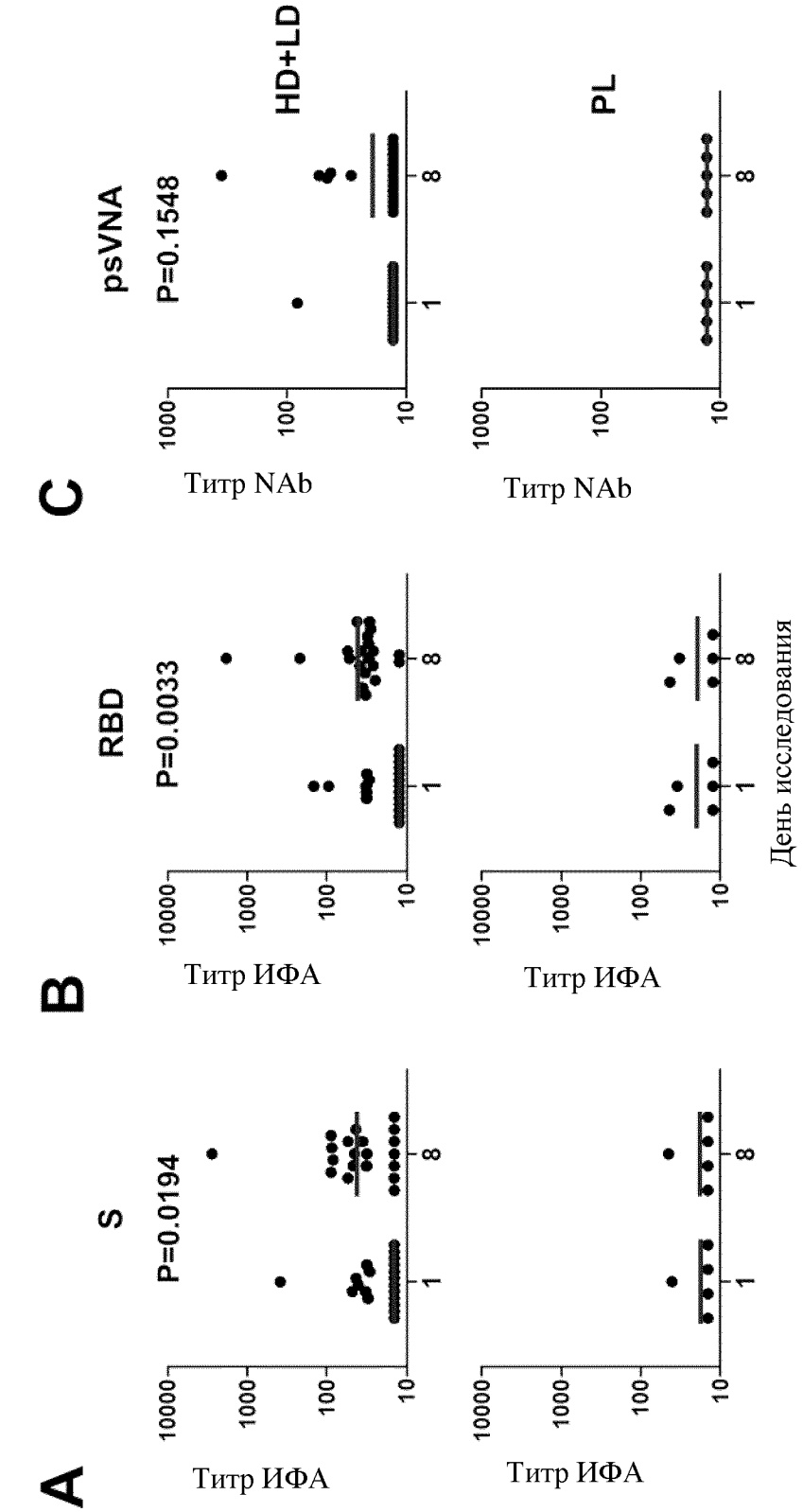
Фиг. 135B

C) Логистическая регрессия VL легкого по сравнению с wtVNA и ИФА у хомяков, иммунизованных Ad26.COV2.S

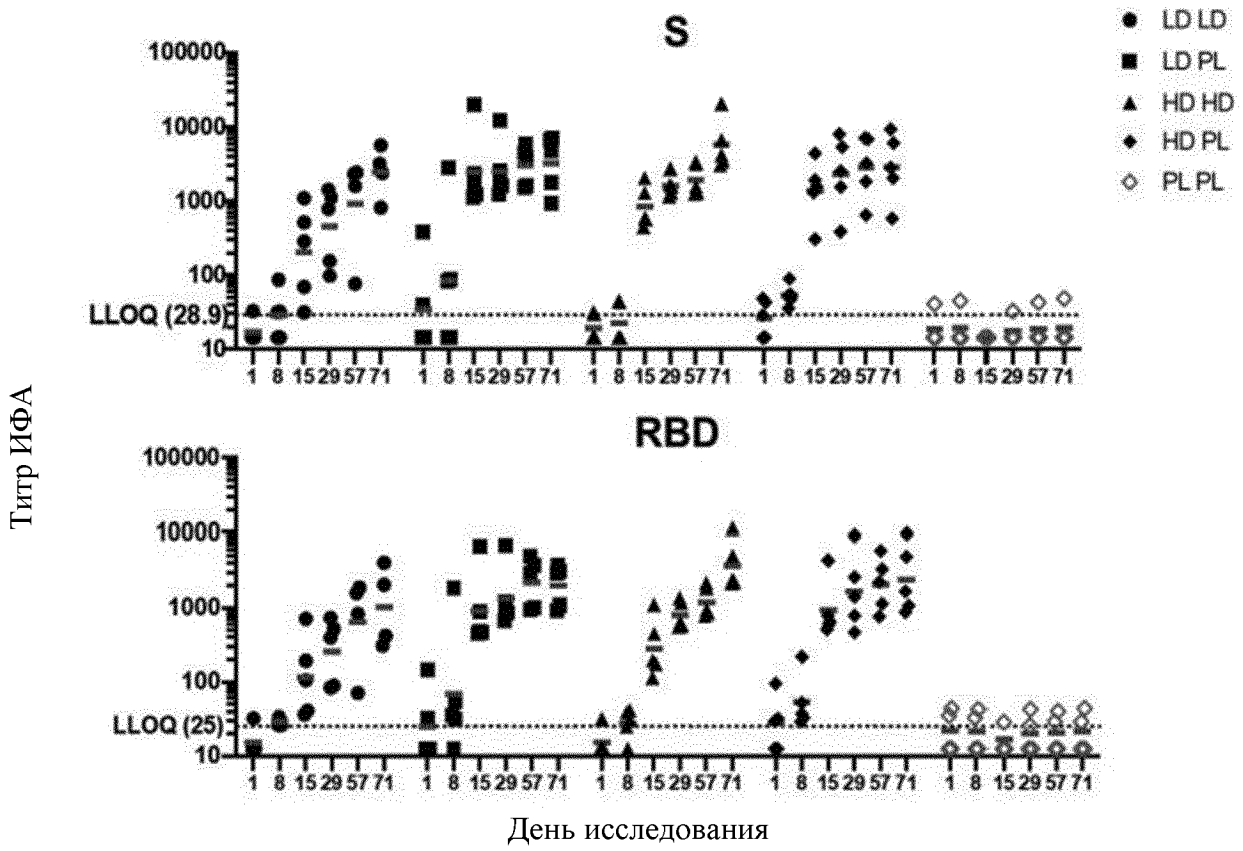




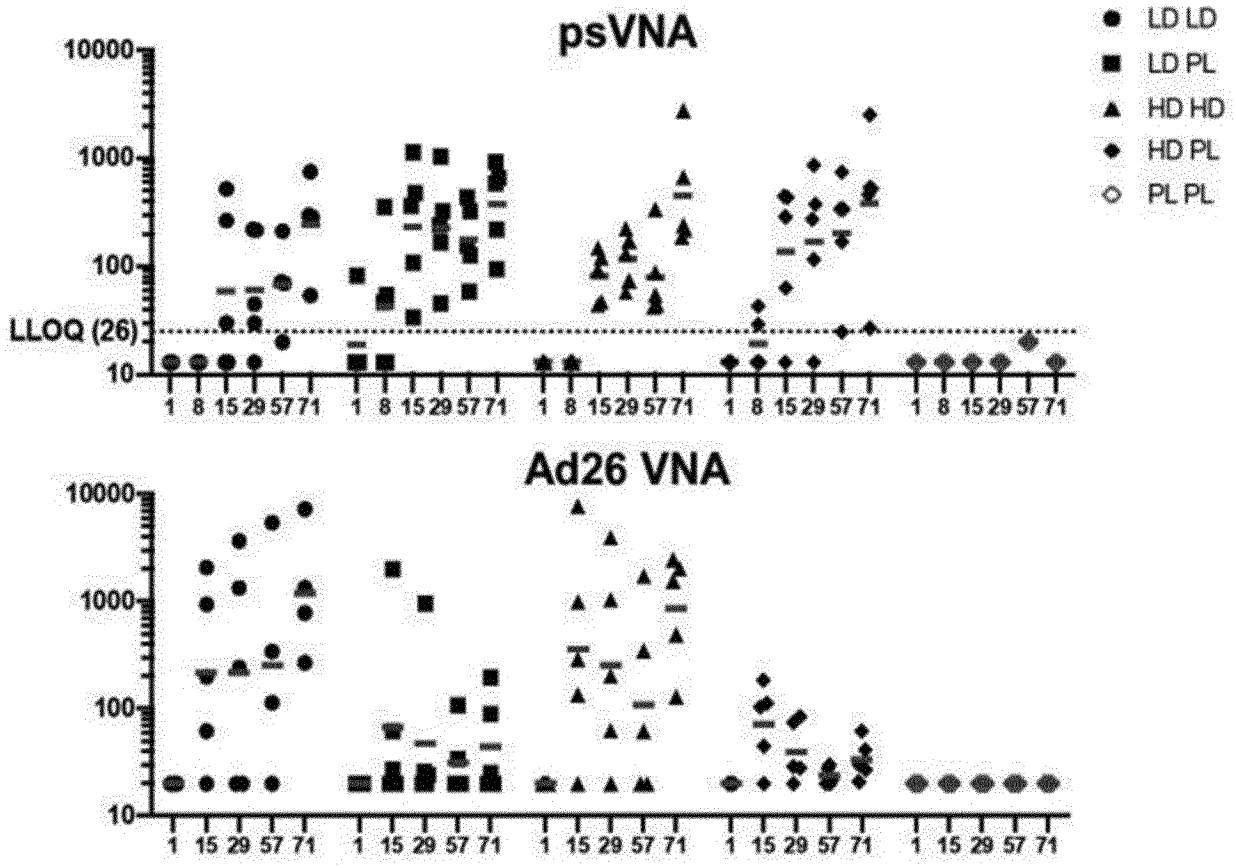
Фиг. 135C



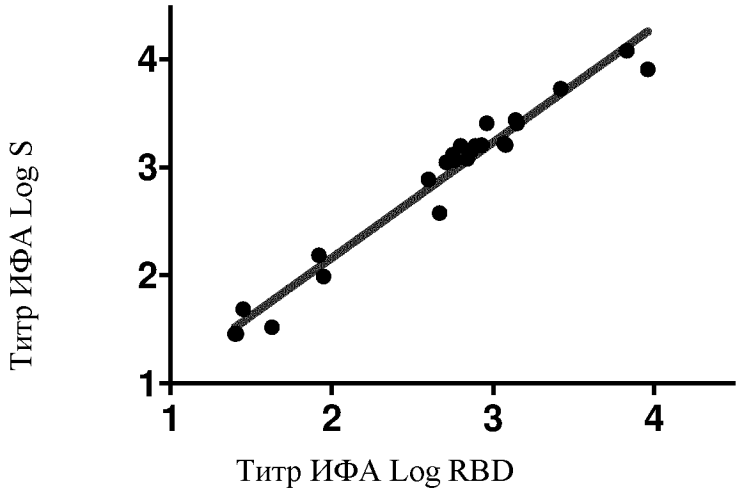
Фиг. 136A-136C

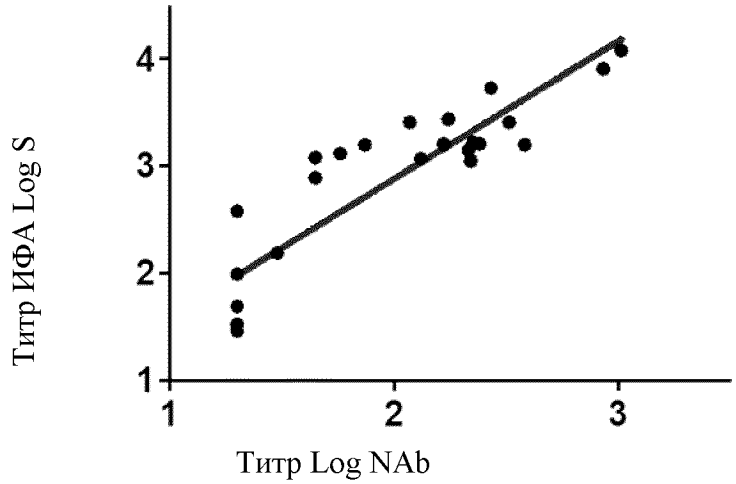

S
RBD
LD LD
LD PL
HD HD
HD PL
PL PL
100000
10000
1000
100
LLOQ (28.9)
LLOQ (25)
10
1 8 15 29 57 71
Титр ИФА
День исследования

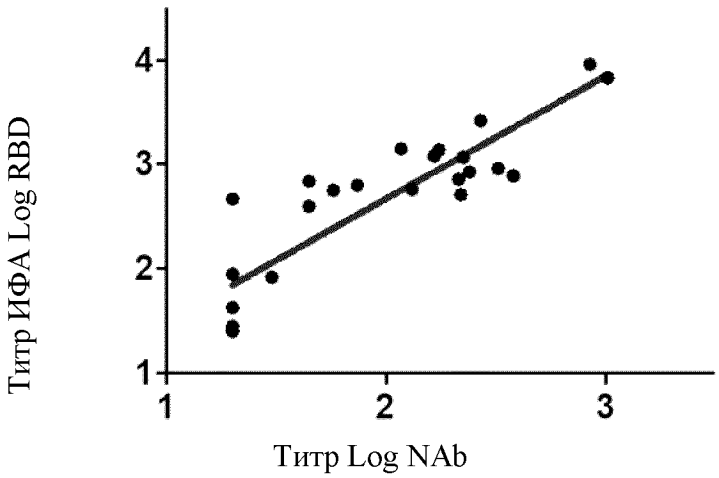
Фиг. 137A


psVNA
LD LD
LD PL
HD HD
HD PL
PL PL
10000
1000
100
LLOQ (26)
10
1 8 15 29 57 71
Ad26 VNA
10000
1000
100
10
1 15 29 57 71
День исследования

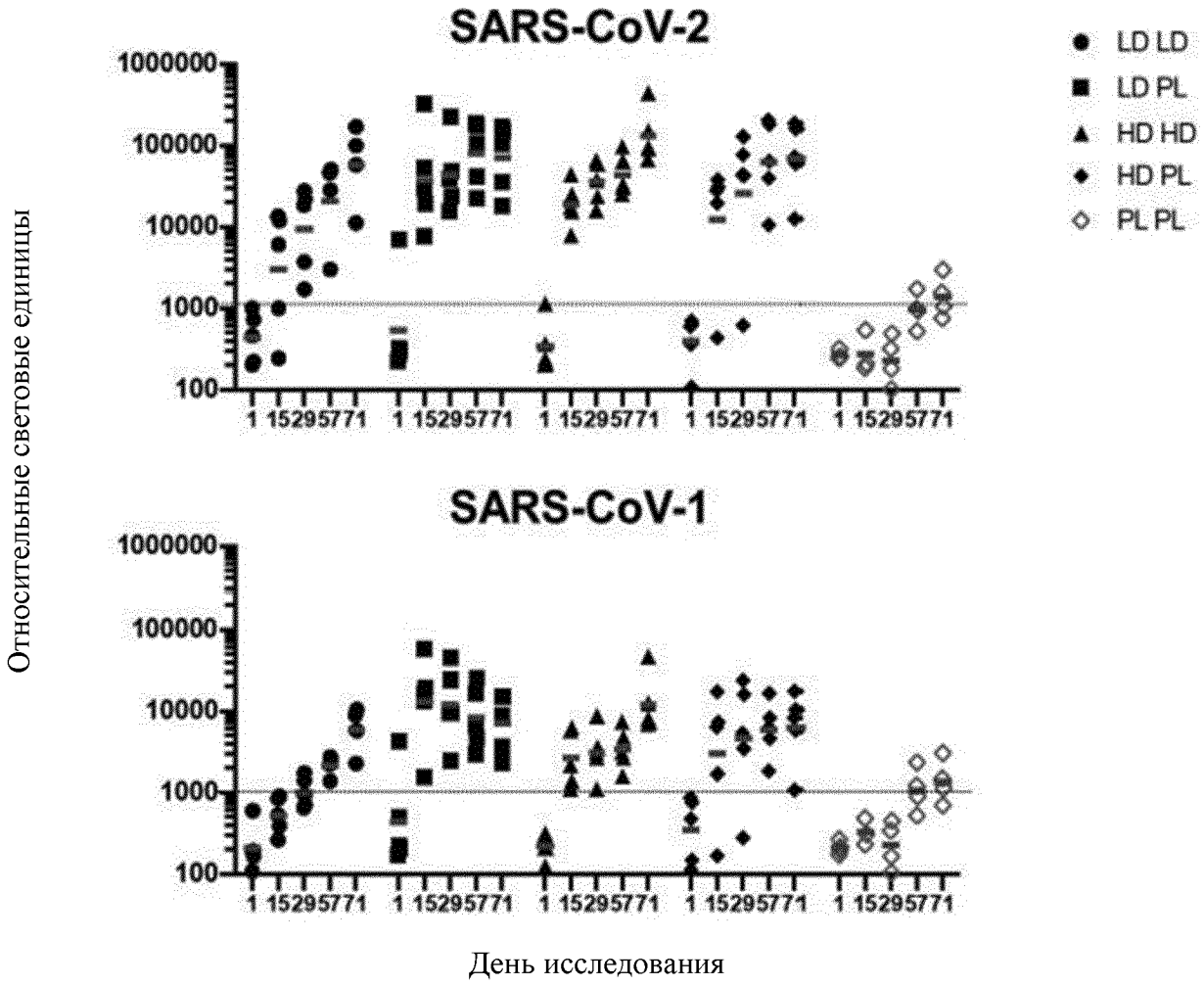
Фиг. 137B


Титр ИФА Log S
Титр ИФА Log RBD
1
2
3
4

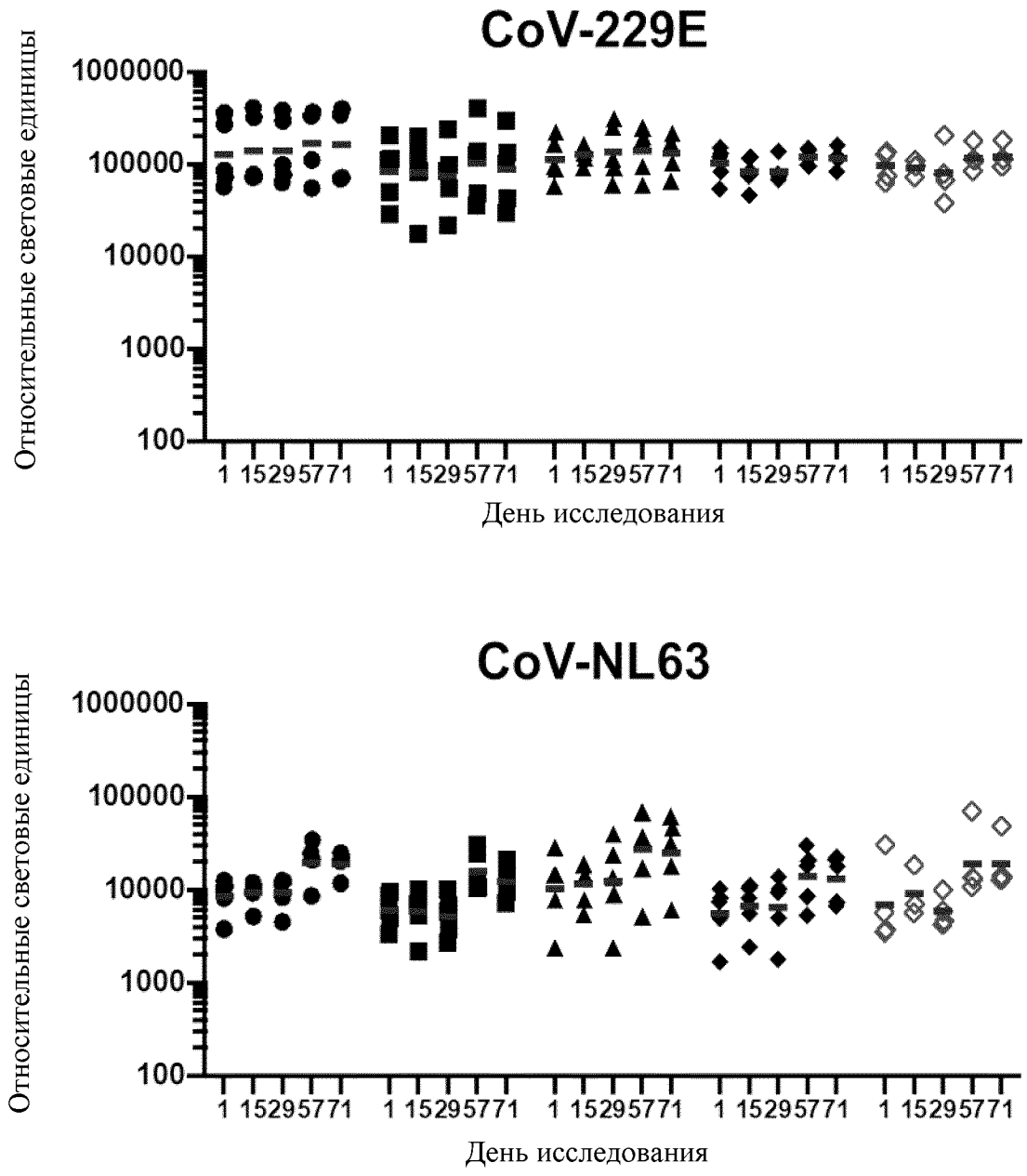

Титр ИФА Log S
Титр Log NAb
1
2
3
4


Титр ИФА Log RBD
Титр Log NAb
1
2
3
4

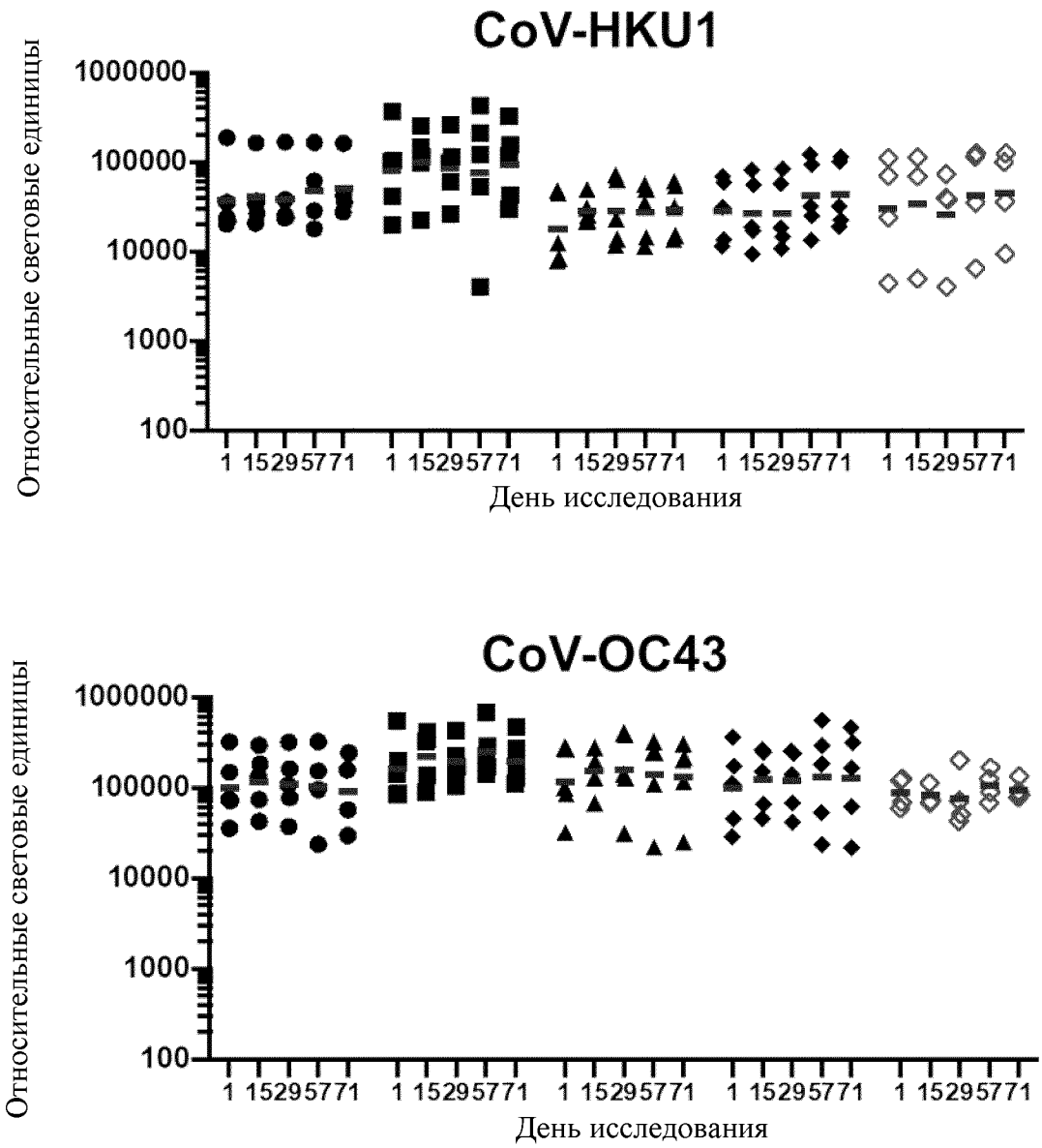
Фиг. 138


SARS-CoV-2
SARS-CoV-1
LD LD
LD PL
HD HD
HD PL
PL PL
Относительные световые единицы
1000000
100000
10000
1000
100
1 15295771
День исследования

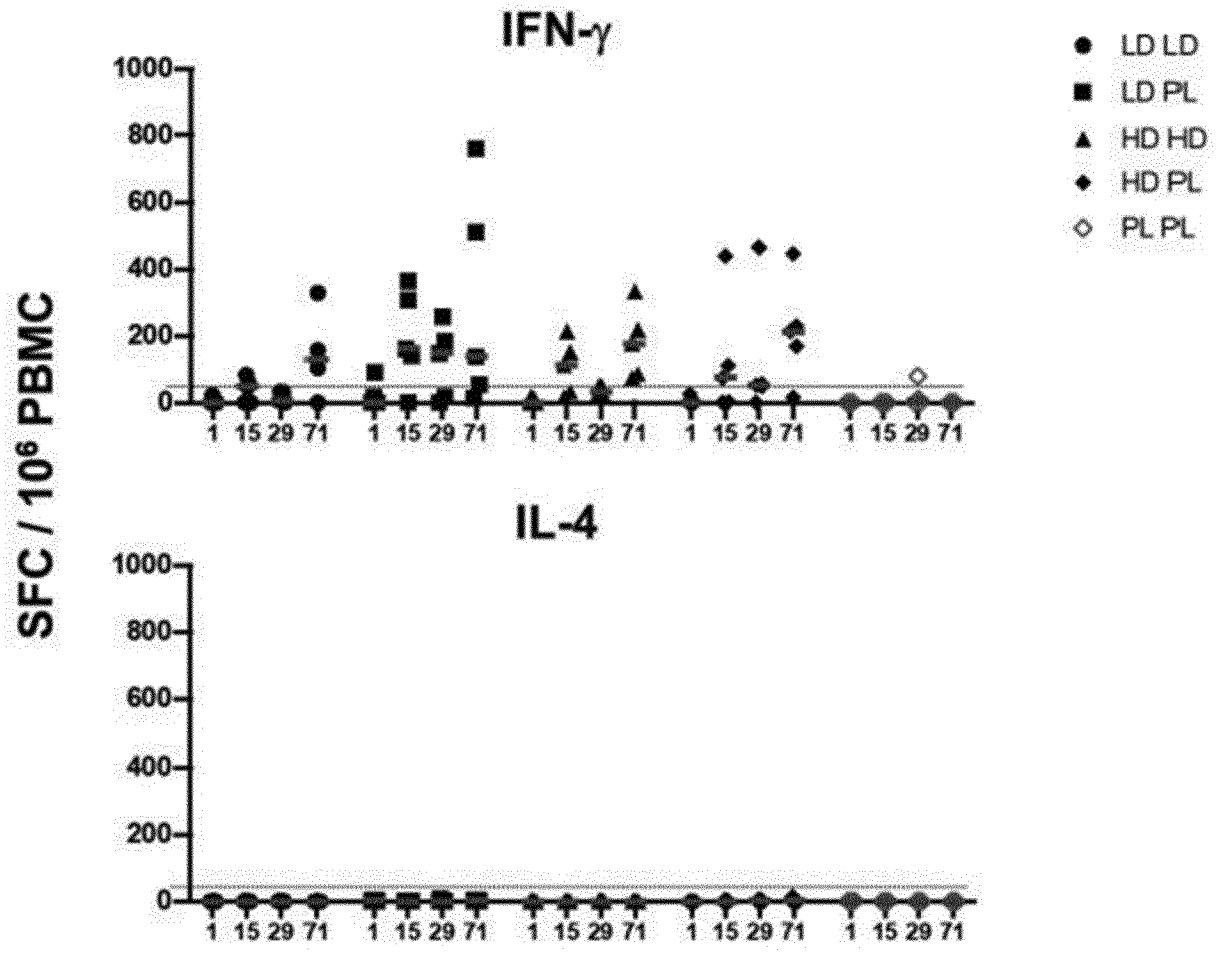
Фиг. 139A


CoV-229E
Относительные световые единицы
1000000
100000
10000
1000
100
1 15295771
1 15295771
1 15295771
1 15295771
1 15295771
День исследования
CoV-NL63
Относительные световые единицы
1000000
100000
10000
1000
100
1 15295771
1 15295771
1 15295771
1 15295771
1 15295771
День исследования

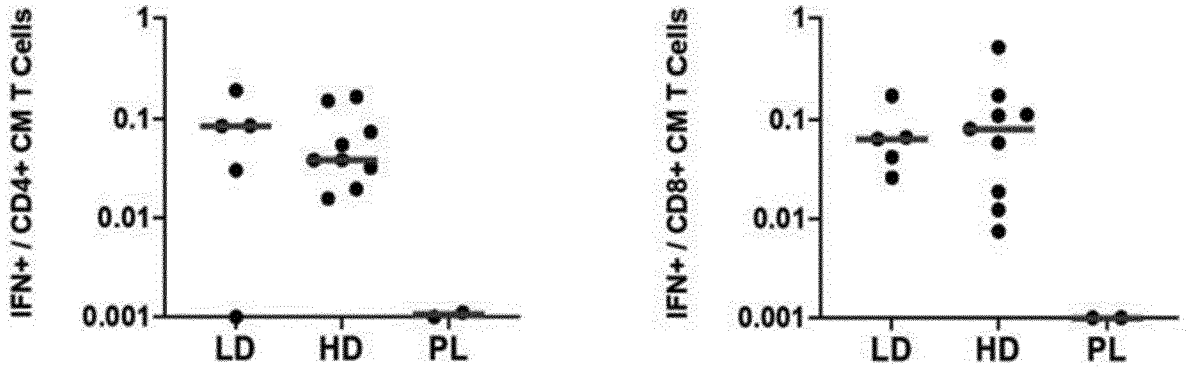
Фиг. 139B



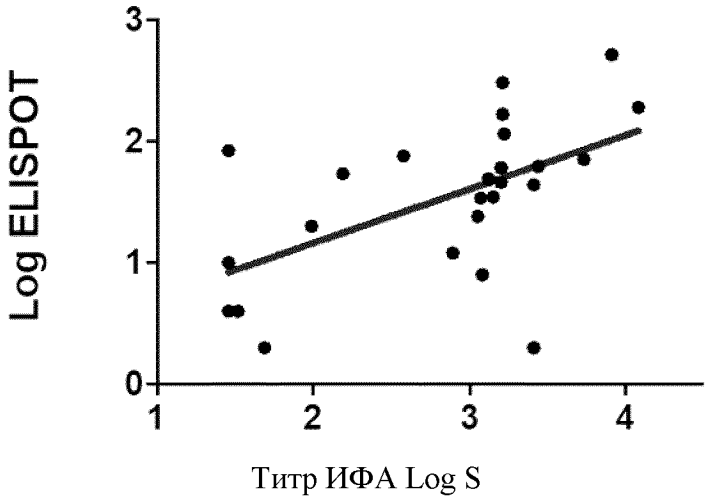
Фиг. 139B (продолжение)



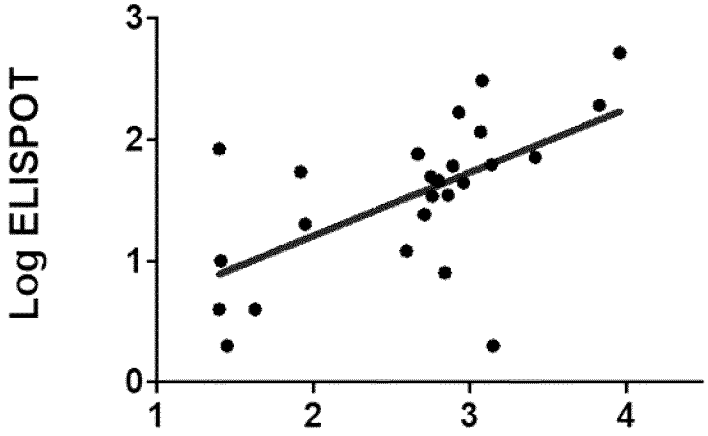
Фиг. 140A



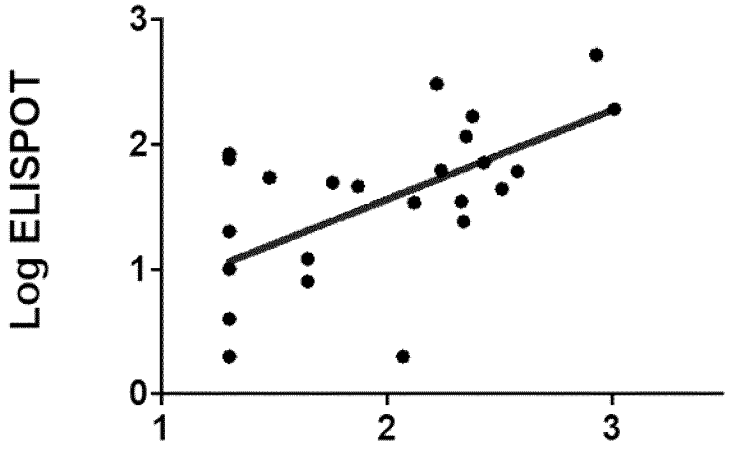
Фиг. 140B



Титр ИФА Log S



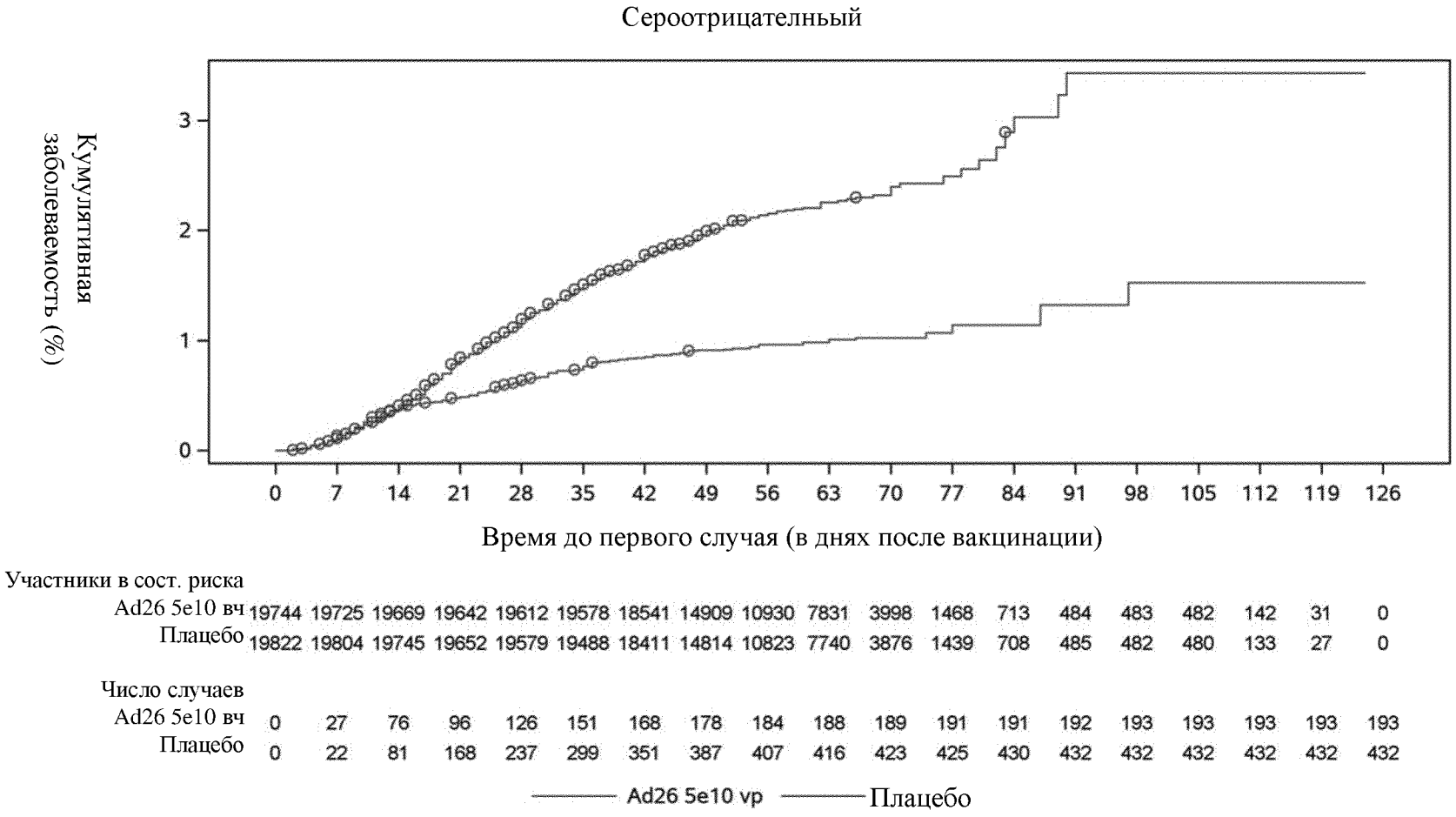
Титр ИФА Log RBD



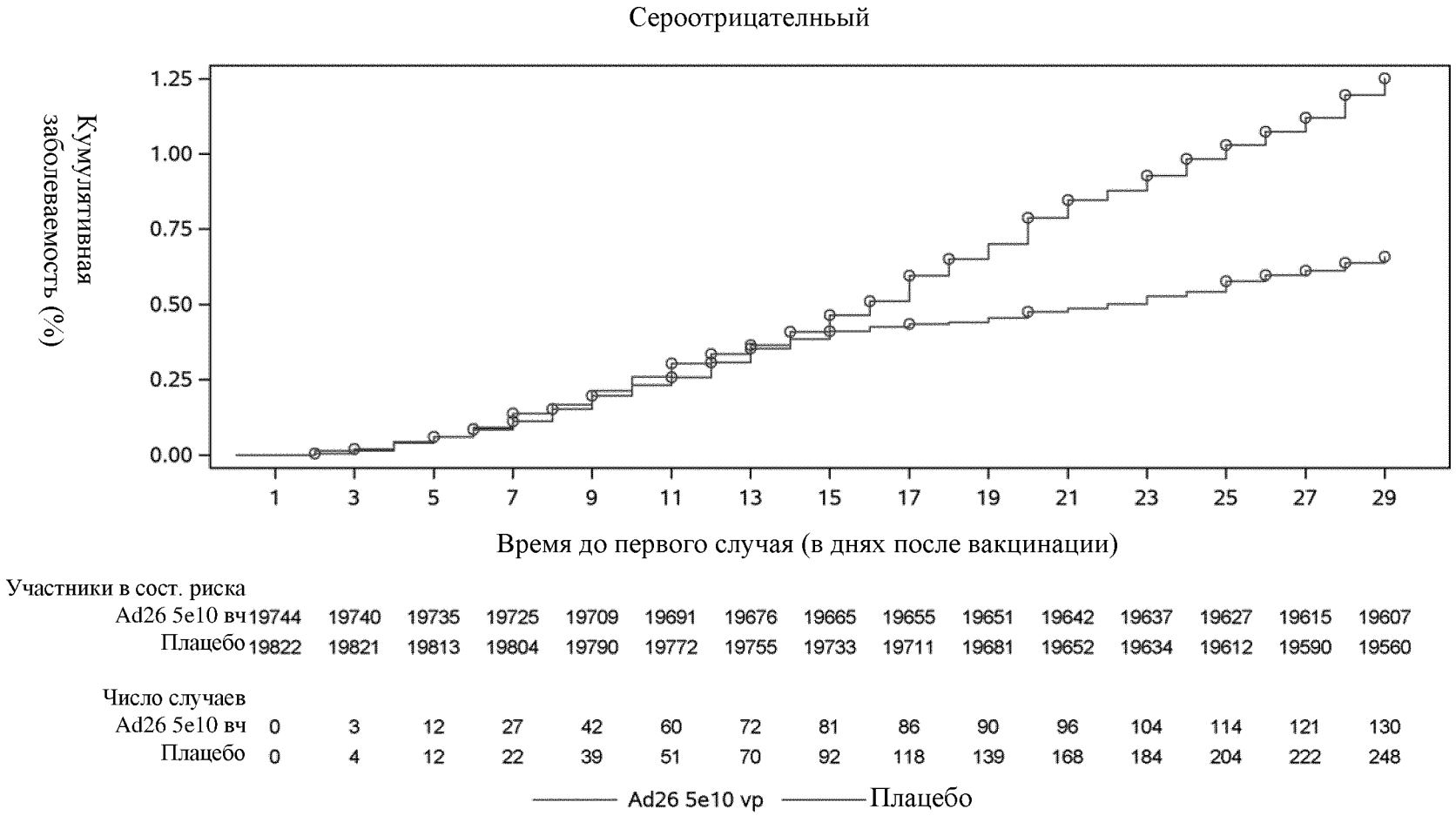
Титр Log NAb

Фиг. 141

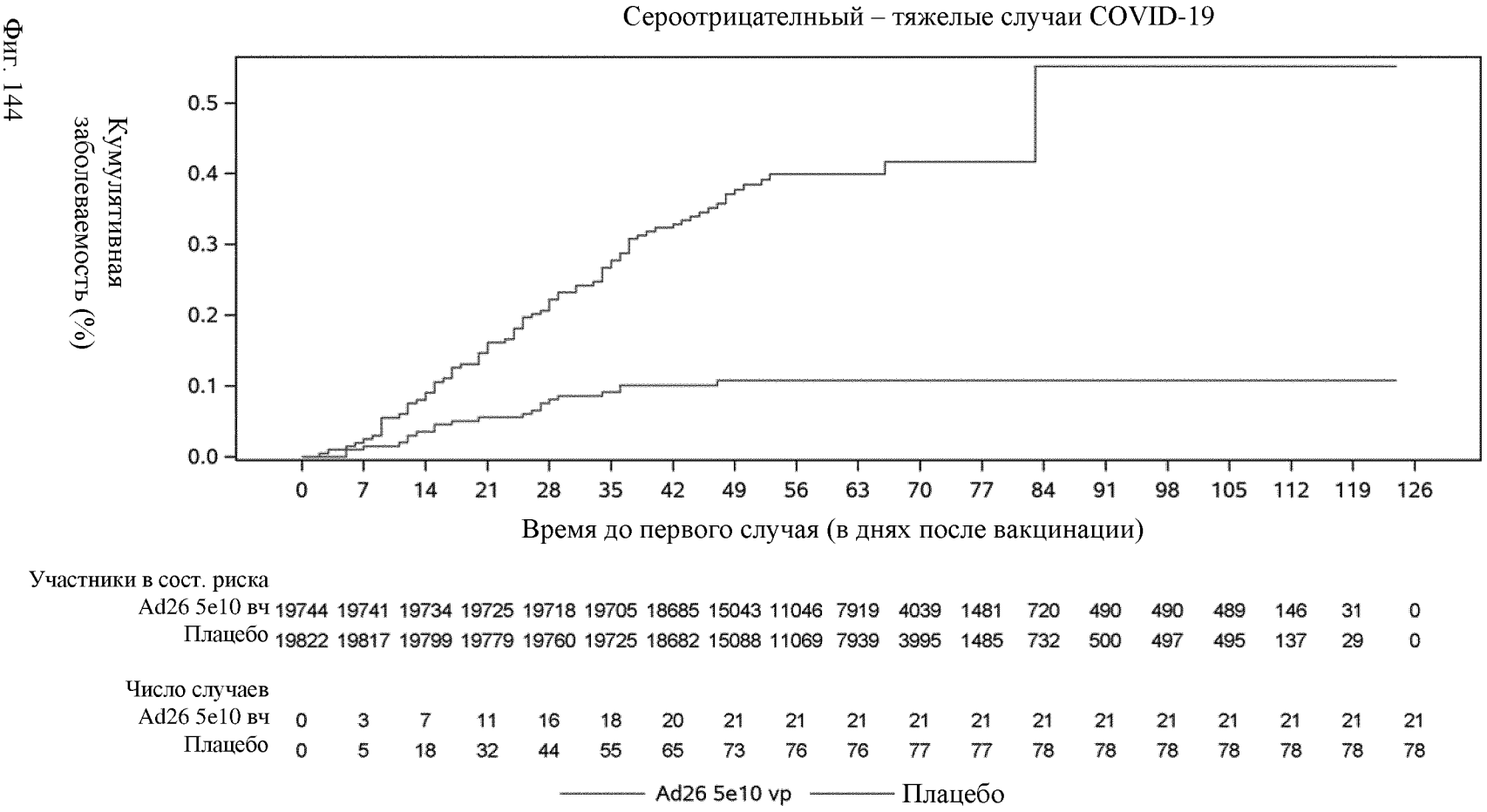
Фиг. 142

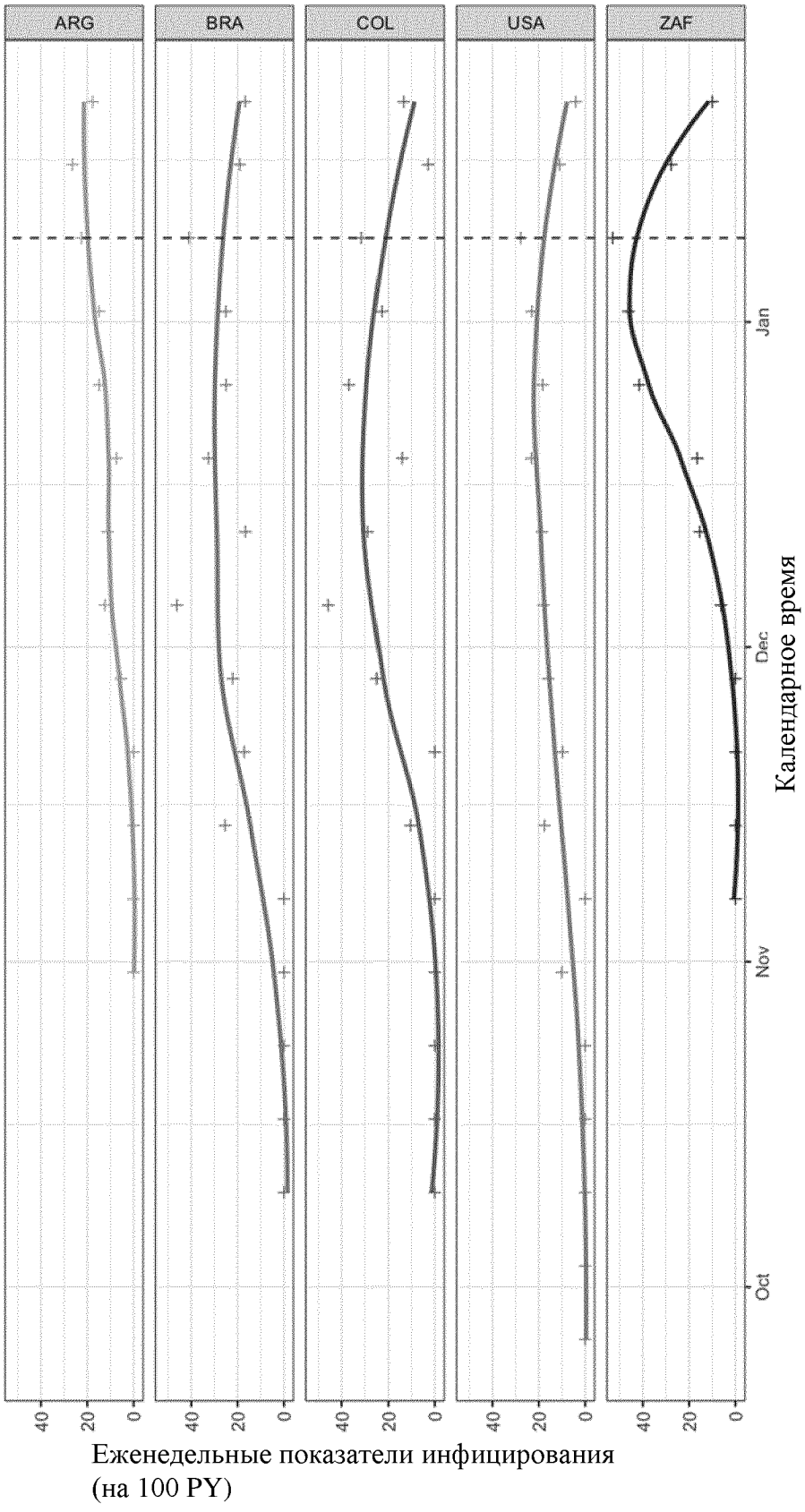

Сероотрицательный
Кумулятивная заболеваемость (%)
0
1
2
3
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112 119 126
Время до первого случая (в днях после вакцинации)
Участники в сост. риска
Ad26 5e10 вч 19744 19725 19669 19642 19612 19578 18541 14909 10930 7831 3998 1468 713 484 483 482 142 31 0
Плацебо 19822 19804 19745 19652 19579 19488 18411 14814 10823 7740 3876 1439 708 485 482 480 133 27 0
Число случаев
Ad26 5e10 вч 0 27 76 96 126 151 168 178 184 188 189 191 191 192 193 193 193 193 193
Плацебо 0 22 81 168 237 299 351 387 407 416 423 425 430 432 432 432 432 432 432
Ad26 5e10 vp
Плацебо

Фиг. 143


Сероотрицательный
Кумулятивная заболеваемость (%)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
Время до первого случая (в днях после вакцинации)
Участники в сост. риска
Ad26 5e10 вч 19744 19740 19735 19725 19709 19691 19676 19665 19655 19651 19642 19637 19627 19615 19607
Плацебо 19822 19821 19813 19804 19790 19772 19755 19733 19711 19681 19652 19634 19612 19590 19560
Число случаев
Ad26 5e10 вч 0 3 12 27 42 60 72 81 86 90 96 104 114 121 130
Плацебо 0 4 12 22 39 51 70 92 118 139 168 184 204 222 248
Ad26 5e10 vp
Плацебо

Фиг. 144


Сероотрицателнньый – тяжелые случаи COVID-19
Кумулятивная заболеваемость (%)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112 119 126
Время до первого случая (в днях после вакцинации)
Участники в сост. риска
Ad26 5e10 вч 19744 19741 19734 19725 19718 19705 18685 15043 11046 7919 4039 1481 720 490 490 489 146 31 0
Плацебо 19822 19817 19799 19779 19760 19725 18682 15088 11069 7939 3995 1485 732 500 497 495 137 29 0
Число случаев
Ad26 5e10 вч 0 3 7 11 16 18 20 21 21 21 21 21 21 21 21 21 21 21 21
Плацебо 0 5 18 32 44 55 65 73 76 76 77 77 78 78 78 78 78 78 78
Ad26 5e10 vp
Плацебо


Сила (интенсивность) инфицирования. Плацебо-уровень заболеваемости COVID-19 в различных странах.
Еженедельные показатели инфицирования (+) усредняли по времени
ARG
BRA
COL
USA
ZAF
0
20
40
Oct
Nov
Dec
Jan
Календарное время
Еженедельные показатели инфицирования
(на 100 PY)

Фиг. 145