(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292431 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.22

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. ***A61K 39/215*** (2006.01)
C07K 14/165 (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)

(54) ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОКСВИРУСА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-CoV-2

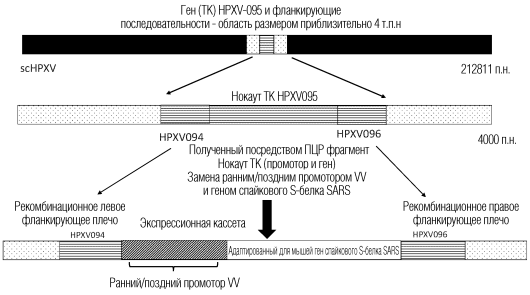
(31) **62/981,997; 63/114,514**
(32) **2020.02.26; 2020.11.16**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/020119**
(87) **WO 2021/174142 2021.09.02**

(71) Заявитель:
ТОНИКС ФАРМА ЛИМИТЕД (IE); ДЗЕ ГАВЕРНЭС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ АЛЬБЕРТА (CA)

(72) Изобретатель:
Ледерман Сет, Гебель Скотт Дж. (US), Эванс Дэвид, Нойс Райан (CA)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение в различных аспектах относится к рекомбинантному поксвирусу, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, способам получения таких вирусов и применению таких вирусов. Рекомбинантные поксвирусы хорошо подходят, в том числе, в качестве защитных вакцин против вируса SARS-CoV-2.



202292431 A1

202292431 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575359EA/026

ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОКСВИРУСА ПРОТИВ ВИРУСА SARS-CoV-2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки США №62/981997, поданной 26 февраля 2020 года, и временной заявки США № 63/114514, поданной 16 ноября 2020 года, содержание которых включено, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный, таким образом, в нее в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 25 февраля 2021 года, названа 104545-0047-WO1_SL.txt и имеет размер 766833 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] 31 декабря 2019 года Муниципальная комиссия здравоохранения г. Ухань сообщила о группе случаев атипичной пневмонии в г. Ухань, Китай. Первые пациенты начали испытывать симптомы заболевания в середине декабря 2019 года. Обнаружили, что клинические изоляты содержат новый коронавирус. На 28 января 2020 года было более 4500 лабораторно подтвержденных случаев с >100 известных летальных случаев. Новый коронавирус в настоящее время обозначают как SARS-CoV-2 или 2019-nCoV и относят к коронавирусу тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), хотя и с всего лишь приблизительно 80% сходством на уровне нуклеотидов Ralph et al. J Infect Dev Ctries. 2020 Jan 31;14(1):3-17.

[0004] Коронавирусы являются оболочечными одноцепочечными РНК-вирусами с положительно-полярным РНК-геномом длиной в диапазоне от 25,5 до ~32 т.п.н. Сферические вирусные частицы имеют диаметр в диапазоне 70-120 нм с четырьмя структурными белками.

[0005] Несмотря на то, что в настоящее время прикладывается множество усилий для создания способов получения вакцин и векторов для доставки SARS-CoV-2, все еще сохраняется потребность в создании дополнительных и улучшенных подходов против этого коронавируса.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Один из аспектов настоящего изобретения относится к рекомбинантному поксвирусу, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, способам получения таких вирусов и применению таких вирусов, например, в качестве иммуногенов, в иммуногенных составах против вируса SARS-CoV-2. Другой аспект настоящего изобретения относится к рекомбинантному синтетическому поксвирусу, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, способам получения таких вирусов и применению таких вирусов, например, в качестве

иммуногенов, в иммуногенных составах против вируса SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления синтетические поксвирусы собираются и реплицируются с химически синтезированной ДНК, являясь безопасными, воспроизводимыми и несодержащими загрязнений. Т.к. химический синтез генома не зависит от природной матрицы, возможно множество структурных и функциональных модификаций вирусного генома. Химический синтез генома особенно пригоден, если природная матрица недоступна для генетической репликации или модификации общепринятыми способами молекулярной биологии.

[0007] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к рекомбинантным поксвирусам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, где белок SARS-CoV-2 выбран из группы, состоящей из спайкового белка (S), мембранного белка (M) и нуклеокапсидного белка (N) или комбинаций двух или более указанных белков.

[0008] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим рекомбинантные поксвирусы по изобретению.

[0009] В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеткам, инфицированным рекомбинантными поксвирусами по изобретению.

[0010] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2, включающий инфицирование указанной клетки рекомбинантным поксвирусом по изобретению и селекцию инфицированной клетки, экспрессирующей указанный белок вируса SARS-CoV-2.

[0011] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, нуждающегося в этом или находящегося в группе риска, включающим введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по изобретению.

[0012] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения рекомбинантных поксвирусов по изобретению, включающим: (a) инфицирование клетки-хозяина поксвирусом; (b) трансфекцию инфицированной клетки со стадии (a) с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок вируса SARS-CoV-2, для получения рекомбинантного поксвируса; и (c) селекцию рекомбинантного поксвируса, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, после трансфекции локализуется в области поксвируса, не являющейся необходимой для репликации поксвируса.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0013] В иллюстративных целях настоящее изобретение показано на чертежах и в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено точными схемами и средствами, показанными на чертежах.

[0014] Фигура 1. Схема линейных дцДНК-геномов синтетического HPXV (регистрационный номер Genbank KY349117) и синтетического VACV (synVACV) (регистрационный номер Genbank MN974381). Локус гена тимидинкиназы (TK) указан оранжевым цветом. Локус гена TK в HPXV локализуется в положениях генома 92077-92610 с ID гена HPXV095 (SEQ ID NO: 1). Локус гена TK в VACV локализуется в положениях генома 83823-84344 с ID гена synVACV_105 (SEQ ID NO: 2).

[0015] Фигура 2. Схема локуса гена TK (HPXV095) HPXV размером приблизительно 4 т.п.н., локализованного между фланкирующими областями HPXV094 и HPXV096.

[0016] Фигура 3. Выравнивание последовательностей локуса гена TK синтетического HPXV и синтетического VACV ACAM2000, где показано, что сходство нуклеотидов составляет приблизительно 99%. На фигуре 3 ссылаются на SEQ ID NO: 34-36, соответственно, в порядке появления.

[0017] Фигура 4. Схема линейной дцДНК HPXV, где показано получение ПЦР-фрагмента, кодирующего экспрессирующую кассету SARS-CoV-2. Экспрессирующую кассету встраивают в локус гена TK генома HPXV, и она содержит ген спайкового S-белка SARS-CoV2, функционально связанный с ранним и поздним промотором вируса осповакцины, встроенными выше гена спайкового S-белка SARS-CoV-2.

[0018] Фигура 5. Схема спасаемых вирусов HPXV и VACV, ACAM 2000 и инсерции синтезированной экспрессирующей кассеты, кодирующей спайковый S-белок SARS-CoV-2, посредством рекомбинации с левым и правым рекомбинационными фланкирующими плечами.

[0019] Фигура 6. Схема способа получения рекомбинантного HPXV, включающего (1) инфицирование клеток BSC-40 HPXV, экспрессирующим кассету yfpgpt в локусе HPXV095; (2) трансфекцию инфицированных клеток с помощью синтезированной экспрессирующей кассеты через 24 часа после инфицирования; (3) сбор лизата клеток, высвобождение потомства вируса HPXV и рекомбинантного HPXV, экспрессирующего спайковый S-белок SARS-CoV-2 (rHPXV-SARS S), с повторными раундами циклов замораживания/размораживания через 48 часов после инфицирования/трансфекции и (4) селекцию клеток, содержащих rHPXV-SARS S.

[0020] фигура 7. Схема селекции и очистки рекомбинантного HPXV, содержащего S-белок SARS-CoV-2, включающая (1) предыдущие стадии инфицирования/трансфекции; (2) сбор и лизис клеток для высвобождения контрольного HPXV и потомства rHPXV-SARS S; (3) титрование на планшете вирусного потомства на клетках BSC-40; и (4) поиск нефлуоресцентных бляшек с помощью флуоресцентного микроскопа. Потомство вируса, в котором кассета yfpgpt заменена SARS-CoV-2 S, является нефлуоресцентным.

[0021] Фигура 8. Ранний, поздний и перекрывающийся ранний/поздний промоторы вируса осповакцины. Показаны кор, спейсер и инициатор (иниц.). На панели A показана нуклеотидная последовательность раннего промотора (SEQ ID NO: 3); специфические нуклеотиды, необходимые для оптимальной экспрессии, указаны с помощью кода из 4

оснований; некритические нуклеотиды указаны с помощью N; пурин должен присутствовать в инициаторной области. На панели B показана нуклеотидная последовательность позднего промотора (SEQ ID NO: 4); T-фрагмент и инициаторная последовательность TAAAT обеспечивают высокую экспрессию. На панели B показана нуклеотидная последовательность синтетического раннего/позднего промотора (SEQ ID NO: 5); элементы раннего и позднего промотора указаны выше и ниже последовательности, соответственно.

[0022] Фигура 9. Нуклеотидная последовательность вариантов перекрывающихся ранних/поздних промоторов вируса осповакцины, содержащих разные спейсеры в 3'-направлении от позднего промотора. На панели A показан 38-нуклеотидный спейсер (SEQ ID NO: 40; полноразмерная последовательность промотора и спейсера, приведенного в SEQ ID NO: 37); на панели B показан 99-нуклеотидный спейсер (SEQ ID NO: 41; полноразмерная последовательность промотора и спейсера, приведенного в SEQ ID NO: 38) на панели C показан 160-нуклеотидный спейсер (SEQ ID NO: 42; полноразмерная последовательность промотора и спейсера, приведенного в SEQ ID NO: 39).

[0023] Фигура 10. Схема способа получения рекомбинантного scHPXV или synVACV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую S-белок SARS-CoV-2, включающего (1) инфицирование клеток BSC-40 с помощью спасаемого вируса HPXV или VACV и (2) трансфекцию инфицированных клеток BSC-40 с помощью полученного посредством ПЦР фрагмента в локус гена TK, где полученный посредством ПЦР фрагмент содержит сконструированную экспрессирующую кассету гена S-белка SARS-CoV-2. Ген S-белка SARS-CoV-2 содержит одну или более модификаций (присутствует по меньшей мере Y459H). Получаемый модифицированный S-белок адаптируют для инфицирования мышей. Ранний сигнал терминации транскрипции вируса осповакцины ETTS (T_5NT (SEQ ID NO: 14)) также удален из гена S-белка SARS-CoV-2 посредством мутагенеза с внесением молчащих мутаций для получения полноразмерных транскриптов в раннюю фазу инфицирования.

[0024] Фигура 11. Вестерн-блоттинг экспрессии спайкового белка SARS-CoV-2 из клеток BSC-40, инфицированных с помощью клонов 1.1.1.1.1 или 2.1.1.1.1 synVACVΔA2K105$^{yfp\text{-}gpt}$ или synVACVΔA2K105$^{SARSCoV2\text{-}SPIKE\text{-}co::nm}$ (TNX-2200). Обозначение "имитация" соответствует группе отрицательного контроля без вируса. "Mr" представляет собой набор маркеров молекулярной массы в килодальтонах (кДа). Метками справа указаны различные белки: "S-мультимер": мультимер спайкового белка; "FL S-G": полноразмерный гликозилированный спайковый белок; "FL S": полноразмерный спайковый белок; "VACV I3": одноцепочечный ДНК-связывающий белок I3 (внутренний контроль); "SPIKE-co::nm": спайковый белок, подвергнутый оптимизации кодонов и не имеющий маркера, что свидетельствует о том, что экспрессия YFP-GPT отсутствует.

[0025] Фигура 12. Вестерн-блоттинг экспрессии спайкового белка из клеток BSC-40, инфицированных с помощью синтетического TNX-801, TNX-1800a-1 или TNX-1800b-2. Обозначение "имитация" соответствует группе отрицательного контроля без вируса.

"кДа" представляет собой килодальтоны (молекулярная масса). Метками справа указаны различные белки: "S-мультимер": мультимер спайкового белка; "FL S-G": полноразмерный гликозилированный спайковый белок; "FL S" полноразмерный спайковый белок; "VACV I3": одноцепочечный ДНК-связывающий белок I3 (внутренний контроль).

[0026] Фигура 13. Схема кожных реакций в день 7 ("физических реакций") у африканских зеленых мартышек (AGM), вакцинированных $2{,}9\times10^6$ БОЕ TNX-801. На панели A показана самка AGM (животное № 1F 16986); на панели B показана самка AGM (животное № 1F 16994); на панели C показан самец AGM (животное № 1M 16975); и на панели D показан самец AGM (животное № 1M 16977).

[0027] Фигура 14. Схема кожных реакций в день 7 ("физических реакций") у африканских зеленых мартышек (AGM), вакцинированных $1{,}06\times10^6$ БОЕ TNX-801. На панели A показана самка AGM (животное № 2F 16985); на панели B показана самка AGM (животное № 1F 16991); на панели C показан самец AGM (животное № 2M 16980); и на панели D показан самец AGM (животное № 1M 16983).

[0028] Фигура 15. Схема кожных реакций в день 7 ("физических реакций") у африканских зеленых мартышек (AGM), вакцинированных $2{,}9\times10^6$ БОЕ TNX-1800b-2. На панели A показана самка AGM (животное № 3F 16988); на панели B показана самка AGM (животное № 3F 16995); на панели C показан самец AGM (животное № 3M 16976); и на панели D показан самец AGM (животное № 3M 16982).

[0029] Фигура 16. Схема кожных реакций в день 7 ("физических реакций") у африканских зеленых мартышек (AGM), вакцинированных $1{,}06\times10^6$ БОЕ TNX-1800b-2. На панели A показана самка AGM (животное № 4F 16989); на панели B показана самка AGM (животное № 4F 16990); на панели C показан самец AGM (животное № 4M 16972); и на панели D показан самец AGM (животное № 4M 16973).

[0030] Фигура 17. Схема кожных реакций в день 7 ("физических реакций") у африканских зеленых мартышек (AGM), вакцинированных $0{,}6\times10^6$ БОЕ TNX-1800a-1. На панели A показана самка AGM (животное № 5F 16992); на панели B показана самка AGM (животное № 5F 16993); на панели C показан самец AGM (животное № 5M 16979); и на панели D показан самец AGM (животное № 5M 16981).

[0031] Фигура 18. Окрашенные планшеты, на которых показаны цитопатические эффекты в клетках BSC-40, HeLa и HEK 293 через 48 часов после инфицирования TNX-801, TNX-1800b-2, TNX-1200 или TNX-2200.

[0032] Фигуры 19A, 19B, 19C и 19D. Кривые роста вируса в клетках BSC-40, HeLa и HEK 293 с течением времени. На фигуре 19A показаны клетки, инфицированные TNX-1200; на фигуре 19B показаны клетки, инфицированные TNX-2200; на фигуре 19C показаны клетки, инфицированные TNX-801; и на фигуре 19D показаны клетки, инфицированные TNX-1800b-2.

[0033] Фигуры 20A и 20B. Кривые роста вируса в клетках BSC-40, инфицированных синтетическим вирусом оспы лошадей (HPXV), с течением времени. На

фигуре 20A показан титр вируса (БОЕ/мл), измеренный в клетках, инфицированных TNX-801, scHPXVΔ095$^{yfp\text{-}gpt}$, TNX-1800a-1, scHPXVΔ200$^{yfp\text{-}gpt}$ или TNX-1800b-2; на фигуре 20B показано кратное изменение относительно входного материала в инфицированных клетках.

[0034] Фигуры 21A и 21B. Кривые роста вируса в клетках BSC-40, инфицированных синтетическим вирусом осповакцины (VACV), с течением времени. На фигуре 21A показан титр вируса (БОЕ/мл), измеренный в клетках, инфицированных TNX-1200, TNX-2200 или synVACVΔA2K105$^{yfp\text{-}gpt}$; на фигуре 21B показано кратное изменение относительно входного материала в инфицированных клетках.

[0035] Фигура 22. Схема линейной дцДНК HPXV, где показано получение ПЦР-фрагмента, кодирующего экспрессирующую кассету SARS-CoV-2. Экспрессирующую кассету встраивают в локус гена TK генома HPXV, и она содержит ДНК, кодирующую спайковый S-белок SARS-CoV2, функционально связанную с ранним и поздним промотором вируса осповакцины, встроенным выше ДНК спайкового S-белка SARS-CoV-2. Экспрессирующая кассета дополнительно содержит левое фланкирующее плечо 1 т.п.н. HPXV (например, HPXV092, HPXV093 и HPXV094) и правое фланкирующее плечо 1 т.п.н. HPXV (например, HPXV096).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Общие способы

[0036] Если в настоящем описании не указано иное, научные и технические термины, используемые в настоящей заявке, должны обладать значением, общепринято понятным специалистам в этой области. Как правило, номенклатура, используемая в контексте способов фармакологии, культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, клеточной биологии и онкобиологии, нейробиологии, нейрохимии, вирусологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот, представленных в настоящем описании, хорошо известна и общеупотребительна в этой области. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, будет обладать приоритетом.

[0037] Если не указано иное, в практическом осуществлении настоящего изобретения используются обычные способы молекулярной биологии (включая рекомбинантные способы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии, вирусологии и иммунологии, известные специалистам в этой области. Такие способы полностью описаны в литературе, такой как Molecular Cloning: A Laboratory Manual, второе издание (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather и P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller и M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in

Molecular biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: Polymerase chain reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular biology, John Wiley & Sons, NY (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Coligan et al., Short Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY (2003); Short Protocols in Molecular biology (Wiley and Sons, 1999).

[0038] Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют по инструкциям производителя, как принято в этой области или как представлено в настоящем описании. Номенклатура, используемая в контексте лабораторного регламента и способов аналитической химии, биохимии, иммунологии, молекулярной биологии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, представленных в настоящем описании, хорошо известны и общеупотребительны в этой области. Для химического синтеза и химического анализа используют стандартные способы.

[0039] На всем протяжении настоящего описания и вариантов осуществления термин "содержат" или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

[0040] Термин "включающий" используют в значении "включающий в качестве неограничивающих примеров". Выражения "включающий" и "включающий в качестве неограничивающих примеров" используют взаимозаменяемо.

[0041] Любые примеры после термина "например" или "в качестве примера" не должны быть исчерпывающими или ограничивающими.

[0042] Если контекст не требует иного, термины в единственном числе должны включать множественное число, и термины во множественном числе должны включать единственное число.

[0043] Термины в единственном числе используют в настоящем описании для обозначения одного или более (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элемента. Ссылка на "приблизительное" значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты осуществления, направленные на это значение или параметр как таковой. Например, описание, относящееся к "приблизительно X", включает описание "X". Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

[0044] Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем раскрытия, являются приблизительными, числовые значения, приведенные в конкретных примерах, приведены настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по определению включает некоторые ошибки, обязательно являющиеся результатом стандартного отклонения при соответствующих тестовых измерениях. Кроме того, все диапазоны, представленные в настоящем описании, следует понимать как включающие любые и все поддиапазоны,

входящие в него. Например, указанный диапазон "от 1 до 10" следует рассматривать как включающий любые и все поддиапазоны между (и включая) минимальным значением 1 и максимальным значением 10; т.е. все поддиапазоны, начинающиеся с минимального значения 1 или более, например, от 1 до 6,1, и заканчивающиеся максимальным значением 10 или менее, например, от 5,5 до 10.

[0045] В настоящем описании представлены примеры способов и материалов, хотя в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения также можно использовать способы и материалы, схожие или эквивалентные представленным в настоящем описании. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Определения

Если не указано иное, следующие термины следует понимать как имеющие следующее значение:

[0046] Термины "химерный", или "сконструированный", или "модифицированный" (например, химерный поксвирус, сконструированный полипептид, модифицированный полипептид, сконструированная нуклеиновая кислота, модифицированная нуклеиновая кислота) или их грамматические варианты используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения ненативной последовательности, подвергнутой манипуляции таким образом, что она имеет одно или более изменений относительно нативной последовательности.

[0047] В рамках изобретения термин "ген, необходимый для репликации" или "область, необходимая для репликации" относится к генам или областям, обязательным для репликации организма, и, таким образом, их считают основой жизни. В контексте вируса ген или область считают необходимой (т.е. играющим роль в культуре клеток), если его делеция приводит к снижению титра вируса более чем 10-кратно на одностадийной или многостадийной кривой роста. Считают, что большинство необходимых генов кодируют белки, поддерживающие центральный метаболизм, реплицирующие ДНК, транслирующие гены в белки, поддерживающие базовую клеточную структуру и опосредующие процессы транспорта в клетку и из нее. Гены, участвующие в продукции вирионов, образование актинового хвоста и внеклеточном высвобождении вирионов, как правило, также считают необходимыми. Используют две основные стратегии идентификации необходимых генов на полногеномной основе: направленную делецию генов и случайный мутагенез с использованием транспозонов. В первом случае отдельные гены (или ORF) подвергают полной делеции из генома систематическим образом. При случайном мутагенезе транспозоны случайным образом встраиваются в как можно большее количество положений в геноме с целью инактивации целевых генов. Мутанты с инсерциями, все еще способные к выживанию или росту, имеют мутации не в необходимых генах (Zhang, R., 2009 и Gerdes, S., 2006).

[0048] В рамках изобретения термин "экспрессирующая кассета" или "транскрипционная единица" определяет область последовательности нуклеиновой

кислоты, содержащую один или более генов, подлежащих транскрипции. Нуклеотидные последовательности, кодирующие транскрибируемые гены, а также полинуклеотидные последовательности, содержащие регуляторные элементы, содержащиеся в экспрессирующей кассете, функционально связаны друг с другом. Гены транскрибируются с промотора, и транскрипция терминируется по меньшей мере одним сигналом полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более генов транскрибируется с одного промотора. В некоторых вариантах осуществления один или более генов транскрибируются с единственного промотора. В этом случае разные гены являются по меньшей мере транскрипционно связанными. С каждой транскрипционной единицы может транскрибироваться и экспрессироваться более одного белка или продукта (мультицистронная транскрипционная единица). Каждая транскрипционная единица будет содержать регуляторные элементы, необходимые для транскрипции и трансляции любых из выбранных последовательностей, содержащихся в единице. Каждая транскрипционная единица может содержать одинаковые или разные регуляторные элементы.

[0049] Термин "гомологичный" во всех своих грамматических формах и орфографических вариантах относится к взаимосвязи между двумя белками, обладающими "общим эволюционным происхождением", включая белки из суперсемейств в одном биологическом виде организмов, а также гомологичным белкам из разных биологических видов организмов. Такие белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) имеют гомологию последовательности, отраженную в сходстве их последовательностей в терминах процента идентичности или по наличию специфических остатков, или мотивов, и консервативных положений. Термин "гомологичный" также может относиться к нуклеиновой кислоте, являющейся нативной для вируса.

[0050] В разговорной речи и в настоящей заявке термин "гомологичный" при модифицировании с помощью наречия, такого как "высоко", может относиться к сходству последовательности и может относиться или не относиться к общему эволюционному происхождению.

[0051] Термин "гетерологичный" во всех своих грамматических формах и орфографических вариантах может относиться к нуклеиновой кислоте, ненативной для вируса. Что значит, что она получена из иного биологического вида или иного штамма, чем нуклеиновая кислота организма, в отношении которого нуклеиновая кислота описана как гетерологичная. В неограничивающем примере вирусный геном synVACV содержит гетерологичные концевые шпилечные петли. Эти гетерологичные концевые шпилечные петли можно получать из другого вида вируса или из другого штамма VACV.

[0052] В рамках изобретения термин "клетка-хозяин" включает отдельную клетку или культуру клеток, которая может являться или является реципиентом вируса по изобретению. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство может не являться обязательно полностью идентичным (по морфологии или по комплементу геномной ДНК) исходной родительской клетке в результате природной,

случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные и/или трансформированные in vivo с использованием поксвируса по изобретению.

[0053] Термин "иммунологически эффективное количество" относится к подлежащему введению количеству композиции по изобретению, содержащей по меньшей мере один антиген или его иммуногенную часть, способный вызывать иммунный ответ в клетке-хозяине или антитело-опосредованный иммунный ответ на композицию. Как представлено в настоящем описании, термин "иммунологически эффективное количество" рекомбинантного поксвируса относится к количеству поксвирусных частиц, необходимому для доставки белка вируса SARS-CoV-2 и вызыванию иммунного ответа против указанного белка вируса SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса по изобретению является количеством в диапазоне 10^2-10^9 БОЕ. В некоторых вариантах осуществления иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса по изобретению составляет приблизительно 10^3-10^5 БОЕ. В некоторых вариантах осуществления иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса по изобретению составляет приблизительно 10^5 БОЕ.

[0054] В рамках изобретения термины "функциональная связь" и "функционально связанный" или их варианты используют взаимозаменяемо со ссылкой на смежное положение дух или более компонентов (таких как элементы последовательности), в котором компоненты расположены таким образом, что оба компонента нормально функционируют и делают возможным то, что по меньшей мере один из компонентов может опосредовать функцию, воздействующую на по меньшей мере один из других компонентов. В качестве иллюстрации, нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, может быть функционально связана с промотором. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, может быть функционально связана в цис-положении с последовательностью нуклеиновой кислоты поксвирус-специфического промотора, но может не являться непосредственно смежной с ним. Например, можно располагать линкерную последовательность между обеими последовательностями.

[0055] В рамках изобретения фраза "множественность заражения" или "MOI" означает среднее количество вирусов на инфицированную клетку. MOI определяют, разделяя количество добавленного вируса (мл добавленного × бляшкообразующие единицы (БОЕ)) на количество добавленных клеток (мл добавленного×клетки/мл).

[0056] Термины "пациент" или "индивидуум" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения человека или не являющегося человеком животного. Эти термины включают млекопитающих, таких как люди, приматы, сельскохозяйственные животные (включая крупный рогатый скот, свиней, верблюдов и т.д.), животных-компаньонов (например, собак, кошек и т.д.) и грызунов (например, мышей и крыс).

[0057] Как известно в этой области, термины "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", взаимозаменяемо используемые в настоящем описании, означают цепи нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут являться дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями, и/или их аналогами, или любым субстратом, который можно встраивать в цепь с помощью ДНК- или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. При наличии, модификацию структуры нуклеотида можно осуществлять до или после сборки цепи. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, например, посредством конъюгации с компонентом-меткой. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замену одного или более природных нуклеотидов аналогом; межнуклеотидные модификации такие как, например, использование незаряженных связей (например, метилфосфонатов, фосфотриэфиров, фосфоамидатов, карбаматов и т.д.) и заряженных связей (например, фосфотиоатов, фосфодитиоатов и т.д.); модификации, содержащие боковые вещества, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.); использование интеркаляторов (например, акридина, псоралена и т.д.); модификации, содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.д.); модификации, содержащие алкиляторы; модификации с использованием модифицированных связей (например, альфа-аномерных нуклеиновых кислот и т.д.); а также немодифицированные формы полинуклеотидов. Кроме того, любые из гидроксильных групп, как правило, присутствующих в сахарах, можно заменять, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищенными стандартными защитными группами, или активированными для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или которые можно конъюгировать с твердыми подложками. 5'- и 3'-концевой ОН может быть фосфорилирован или замещен аминами или органическими кэпирующими группами из от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также можно дериватизировать в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы рибозных или дезоксирибозных сахаров, как правило, известных в этой области, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги сахаров, альфа- или бета-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и абазические аналоги нуклеозидов, такие как метилрибозид. Одну или более фосфодиэфирных связей можно заменять альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, в качестве неограничивающих примеров, варианты осуществления, где фосфат заменяют P(O)S ("тиоатом"), P(S)S ("дитиоатом"), (O)NR_2 ("амидатом"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH_2 ("формацеталем"), где каждый R или R' независимо представляет собой H

или замещенный или незамещенный алкил (1-20 атомов С) необязательно, содержащий простой эфир и (-О-)-связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не требуется того, чтобы все связи в полинуклеотиде являлись идентичными. Предшествующее описание относится ко всем полинуклеотидам, упомянутым в настоящем описании, включая РНК и ДНК.

[0058] Термины "полипептид", "олигопептид", "пептид" и "белок" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения цепей аминокислот любой длины. Цепь может являться линейной или разветвленной, она может содержать модифицированные аминокислоты и/или может прерываться не-аминокислотами. Термины также включают аминокислотную цепь, модифицированную от природы или в результате вмешательства; например, образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с компонентом-меткой. В определения также входят, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислот (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в этой области. Следует понимать, что полипептиды могут встречаться в виде отдельных цепей или связанных цепей.

[0059] "Процент (%) идентичности последовательности" или "последовательность, на % идентичная" в отношении референсной полипептидной (или нуклеотидной) последовательности определяют как процент аминокислотных остатков (или нуклеиновых кислот) в последовательности-кандидате, являющихся идентичными аминокислотным остаткам (или нуклеиновым кислотам) в референсной полипептидной (нуклеотидной) последовательности после выравнивания последовательностей и встраивания пропусков, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивания в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно достигать различными способами, известными специалистам в этой области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в этой области могут определять подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любой алгоритм, необходимый для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0060] Как описано в других местах в настоящем описании, некоторые положения вирусного генома можно изменять. В рамках изобретения термин "положение" означает локацию в последовательности генома. Соответствующие положения, как правило, определяют посредством выравнивания с другими родительскими последовательностями.

[0061] В рамках изобретения термин "очищать" и его грамматические варианты относятся к удалению, полному или частичному, по меньшей мере одной примеси из смеси, содержащей полипептид и одну или более примесей, которое, таким образом,

улучшает уровень чистоты полипептида в композиции (т.е. посредством снижения количества (м.д.) примесей в композиции). В рамках изобретения термин "очищенный" в контексте вирусов относится к вирусу, по существу несодержащему клеточный материал и среды для культивирования из клеточного или тканевого источника, из которого вирус получают. Выражение "по существу не содержит клеточный материал" включает препараты вируса, в которых вирус отделяют от клеточных компонентов клеток, из которых его выделяют или рекомбинантно продуцируют. Таким образом, вирус, по существу несодержащий клеточный материал, включает препараты белка, имеющие менее приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (в пересчете на сухое вещество) клеточного белка (также обозначаемого в настоящем описании как "загрязняющий белок"). Вирус также может по существу не содержать среду для культивирования, т.е. среда для культивирования представляет менее приблизительно 20%, 10% или 5% объема препарата вируса. Вирус можно "очищать" общепринятыми способами, известными специалисту в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, хроматографию и центрифугирование.

[0062] В рамках изобретения термин "рекомбинантный поксвирус" относится к поксвирусу, содержащему экзогенную или гетерологичную последовательность в своем геноме, полученную посредством искусственной манипуляции с вирусным геномом, т.е. получение посредством технологии рекомбинантных ДНК. Рекомбинантный поксвирус содержит экзогенную полинуклеотидную последовательность, кодирующую интересующий полипептид. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2.

[0063] В рамках изобретения термин "спасаемый поксвирус", или "спасаемый вирус", или "система спасения" относится к вирусу или системе, основанной на том, что вирус-помощник предоставляет аппарат, необходимый для продуцирования рекомбинантных вирусов, посредством сборки фрагментированного генома и, в то же время, интеграции целевого гена или экспрессирующей кассеты. Rice et al. Viruses. 2011 Mar; 3(3): 217-232.

[0064] В рамках изобретения термин "остаток" в контексте полипептида относится к аминокислотной единице в линейной полипептидной цепи. Он представляет собой то, что остается от каждой аминокислоты, т.е. -NH-CHR-C-, после удаления воды при образовании полипептида из α-аминокислот, т.е. NH_2-CHR-COOH.

[0065] Термин "сходство последовательности" во всех своих грамматических формах относится к степени идентичности или соответствия между последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями, которые могут иметь или иметь общее эволюционное происхождение.

[0066] В рамках изобретения термин "синтетический вирус" относится к вирусу, исходно полученному из синтетической ДНК (например, химически синтезированной ДНК, ПЦР-амплифицированной ДНК, сконструированной ДНК, полинуклеотидов,

содержащих аналоги нуклеозидов и т.д. или их комбинаций), и включает его потомство, и потомство может не являться полностью идентичным (по морфологии или по комплементу геномной ДНК) исходному родительскому синтетическому вирусу в результате природной, случайной или преднамеренной мутации. В некоторых вариантах осуществления синтетический вирус относится к вирусу, где по существу весь вирусный геном исходно получают из синтетической ДНК (например, химически синтезированной ДНК, ПЦР-амплифицированной ДНК, сконструированной ДНК, полинуклеотидов, содержащих аналоги нуклеозидов и т.д. или их комбинаций). В предпочтительном варианте осуществления синтетический вирус получают из химически синтезированной ДНК.

[0067] В рамках изобретения термин "по существу чистый" относится к материалу, являющемуся по меньшей мере на 50% чистым (т.е. несодержащему загрязнений), более предпочтительно - по меньшей мере на 90% чистым, более предпочтительно - по меньшей мере на 95% чистым, еще более предпочтительно - по меньшей мере на 98% чистым, и наиболее предпочтительно - по меньшей мере 99% чистым.

[0068] В рамках изобретения термин "вакцина" относится к композиции, содержащей по меньшей мере один иммунологически активный компонент, индуцирующий иммунный ответ у животного, и, возможно, но не обязательно, один или более дополнительных компонентов, повышающих иммунологическую активность активного компонента. Вакцина может дополнительно содержать дополнительные компоненты, типичные для фармацевтических композиций. Иммунологически активный компонент вакцины может содержать полные вирусные частицы в их исходной форме или в виде аттенуированных частиц (модифицированная живая вакцина) или частиц, инактивированных подходящими способами (убитая или инактивированная вакцина). В других вариантах осуществления иммунологически активный компонент вакцины может содержать подходящие элементы организмов (субъединичные вакцины), лучшим образом стимулирующие иммунную систему. Иммунологически активный компонент может являться белком вирусной оболочки. Иммунологически активный компонент может являться белком, образующим часть нуклеокапсида. В некоторых вариантах осуществления иммунологически активный компонент вакцины против SARS-CoV-2 является белком оболочки. Неограничивающими примерами таких белков являются спайковый белок (S), мембранный белок (M) и белок гемагглютинин-эстераза (HE). В некоторых вариантах осуществления иммунологически активный компонент вакцины против SARS-CoV-2 является нуклеокапсидным белком (N).

[0069] В рамках изобретения термин "вирусный вектор" означает генетически модифицированный вирус, подвергнутый манипуляции способом рекомбинантной ДНК таким образом, что его проникновение в клетку-хозяина может приводить к специфической биологической активности, например, экспрессии чужеродного целевого гена, переносимого вектором. Вирусный вектор может являться или не являться репликационно-компетентным в целевой клетке, ткани или организме. Вирусный вектор

может включать последовательности из генома из любого известного организма. Последовательности можно встраивать в их нативной форме или можно модифицировать любым образом для достижения желаемой активности. Например, последовательности могут содержать инсерции, делеции или замены. Вирусный вектор также может включать участок инсерции для экзогенной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является поксвирусом. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является вектором вируса оспы лошадей. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является синтетическим вектор вируса оспы лошадей.

[0070] В рамках изобретения термины "вирус дикого типа", "геном дикого типа", "белок дикого типа" или "нуклеиновая кислота дикого типа" относятся к последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот, встречающейся в природе в некоторой популяции (например, конкретного вида вируса и т.д.).

[0071] Каждый вариант осуществления, представленный в настоящем описании, можно использовать в отдельности или в комбинации с любым другим вариантом осуществления, представленным в настоящем описании.

Обзор

[0072] Поксвирусы являются крупными (~200 т.п.н.) ДНК-вирусами, реплицирующимися в цитоплазме инфицированных клеток. Род Orthopoxvirus (OPV) включает ряд поксвирусов, значительно варьирующихся по своей способности инфицировать разных хозяев. Вирус осповакцины (VACV), например, может инфицировать широкую группу хозяев, в то время как вирус натуральной оспы (VARV), возбудитель натуральной оспы, инфицирует только людей. Признаком, общим для многих, если не всех, поксвирусов является их способность негенетически "реактивироваться" в носителе. Термин "негенетическая реактивация" относится к процессу, при котором клетки, инфицированные одним поксвирусом, могут способствовать восстановлению второго "мертвого" вируса (например, термически инактивированного вируса), который был бы неконтагиозным сам по себе.

[0073] Очищенная ДНК поксвируса не является контагиозной, т.к. для жизненного цикла вируса необходима транскрипция ранних генов с помощью кодируемых вирусом РНК-полимераз, упакованных в вирионы. Однако, этот недостаток можно преодолеть, если ДНК вируса трансфицируют в клетки до или после инфицирования поксвирусом-помощником, обеспечивая факторы, необходимые для транскрипции, репликации и упаковки трансфицированного генома в транс-положении (Sam CK, Dumbell KR. Expression of poxvirus DNA in coinfected cells and marker rescue of thermosensitive mutants by subgenomic fragments of DNA. Ann Virol (Inst Past). 1981;132:135-50). Хотя это приводит к смешанному вирусному потомству, желаемый вирус можно получать, осуществляя реакцию реактивации в линии клеток, поддерживающей размножение обоих вирусов, а затем устраняя вирус-помощник, высевая смесь вирусов на клетки, неподдерживающие рост вируса-помощника (Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. Construction of chimeric

vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992; 89(21):9977-81).

Получение поксвирусов

[0074] В настоящем изобретении можно использовать любые из синтетических поксвирусов, описанных в патентной заявке США № 2018/0251736 и в WO 2019/213452, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

[0075] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к рекомбинантным поксвирусам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, где белок SARS-CoV-2 выбран из группы, состоящей из спайкового белка (S), мембранного белка (M) и нуклеокапсидного белка (N) или комбинаций двух или более указанных белков.

[0076] В некоторых вариантах осуществления поксвирус принадлежит к подсемейству Chordopoxvirinae. В некоторых вариантах осуществления поксвирус принадлежит к роду подсемейства Chordopoxvirinae, выбранного из Avipoxvirus, Capripoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylipoxvirus, Leporipoxvirus, Molluscipoxvirus, *Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus или Yatapoxvirus.* В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус представляет собой Orthopoxvirus. В некоторых вариантах осуществления Orthopoxvirus выбран из группы, состоящей из вируса оспы верблюдов (CMLV), вируса коровьей оспы (CPXV), вируса эктромелии (ECTV, "возбудителя оспы мышей"), вируса оспы лошадей (HPXV), вируса оспы обезьян (MPXV), вируса оспы кроликов (RPXV), вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин Гишу, вируса осповакцины (VACV), вируса натуральной оспы (VARV) и вируса оспы полевок (VPV). В некоторых вариантах осуществления поксвирус представляет собой Parapoxvirus. В некоторых вариантах осуществления Parapoxvirus выбран из вируса пустулезного дерматита овец и коз (ORFV), вируса псевдооспы коров (PCPV), вируса папулезного стоматита коров (BPSV), парапоксвируса белок (SPPV), парапоксвируса красного оленя, вируса контагиозной эктимы верблюдов, вирус контагиозной эктимы овец и коз, парапоксвируса северного оленя или вируса оспы тюленей. В некоторых вариантах осуществления поксвирус представляет собой Molluscipoxvirus. В некоторых вариантах осуществления Molluscipoxvirus является вирусом контагиозного моллюска (MCV). В некоторых вариантах осуществления поксвирус представляет собой Yatapoxvirus. В некоторых вариантах осуществления Yatapoxvirus выбран из вируса танапокс или вируса опухоли обезьян Яба (YMTV). В некоторых вариантах осуществления поксвирус представляет собой Capripoxvirus. В некоторых вариантах осуществления Capripoxvirus выбран из вируса оспы овец, вируса оспы коз или вируса нодулярного дерматита. В некоторых вариантах осуществления the поксвирус представляет собой Suipoxvirus. В некоторых вариантах осуществления Suipoxvirus является вирусом оспы свиней. В некоторых вариантах осуществления поксвирус представляет собой Leporipoxvirus. В некоторых вариантах осуществления Leporipoxvirus выбран из вируса миксомы, вируса

фибромы Шоупа (SFV), вируса фибромы белок или вируса фибромы зайцев. В некоторых вариантах осуществления поксвирус представляет собой HPXV. В некоторых вариантах осуществления вирус оспы лошадей представляет собой штамм MNR-76. В других вариантах осуществления поксвирус представляет собой VACV. В некоторых вариантах осуществления VACV выбран из группы штаммов, состоящей из: Western Reserve, Western Reserve клона 3, Tian Tian, Tian Tian клона TP5, Tian Tian клона TP3, NYCBH, NYCBH клона Acambis 2000, Wyeth, Copenhagen, Lister, Lister 107, Lister-LO, Lister GL-ONC1, Lister GL-ONC2, Lister GL-ONC3, Lister GL-ONC4, Lister CTC1, Lister IMG2 (Turbo FP635), IHD-W, LC16m18, Lederle, Tashkent клона TKT3, Tashkent клона TKT4, USSR, Evans, Praha, L-IVP, V-VET1 или LIVP 6.1.1, Ikeda, EM-63, Malbran, Duke, 3737, CV-1, Connaught Laboratories, Serro 2, CM-01, NYCBH Dryvax клона DPP13, NYCBH Dryvax клона DPP15, NYCBH Dryvax клона DPP20, NYCBH Dryvax клона DPP17, NYCBH Dryvax клона DPP21, VACV-IOC, хориоаллантоисного вируса осповакцины Анкара (CVA), модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и MVA-BN. Непрерывно открывают все новые и новые поксвирусы (например, ортопоксвирусы). Следует понимать, что поксвирус по изобретению может быть основан на таком недавно открытом поксвирусе.

[0077] Химический синтез вирусного генома дает возможность встраивать большое количество полезных модификаций в полученный геном или конкретные его части. Модификации могут улучшать простоту клонирования для получения вируса, обеспечивать участки для встраивания рекомбинантных продуктов генов, улучшать простоту идентификации реактивированных вирусных клонов и/или придавать множество других полезных признаков (например, встраивание желаемого антигена, получение онколитического вируса и т.д.). В некоторых вариантах осуществления модификации могут включать аттенуацию или делецию одного или более факторов вирулентности. В некоторых вариантах осуществления модификации могут включать добавление или инсерцию одного или более генов регуляции вирулентности или кодирующих гены регуляторных факторов.

[0078] Как правило, концевые шпильки поксвирусов трудно клонировать и секвенировать. В результате, некоторые из опубликованных последовательностей геномов (например, VACV, ACAM 2000 и HPXV MNR-76) являются неполными. Аналогично, опубликованная последовательность генома HPXV является неполной, вероятно, в ней отсутствуют ~60 п.н. с концов. В примере варианта осуществления фрагменты оцДНК размером 129 нуклеотидов химически синтезировали с использованием опубликованной последовательности концевых шпилек VACV в качестве гида и лигировали на фрагменты дцДНК, содержащие левый и правый концы генома HPXV. В некоторых вариантах осуществления концевые шпильки поксвируса по изобретению получают из VACV. В некоторых вариантах осуществления концевые шпильки получают из CMLV, CPXV, ECTV, HPXV, MPXV, RPXV, вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин

Гишу или VPV. В некоторых вариантах осуществления концевые шпильки основаны на концевых шпильках любого поксвируса, геном которого полностью секвенирован, или природный изолят которого доступен для секвенирования генома. В некоторых вариантах осуществления поксвирусы являются синтетическими версиями HPXV, содержащими концевые шпильки VACV (регистрационный номер Genbank KY349117; см. патентную заявку США № 2018/0251736, включенную в настоящее описание в качестве ссылки).

[0079] В некоторых вариантах осуществления модификации, встраиваемые в геном поксвируса, могут включать делецию одного или более участков рестрикции. В некоторых вариантах осуществления модификации могут включать встраивание одного или более участков рестрикции. В некоторых вариантах осуществления участки рестрикции, подлежащие делеции из генома или добавляемые в геном, могут быть выбраны из одного или более из участков рестрикции, таких как, в качестве неограничивающих примеров, AanI, AarI, AasI, AatI, AatII, AbaSI, AbsI, Acc65I, AccI, AccII, AccIII, AciI, AclI, AcuI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, ApoI, AscI, AseI, AsiSI, AvaI, AvaII, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BclI, BcoDI, BfaI, BfuAI, BfuCI, BglI, BglII, BlpI, BmgBI, BmrI, BmtI, BpmI, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, BsaI, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, *Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFαI, BsrGI, BsrI,* BssHII, *BssSαI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsαI, BtsCI, BtsIMutI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAII, CviKI*-1, CviQI, DdeI, DpnI, DpnII, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, EciI, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, FatI, FauI, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, HgaI, HhaI, HincII, HindIII, HinfI, HinP1I, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyAV, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, I-CeuI, I-SceI, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MboII, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, MmeI, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, MspI, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, NruI, NsiI, NspI, PacI, PaeR7I, PciI, PflFI, PflMI, PleI, PluTI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PsiI, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfcI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, *SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SrfI, SspI, StuI, StyD4I, StyI, SwaI, TaqαI, TfiI, TseI, Tsp45I, TspMI,* TspRI, Tth111*I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI или ZraI*. Следует понимать, что любые желаемые участки рестрикции или комбинацию участков рестрикции можно встраивать в геном или подвергать мутагенезу и/или удалять из генома. В некоторых вариантах осуществления один или более участков AarI подвергают делеции из вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления один или более участков BsaI подвергают делеции из вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления один или более участков рестрикции полностью устраняют из генома (например, можно устранять все участки AarI в вирусном геноме). В некоторых вариантах осуществления один или более участков рестрикции AvaI встраивают в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления один или более участков StuI встраивают в вирусный геном. В некоторых вариантах

осуществления одна или более модификаций могут включать встраивание рекомбинирующих мишеней, включая, в качестве неограничивающих примеров, участки loxP или FRT.

[0080] В некоторых вариантах осуществления модификации поксвируса могут включать встраивание флуоресцентных маркеров, таких как, в качестве неограничивающих примеров, зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный GFP, желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (BFP), красный флуоресцентный белок (RFP) или его варианты и т.д.; селективных маркеров, таких как, в качестве неограничивающих примеров, маркеры резистентности к лекарственным средствам (например, ген ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы E. coli (gpt), ген пуромицинацетилтрансферазы Streptomyces alboniger (pac), ген неомицинфосфотрансферазы I (nptI), ген неомицинфосфотрансферазы II (nptII), ген гигромицинфосфотрансферазы (hpt), ген sh ble и т.д.; белковые или пептидные метки, такие как, в качестве неограничивающих примеров, MBP (мальтоза-связывающий белок), CBD (целлюлоза-связывающий домен), GST (глутатион-S-трансфераза), поли(His), FLAG, V5, c-Myc, HA (гемагглютинин), NE-метка, CAT (хлорамфеникол-ацетилтрансфераза), DHFR (дигидрофолатредуктаза), HSV (вирус простого герпеса), VSV-G (гликопротеин вируса везикулярного стоматита), люцифераза, протеин A, протеин G, стрептавидин, T7, тиоредоксин, метки двугибридной дрожжевой системы, такие как B42, GAL4, LexA, или VP16; метки локализации, такие как NLS-метка, SNAP-метка, Myr-метка и т.д. Следует понимать, что можно использовать другие селективные маркеры и/или метки, известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления модификации включают один или более селективных маркеров для облегчения селекции реактивированных клонов (например, флуоресцентный маркер, такой как YFP, селективный маркер лекарственного средства, такой как gpt, и т.д.) для облегчения селекции реактивированных вирусных клонов. В некоторых вариантах осуществления один или более селективных маркеров подвергают делеции из реактивированных клонов после стадии селекции.

[0081] В некоторых вариантах осуществления поксвирусы представляют собой синтетические вирусы оспы лошадей (scHPXV). В некоторых вариантах осуществления синтетические вирусы оспы лошадей получают посредством рекомбинации перекрывающихся фрагментов ДНК вирусного генома и осуществляют реактивацию функционального поксвируса в клетках, ранее инфицированных вирусом-помощником. В кратком изложении, перекрывающиеся фрагменты ДНК, охватывающие весь или по существу весь вирусный геном вируса оспы лошадей, химически синтезируют и трансфицируют в инфицированные вирусом-помощником клетки. Трансфицированные клетки культивируют для получения смешанного вирусного потомства, содержащего вирус-помощник и реактивированный вирус оспы лошадей. Затем смешанное вирусное потомство высевают на клетки-хозяева, неподдерживающие рост вируса-помощника, но позволяющие синтетическому поксвирусу расти, для элиминации вируса-помощника и выделения синтетических поксвирусов.

[0082] В некоторых вариантах осуществления по существу весь синтетический поксвирусный геном получают из химически синтезированной ДНК. В некоторых вариантах осуществления приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99%, более 99% или 100% синтетического поксвирусного генома получают из химически синтезированной ДНК. В некоторых вариантах осуществления поксвирусный геном получают из комбинации химически синтезированной ДНК и природной ДНК.

[0083] Количество перекрывающихся фрагментов ДНК, используемых для получения синтетического поксвируса, будет зависеть от размера поксвирусного генома. Практические соображения, такие как снижение эффективности рекомбинации с повышением количества фрагментов с одной стороны и трудности при синтезе очень крупных фрагментов ДНК со снижением количества фрагментов с другой стороны, также будут давать информацию о количестве используемых фрагментов. В некоторых вариантах осуществления синтетический поксвирусный геном можно синтезировать в виде одного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления синтетический поксвирусный геном собран из 2-14 перекрывающихся фрагментов ДНК. В некоторых вариантах осуществления синтетический поксвирусный геном собран из 4-12 перекрывающихся фрагментов ДНК. В некоторых вариантах осуществления синтетический поксвирусный геном собран из 6-10 перекрывающихся фрагментов ДНК. В некоторых вариантах осуществления синтетический поксвирусный геном собран из 8-12 перекрывающихся фрагментов ДНК. В некоторых вариантах осуществления синтетический поксвирусный геном собран из 10 перекрывающихся фрагментов ДНК. В примере варианта осуществления настоящего изобретения синтетический вирус оспы лошадей (scHPXV) реактивируют из 10 химически синтезированных перекрывающихся фрагментов двухцепочечной ДНК. В некоторых вариантах осуществления все фрагменты, охватывающие поксвирусный геном, химически синтезированы. В некоторых вариантах осуществления один или более фрагментов химически синтезированы, и один или более фрагментов получены из природной ДНК (например, посредством ПЦР-амплификации или хорошо известными способами рекомбинантной ДНК).

[0084] В некоторых вариантах осуществления концевые шпилечные петли синтезируют раздельно и лигируют во фрагменты, содержащие левый и правые концы поксвирусного генома. В некоторых вариантах осуществления концевые шпилечные петли можно получать из природной матрицы. В некоторых вариантах осуществления концевые шпильки синтетического поксвируса получают из VACV. В некоторых вариантах осуществления концевые шпильки рекомбинантного синтетического поксвируса получают из CMLV, CPXV, ECTV, HPXV, MPXV, RPXV, вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин Гишу или VPV. В некоторых вариантах

осуществления концевые шпильки рекомбинантного scHPXV получают из VACV. В некоторых вариантах осуществления концевые шпильки рекомбинантного scHPXV получают из CMLV, CPXV, ECTV, HPXV, MPXV, RPXV, вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин Гишу или VPV. В некоторых вариантах осуществления концевые шпильки поксвируса основаны на концевых шпильках любого поксвируса, геном которого полностью секвенирован, или природного изолята, доступного для секвенирования генома.

[0085] Размер перекрывающихся фрагментов, используемых для получения поксвируса по изобретению, будет зависеть от размера поксвирусного генома. Следует понимать, что могут иметь место широкие колебания размеров фрагментов, и различные практические соображения, такие как возможность химического синтеза очень крупных фрагментов ДНК, будут давать информацию для выбора размеров фрагментов. В некоторых вариантах осуществления диапазон размеров фрагментов составляет от приблизительно 2000 п.н. до приблизительно 50000 п.н. В некоторых вариантах осуществления диапазон размеров фрагментов составляет от приблизительно 3000 п.н. до приблизительно 45000 п.н. В некоторых вариантах осуществления диапазон размеров фрагментов составляет приблизительно от 4000 п.н. до 40000 п.н. В некоторых вариантах осуществления диапазон размеров фрагментов составляет приблизительно от 5000 п.н. до 35000 п.н. В некоторых вариантах осуществления самые большие фрагменты составляют приблизительно 20000 п.н., 21000 п.н., 22000 п.н., 23000 п.н., 24 000 п.н., 25000 п.н., 26000 п.н., 27000 п.н., 28000 п.н., 29000 п.н., 30000 п.н., 31000 п.н., 32000 п.н., 33000 п.н., 34000 п.н., 35000 п.н., 36000 п.н., 37000 п.н., 38000 п.н., 39000 п.н., 40000 п.н., 41000 п.н., 42000 п.н., 43000 п.н., 44000 п.н., 45000 п.н., 46000 п.н., 47000 п.н., 48000 п.н., 49000 п.н. или 50000 п.н. В некоторых вариантах осуществления scHPXV реактивируют из 10 химически синтезированных перекрывающихся фрагментов двухцепочечной ДНК с диапазоном размеров от приблизительно 8500 п.н. до приблизительно 32000 п.н. (таблица 2).

[0086] Поксвирусы по изобретению можно выращивать в любом субстрате, позволяющему вирусу расти до титров, делающих возможным использование рекомбинантного поксвируса, представленного в настоящем описании. Поксвирус по изобретению можно выращивать в клетках (например, клетках птиц, клетках летучих мышей, клетках крупного рогатого скота, клетках Верблюжьих, клетках канарейки, клетках кошки, клетках оленя, клетках лошадей, клетках домашней птицы, клетках песчанки, клетках козы, клетках человека, клетках обезьяны, клетках свиньи, клетках кролика, клетках енота, клетках тюленя, клетках овцы, клетках скунса, клетках полевки и т.д.), восприимчивых к инфицированию поксвирусами. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в адгезивных клетках. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в суспензионных клетках. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках млекопитающих. Такие способы хорошо известны специалистам в этой области. Типичные клетки млекопитающих включают, в

качестве неограничивающих примеров, BHK, MRC, BGMK, BRL3A, BSC-40, CEF, CEK, CHO, COS, CVI, HaCaT, HEL, клетки HeLa, HEK293, линию клеток остеосаркомы человека 143B, MDCK, NIH/3T3, клетки Vero и т.д. Для выделения вируса рекомбинантный поксвирус удаляют из культуры клеток и отделяют от клеточных компонентов, как правило, хорошо известными способами очистки, например, такими как центрифугирование в градиенте и хроматография на колонках, и его можно дополнительно очищать, как описано, способами, хорошо известными специалистам в этой области, например, посредством анализов бляшкообразования. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках Vero. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в нокаутных клетках Vero ACE2. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают адгезивных клетках Vero. В других вариантах осуществления поксвирус выращивают в суспензионных клетках Vero. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках BSC-40. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках BHK-21. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках MRC-5. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках MRC-5, в присутствии, например, 5% сыворотки, включая, в качестве неограничивающих примеров, эмбриональную телячью сыворотку. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают клетках птиц. Такие способы хорошо известны специалистам в этой области. Типичные клетки птиц включают, в качестве неограничивающих примеров, эмбриональные фибробласты курицы, клетки DF-1 (см., например, Himly et al., Virology, (1998) 248:295-304), эмбриональные клетки утки, клетки EB66® (см., например, Leon et al. Vaccine, (2016) 34: 5878-5885), клетки AGE1.CR, включая, в качестве неограничивающих примеров, клетки AGE1.CRpIX®, клетки DF-1 (см., например, Lohr et al., Vaccine, (2009) 36:4975-4982) и т.д. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в эмбриональных фибробластах курицы. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в эмбриональных клетках утки. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках EB66®. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках AGE1.CRpIX®. В некоторых вариантах осуществления поксвирус выращивают в клетках DF-1.

[0087] В некоторых вариантах осуществления способ получения синтетического поксвируса включает стадию (i) химического синтеза перекрывающихся фрагментов ДНК, соответствующих по существу всему вирусному геному поксвируса и, необязательно, химического синтеза концевых шпилечных петель из другого вируса или другого штамма вируса; (ii) трансфекции перекрывающихся фрагментов ДНК в инфицированные вирусом-помощником клетки; (iii) культивирования указанных клеток для получения смеси вируса-помощника и синтетических поксвирусных частиц в указанных клетках; и (iv) высевания смеси на клетки-хозяева, специфические для поксвируса, для выделения синтетического поксвируса.

[0088] В некоторых вариантах осуществления способ получения синтетического вируса оспы лошадей включает стадию (i) химического синтеза перекрывающихся фрагментов ДНК, соответствующих по существу всему вирусному геному вируса оспы лошадей и химического синтеза концевых шпилечных петель из другого поксвируса (такого как VACV, штамм WB или клон NYCBH ACAM 2000); (ii) трансфекции перекрывающихся фрагментов ДНК в инфицированные вирусом-помощником клетки; (iii) культивирования указанных клеток для получения смеси вируса-помощника и частиц синтетического вируса оспы лошадей в указанных клеток; и (iv) высевания смеси на клетки-хозяева, специфические для вируса оспы лошадей, для выделения синтетического вируса оспы лошадей.

[0089] В некоторых вариантах осуществления поксвирус является синтетическим вирусом оспы лошадей. В некоторых вариантах осуществления синтетический вирус оспы лошадей геном основан на опубликованной последовательности генома, описанной для вируса оспы лошадей (регистрационный номер GenBank DQ792504), и концевые шпильки основаны на опубликованной последовательности генома, схожей с клоном ACAM2000 штамма NYCBH VACV (регистрационный номер GenBank MN974380). В некоторых вариантах осуществления синтетический вирус оспы лошадей содержит последовательность, депонированную в GenBank под регистрационным номером KY349117; см. патентную заявку США № 2018/0251736, включенную в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления синтетический вирус оспы лошадей отличается тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая S-белок вируса SARS-CoV-2, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43.

[0090] В некоторых вариантах осуществления поксвирус является синтетическим рекомбинантным вирусом осповакцины (synVACV). В некоторых вариантах осуществления синтетический геном вируса осповакцины основан на опубликованной последовательности генома, описанной для клона ACAM2000 штамма NYCBH VACV (регистрационный номер GenBank AY313847; Osborne JD et al. Vaccine. 2007; 25(52):8807-32). В некоторых вариантах осуществления синтетический геном вируса осповакцины основан на опубликованной последовательности генома, схожей с клоном ACAM2000 штамма NYCBH VACV (регистрационный номер GenBank MN974380; см. WO 2019/213452, включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В некоторых вариантах осуществления синтетический вирус осповакцины содержит последовательность, депонированную в GenBank под регистрационным номером MN974381 (см. WO 2019/213452, включенную в настоящее описание в качестве ссылки). В некоторых вариантах осуществления синтетический вируса осповакцины отличается тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая S-белок вируса SARS-CoV-2, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44.

Получение рекомбинантного поксвируса, содержащего белок SARS-CoV-2

[0091] Любые из синтетических поксвирусов, описанных в патентной заявке США № 2018/0251736 и WO 2019/213452, можно использовать для получения рекомбинантного поксвируса, содержащего белок SARS-CoV-2, как представлено в настоящем описании.

[0092] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к рекомбинантному поксвирусу, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, где белок SARS-CoV-2 выбран из группы, состоящей из спайкового белка (S), мембранного белка (M) и нуклеокапсидного белка (N) или комбинаций двух или более указанных белков. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность вируса SARS-CoV-2 является любой из опубликованных последовательностей генома, включая, в качестве неограничивающих примеров, последовательности генома уханьский штамм, британский штамм B.1.1.7, южно-африканский штамм B.1.351, бразильский штамм B.1.1.28, другие появляющиеся варианты и любые из их вариантов. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность вируса SARS-CoV-2 выбрана из группы, состоящей из регистрационных номеров Genbank NC045512.2, LC521925.1, MN988668.1, MN985325.1, MN975262.1, MN938384.1, LR757998.1, LR757996.1, LR757995.1 и MN908947.3. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность вируса SARS-CoV-2 отличается последовательностью, приведенной под регистрационным номером Genbank MN988668.1; SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность вируса SARS-CoV-2 дополнительно выбрана из группы, состоящей из регистрационных номеров Genbank QQX99439 (например, британского варианта B.1.1.7), TEGALLY (например, южно-африканского варианта B.1.351), YP_009724390 (например, уханьского варианта) и FARIA (например, бразильского варианта B.1.1.28).

[0093] Оболочка вируса SARS-CoV-2 покрыта характерными спайковыми гликопротеины (S), а также белками оболочки (E) и мембранными белками (M). S-белок опосредует присоединение к клетке-хозяину и проникновение в нее. Спиральный нуклеокапсид, состоящий из вирусного генома, инкапсидированного нуклеокапсидным белком (N), находится внутри оболочки вируса. В некоторых вариантах осуществления поксвирус или синтетический поксвирус содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок оболочки SARS-CoV-2. Неограничивающими примерами таких белков являются спайковый белок (S), мембранный белок (M) и белок гемагглютинин-эстераза (HE). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую S-белок (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую S-белок (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую M-белок (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую M-белок (SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или

синтетические поксвирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую N-белок (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую N-белок (SEQ ID NO: 49). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую HE-белок (E- или HE--белок Wuhan-HU-1, регистрационный номер LC521925.1; SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат комбинацию S-белка и M-белка. В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержат комбинацию S-белка и N-белка. В некоторых вариантах осуществления поксвирусы или синтетические поксвирусы содержит комбинацию M-белка и N-белка.

[0094] В некоторых вариантах осуществления вирус SARS-CoV-2 является изолятом вируса пневмонии рынка морепродуктов Уханя 2019-nCoV. Регистрационный номер Genbank LC521925.1; SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления вирус SARS-CoV-2 является изолятом вируса пневмонии рынка морепродуктов Уханя 2019-nCoV. Регистрационный номер Genbank MN988668.1; SEQ ID NO: 46.

[0095] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность белка вируса SARS-CoV-2 модифицирована относительно белка дикого типа.

[0096] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующий S-белок, модифицирована относительно нуклеотидной последовательности дикого типа. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность S-белка модифицирована относительно белка дикого типа (S-белка Wuhan-HU-1, регистрационный номер LC521925.1; SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность S-белка модифицирована относительно белка дикого типа (S-белка Wuhan-HU-1, регистрационный номер MN988668.1; SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность S-белка модифицирована относительно белка дикого типа (S-белка Wuhan-Hu-1, регистрационный номер NC_045512.2; SEQ ID NO: 53). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность белка вируса SARS-CoV-2 модифицирована относительно белка дикого типа таким образом, что модифицированный белок адаптирован для инфицирования мышей. См. Roberts et al. PLoS Pathog 3(1): e5. doi:10.1371; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления тирозин в положении 459 заменяют гистидином (Y459H) в S-белке относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления S-белок содержит одну или более мутаций, делающих возможным антителозависимое усиление. В некоторых вариантах осуществления аспарагиновую кислоту в положении 614 заменяют глицином (D614G) в S-белке относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 47). См. Korber et al. bioRxiv 2020.04.29.069054; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления S-белок содержит одну или более мутаций

в коровых белках слияния области HR1. В некоторых вариантах осуществления серин в положении 943 заменяют пролином (S943P) в S-белке относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления S-белок содержит одну или более мутаций, стабилизирующих S-белок в антигенно оптимальной конформации перед слиянием, приводящей к повышенной экспрессии, конформационной гомогенности и вызыванию мощных гуморальных ответов. В некоторых вариантах осуществления мутации, стабилизирующие S-белок в конформации перед слиянием, находятся в начале центральной спирали. См. Pallesen et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(35); включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления лизин в положении 986 заменяют пролином (K986P) в S-белке относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления валин в положении 987 заменяют пролином (V987P) в S-белке относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления S-белок содержит любую из замен Y459H, D614G, S943P, K986P и V987P или их комбинацию относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 47).

[0097] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность M-белка модифицирована относительно белка дикого типа (M-белка Wuhan-HU-1, регистрационный номер LC521925.1; SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность M-белка модифицирована относительно белка дикого типа (M-белка Wuhan-HU-1, регистрационный номер MN988668.1; SEQ ID NO: 48). В некоторых вариантах осуществления глутаминовую кислоту в положении 11 заменяют лизином в M-белке относительно белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления глутаминовую кислоту в положении 11 заменяют лизином в M-белке относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления глутаминовую кислоту в положении 11 заменяют лизином в M-белке относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 48).

[0098] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность N-белка модифицирована относительно белка дикого типа (N-белка Wuhan-HU-1, регистрационный номер LC521925.1; SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность N-белка модифицирована относительно белка дикого типа (N-белка Wuhan-HU-1, регистрационный номер MN988668.1; SEQ ID NO: 49).

[0099] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, модифицирована относительно белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, модифицирована относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, модифицирована относительно белка дикого типа (SEQ ID NO: 47). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2,

модифицирована относительно белка дикого типа для эффективной экспрессии трансгенов в поксвирусах. В некоторых вариантах осуществления удаляют гетерологичный ген, кодирующий последовательности, содержащие ранний сигнал терминации транскрипции (ETTS) вируса осповакцины (TTTTTNT; также названный T_5NT (SEQ ID NO: 14)). См. Earl et al. Journal of Virology, 1990; 2448-2451; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления геном поксвируса сохраняет два перекрывающихся эндогенных ETTS. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген, кодирующий последовательности, содержащие ранний сигнал терминации транскрипции (ETTS) вируса осповакцины (TTTTTNT; также названный T_5NT (SEQ ID NO: 14)) удаляют относительно последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей S-белок вируса SARS-CoV-2 (S-белка Wuhan-HU-1, регистрационный номер MN988668.1; SEQ ID NO: 47).

[0100] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, функционально связана с промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор является поксвирус-специфическим промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор находится между левым фланкирующим плечом и ATG экспрессирующей кассеты трансгена. В некоторых вариантах осуществления промотор поксвируса является ранним промотором вируса осповакцины. В некоторых вариантах осуществления промотор поксвируса является оптимизированным ранним промотором вируса осповакцины (AAAATTGAAANNNTANNNNNNNNNNNNNNNN; SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления промотор поксвируса является синтетическим поздним промотором вируса осповакцины (TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNNNNNNTAAATG; SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления промотор поксвируса является перекрывающимся синтетическим ранним/поздним промотором (AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATA; SEQ ID NO: 5). См. фигуру 8. См. Chakrabarti et al. BioTechniques 23:1094-1097; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0101] В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность позднего промотора вируса осповакцины содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 (TTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATA). В некоторых вариантах осуществления поздний промотор вируса осповакцины является последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность позднего промотора вируса осповакцины содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7 (AAAATTGAAAAAATA). В некоторых вариантах осуществления промотор поксвируса является перекрывающимся синтетическим ранним/поздним промотором, содержащим последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8 (TTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATATCCGGTAAAATTGAAAAAATA). В некоторых вариантах осуществления промотор поксвируса является перекрывающимся

синтетическим ранним/поздним промотором, содержащим спейсерную последовательность нуклеиновой кислоты из 38-160 нуклеотидов в 3'-направлении от раннего промотора и между участком инициации транскрипции РНК и ATG. В некоторых вариантах осуществления спейсер составляет 160 нуклеотидов в длину, что приводит к повышенным уровням экспрессии. См. фигуру 9. См. Di Pilato et al. Journal of General Virology (2015), 96, 2360-2371; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления поздний промотор вируса осповакцины и спейсер содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления поздний промотор вируса осповакцины и спейсер представляет собой последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39.

[0102] В некоторых вариантах осуществления белок SARS-CoV-2 встраивают в ген, неявляющийся необходимым для репликации. В некоторых вариантах осуществления белок SARS-CoV-2 встраивают в локус тимидинкиназы (TK) (ID гена HPXV095; положения 992077-92610; SEQ ID NO: 1) вируса оспы лошадей или синтетического вируса оспы лошадей. В некоторых вариантах осуществления белок SARS-CoV-2 встраивают в локус тимидинкиназы (TK) (ID гена synVACV_105; положения 83823-84344; SEQ ID NO: 2) вируса осповакцины или синтетического вируса осповакцины. Локус TK обеспечивает стабильный участок инсерции для интересующих чужеродных генов. Локус TK также обеспечивает селективный маркер для идентификации клонов, в которые встроена нуклеиновая кислота, кодирующая белок SARS-CoV-2. Клоны, в которые встроена нуклеиновая кислота, кодирующая белок SARS-CoV-2, не могут расти в присутствии 5-бром-2-дезоксиуридина (BrdU), являющегося аналогом пиримидинового дезоксинуклеозида тимидина, из-за того, что не имеют гена TK.

[0103] Пример способа получения рекомбинантного поксвируса по изобретению, содержащего S-белок вируса SARS-CoV-2, включает:

a) инфицирование клеток (например, клеток Vero или клеток BSC-40) поксвирусом (таким как вирус оспы лошадей).

b) получение экспрессирующей кассеты, содержащей: нуклеотидный фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую S-белок, где получаемый S-белок содержит любую из замен аминокислот (i) Y459H, таким образом, что он адаптирован для инфицирования мышей; (ii) D614G; (iii) S943P; (iv) K986P или (v) V987P, или их комбинацию; и где нуклеотидная последовательность, кодирующая S-белок, содержит делецию двух последовательностей T5NT (SEQ ID NO: 14).

c) получение нуклеотидного фрагмента, содержащего ранний/поздний промотор вируса осповакцины, и расположение его выше модифицированного S-белка. Эту экспрессирующую кассету, содержащую ранний/поздний промотор вируса осповакцины и сконструированный S-ген, называют "сконструированной экспрессирующей кассеты S-гена SARS-CoV-2".

d) трансфекцию инфицированных клеток (например, клеток Vero или клеток BSC-40) с помощью полученного посредством ПЦР нуклеотидного фрагмента, содержащего

"сконструированную экспрессирующую кассету гена S-белка SARS-CoV-2". Вирус-помощник катализирует рекомбинацию между фрагментами, обладающими общими фланкирующими гомологичными последовательностями (последовательность между левым и правым плечом). Таким образом, экспрессирующую кассету будут встраивать в ген TK посредством рекомбинации между левой (HPXV094) и правой (HPXV096) гомологичными последовательностями (плечами). Левое и правое плечи являются последовательностями размером приблизительно 400 п.н., фланкирующими локус TK и являющимися специфическими для получаемого поксвируса. См. фигуру 10.

Способы по изобретению

[0104] Любые из синтетических поксвирусов, описанных в патентной заявке США № 2018/0251736 и WO 2019/213452, можно использовать в любом из способов, представленных в настоящем описании.

[0105] Любые из рекомбинантных поксвирусов, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2 по изобретению, можно использовать в любых из способов, представленных в настоящем описании.

[0106] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2, включающему инфицирование указанной клетки рекомбинантным поксвирусом по изобретению и селекцию инфицированной клетки, экспрессирующей указанный белок вируса SARS-CoV-2.

[0107] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по изобретению.

[0108] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения рекомбинантного поксвируса по изобретению, включающему:

(a) инфицирование клетки-хозяина поксвирусом;

(b) трансфекцию инфицированной клетки со стадии (a) с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей белок вируса SARS-CoV-2, для получения рекомбинантного поксвируса; и

(c) селекцию рекомбинантного поксвируса, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2 после трансфекции локализуется в области поксвируса, неявляющейся необходимой для репликации поксвируса.

[0109] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус по изобретению используют в качестве вакцины для экспрессии белка вируса SARS-CoV-2. В этой области известны способы оценки безопасности, иммуногенности и защитной способности рекомбинантного поксвируса. См. Kremer M et al. 2012. p 59-92. In Isaacs SN (ed), Vaccinia virus and poxvirology, vol 890. Humana Press, Totowa, NJ. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию осуществляют подкожным путем. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию осуществляют внутримышечным путем. В некоторых вариантах осуществления иммунизацию осуществляют интраназальным путем.

В некоторых вариантах осуществления иммунизацию осуществляют посредством скарификации. В некоторых вариантах осуществления используют диапазон от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^8 БОЕ рекомбинантного поксвируса. В некоторых вариантах осуществления для иммунизации используют приблизительно 10^4, приблизительно 10^5, приблизительно 10^6, приблизительно 10^7 или приблизительно 10^8 БОЕ рекомбинантного поксвируса. В некоторых вариантах осуществления для иммунизации используют приблизительно 10^5 БОЕ рекомбинантного поксвируса. Лечащий врач сможет определять подходящую дозу в БОЕ для каждого индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят одну дозу. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят более одной дозы.

[0110] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, включающем введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, где иммунный ответ включает антитела, способные нейтрализовать вирус SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование вируса после инфицирования индивидуума SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, где иммунный ответ является Т-клеточным иммунным ответом.

[0111] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, включающем введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации. В некоторых вариантах осуществления

рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где указанный иммунный ответ включает антитела, способные нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 и поксвирус. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2 и вируса натуральной оспы. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование инфекции вируса SARS-CoV-2 и/или инфекции поксвируса у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где иммунный ответ является Т-клеточным иммунным ответом. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

[0112] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2, включающем введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование вируса после инфицирования индивидуума SARS-CoV-2.

[0113] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, включающем введение индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса

вводят посредством скарификации. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2 и поксвируса. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование вируса после инфицирования SARS-CoV-2 и/или инфицирования вирусом натуральной оспы у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

[0114] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе снижения или профилактики прогрессирования инфекции вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, нуждающегося в этом или находящегося в группе риска, включающем введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса или фармацевтической композиции.

[0115] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе снижения или профилактики прогрессирования инфекции вируса SARS-CoV-2 и поксвируса у индивидуума, находящегося в группе риска, включающем введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать в способе снижения или профилактики прогрессирования инфекции вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

[0116] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать для вакцины против вируса SARS-CoV-2, содержащей рекомбинантный вирус или фармацевтическую композицию.

[0117] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать для бивалентной вакцины против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, содержащей рекомбинантный вирус или фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный поксвирус можно использовать для бивалентной вакцины против вируса SARS-CoV-2, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

Таблица 1. Компиляция некоторых из последовательностей по изобретению.

Синтетический вирус оспы	1 ATTTACGGATTCACCAATAAAAATAAACTAGAGAAACTTAGTAC

лошадей, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую S-белок вируса SARS-CoV-2. SEQ ID NO: 43	TAATAAGGAAC 55 56 TAGAATCGTATAGTTCTAGCCCTCTTCAAGAACCCATTAGGTTAA ATGATTTTCT 110 111 GGGACTATTGGAATGTATTAAAAAGAATATTCCTCTAACAGATA TTCCGACAAAG 165 166 GATTGATTACTATAAATGGAGAATGTTCCTAATGTATACTTTAAT CCTGTGTTTA 220 221 TAGAGCCCACGTTTAAACATTCTTTATTAAGTGTTTATAAACACA GATTAATAGT 275 276 TTTATTTGAAGTATTCATTGTATTCATTCTAATATATGTATTTTTT AGATCTGAA 330 331 TTAAATATGTTCTTCATGCCTAAACGAAAAATACCCGATCCTATT GATAGATTAC 385 386 GACGTGCTAATCTAGCGTGTGAAGACGATAAGTTAATGATCTAT GGATTACCATG 440 441 GATGACAACTCAAACATCTGCGTTATCAATAAATAGTAAACCGA TAGTGTATAAA 495 496 GATTGTGCAAAGCTTTTGCGATCAATAAATGGATCACAACCAGT ATCTCTTAACG 550 551 ATGTTCTTCGCAGATGATGATTCATTTTTTAAGTATTTGGCTAGT CAAGATGATG 605 606 AATCTTCATTATCTGATATATTGCAAATCACTCAATATCTAGACT TTCTGTTATT 660 661

	ATTATTGATCCAATCAAAAAATAAATTAGAAGCCGTGGGTCATT GTTATGAATCT 715 716 CTTTCAGAGGAATACAGACAATTGACAAAATTCACAGACTTTCA AGATTTTAAAA 770 771 AACTGTTTAACAAGGTCCCTATTGTTACAGATGGAAGGGTCAAA CTTAATAAAGG 825 826 ATATTTGTTCGACTTTGTGATTAGTTTGATGCGATTCAAAAAAGA ATCCTCTCTA 880 881 GCTACCACCGCAATAGATCCTATTAGATACATAGATCCTCGTCG TGATATCGCAT 935 936 TTTCTAACGTGATGGATATATTAAAGTTGAATAAAGTGAACAAT AATTAATTCTT 990 991 TATTGTCATCTTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATATCCGGTA AAATTGAAA 1045 1046 AAATATACACTAATTAGCGTCTCGTTTCAGACGCTAGCTCGAGG TTGGGAGCTCT 1100 1101 CCGGATCCAAGCTTATCGATTTCGAACCCGGGGTACCGAATTCC TCGAGGTTGGG 1155 1156 AGCTCTCCGGATCCAAGCTTATCGATTTCGAACCCGGGGTACCG AATTCCTCGAG 1210 1211 ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACC TTGACCGGT 1265 1266 GCACCACTTTTGATGATGTTCAAGCTCCTAATTACACTCAACATA CTTCATCTAT 1320

	1321 GAGGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTTAGATCAGACACTC TTTATTTAACT 1375 1376 CAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATA CTATTAATC 1430 1431 ATACGTTTGGCAACCCTGTCATACCTTTTAAGGATGGTATTTATT TTGCTGCCAC 1485 1486 AGAGAAATCAAATGTTGTCCGTGGTTGGGTTTTTGGTTCTACCAT GAACAACAAG 1540 1541 TCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATTCTACTAATGTTGTTATA CGAGCATGTA 1595 1596 ACTTTGAATTGTGTGACAACCCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCA TGGGTACACA 1650 1651 GACACATACTATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACTTTCGA GTACATATCT 1705 1706 GATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAGTCAGGTAATTTTAAA CACTTACGAG 1760 1761 AGTTTGTGTTTAAAAATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGG GCTATCAACC 1815 1816 TATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAA ACCTATTTTT 1870 1871 AAGTTGCCTCTTGGTATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTT ACAGCCTTTT 1925 1926 CACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCAGCCTATTTT

	GTTGGCTATTT 1980 1981 AAAGCCAACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAA TCACAGATGCT 2035 2036 GTTGATTGTTCTCAAAATCCACTTGCTGAACTCAAATGCTCTGTT AAGAGCTTTG 2090 2091 AGATTGACAAAGGAATTTACCAGACCTCTAATTTCAGGGTTGTT CCCTCAGGAGA 2145 2146 TGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAAACTTGTGTCCTTTTGGAGA GGTTTTTAAT 2200 2201 GCTACTAAATTCCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAAAT TTCTAATTGTG 2255 2256 TTGCTGATTACTCTGTGCTCTACAACTCAACATTCTTTTCAACCTT TAAGTGCTA 2310 2311 TGGCGTTTCTGCCACTAAGTTGAATGATCTTTGCTTCTCCAATGT CTATGCAGAT 2365 2366 TCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAATAGCGCCAGG ACAAACTGGTG 2420 2421 TTATTGCTGATTATAATTATAAATTGCCAGATGATTTCATGGGTT GTGTCCTTGC 2475 2476 TTGGAATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATCATA ATTATAAATAT 2530 2531 AGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACAT ATCTAATGTGC 2585 2586

	CTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGCACCCCACCTGCTCTTAATT GTTATTGGCC 2640 2641 ATTAAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCA ACCTTACAGA 2695 2696 GTTGTAGTACTTTCTTTTGAACTTTTAAATGCACCGGCCACGGTT TGTGGACCAA 2750 2751 AATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTCAATTTTAATT TTAATGGACT 2805 2806 CACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACC ATTTCAACAA 2860 2861 TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTCGAGATCCT AAAACATCTG 2915 2916 AAATATTAGACATTTCACCTTGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAA TTACACCTGG 2970 2971 AACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGATGTTAA CTGCACTGAT 3025 3026 GTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCG CATATATTCTA 3080 3081 CTGGAAACAATGTATTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGA GCTGAGCATGT 3135 3136 CGACACTTCTTATGAGTGCGACATTCCTATTGGAGCTGGCATTTG TGCTAGTTAC 3190 3191 CATACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTG GCTTATACTA 3245

	3246 TGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCA TTGCTATACC 3300 3301 TACTAACTTTTCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTC TATGGCTAAA 3355 3356 ACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGCGGAGATTCTACTGA ATGTGCTAATT 3410 3411 TGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAACTAAATCGTGCAC TCTCAGGTAT 3465 3466 TGCTGCTGAACAGGATCGCAACACACGTGAAGTGTTCGCTCAAG TCAAACAAATG 3520 3521 TACAAAACCCCAACTTTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCA CAAATATTAC 3575 3576 CTGACCCTCTAAAGCCAACTAAGAGGTCTTTTATTGAGGACTTG CTCTTTAATAA 3630 3631 GGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAAT GCCTAGGTGAT 3685 3686 ATTAATGCTAGAGATCTCATTTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACT TACAGTGTTGC 3740 3741 CACCTCTGCTCACTGATGATATGATTGCTGCCTACACTGCTGCTC TAGTTAGTGG 3795 3796 TACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCTCTTCA AATACCTTTT 3850 3851 GCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCA

	AAATGTTCTCT 3905 3906 ATGAGAACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGAT TAGTCAAATTCA 3960 3961 AGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATTGGGCAAGCTGCAAG ACGTTGTTAAC 4015 4016 CAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTTAAACAACTTAGCTC TAATTTTGGTG 4070 4071 CAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTCGCGACTTGATAAAG TCGAGGCGGA 4125 4126 GGTACAAATTGACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTC AAACCTATGTA 4180 4181 ACACAACAACTAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAA TCTTGCTGCTA 4235 4236 CTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGAC TTTTGTGGAAA 4290 4291 GGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTG TTGTCTTCCTA 4345 4346 CATGTCACGTATGTGCCATCCCAGGAGAGGAACTTCACCACAGC GCCAGCAATTT 4400 4401 GTCATGAAGGCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGTGTTTTCGTG TTTAATGGCAC 4455 4456 TTCTTGGTTTATTACACAGAGGAACTTCTTTTCTCCACAAATAAT TACTACAGAC 4510 4511

	AATACATTTGTCTCAGGAAATTGTGATGTCGTTATTGGCATCATT AACAACACAG 4565 4566 TTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTCGACTCATTCAAAGAAGAG CTGGACAAGTA 4620 4621 CTTCAAAAATCATACATCACCAGATGTTGATCTTGGCGACATTTC AGGCATTAAC 4675 4676 GCTTCTGTCGTCAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGA GGTCGCTAAAA 4730 4731 ATTTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATAT GAGCAATATAT 4785 4786 TAAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAAT TGCCATCGTC 4840 4841 ATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGC CTCAAGGGTG 4895 4896 CATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTG AGCCAGTTCT 4950 4951 CAAGGGTGTCAAATTACATTACACATAATATTATATTTTTTATCT AAAAAACTAA 5005 5006 AAATAAACATTGATTAAATTTTAATATAATACTTAAAAATGGAT GTTGTGTCGTT 5060 5061 AGATAAACCGTTTATGTATTTTGAGGAAATTGATAATGAGTTAG ATTACGAACCA 5115 5116 GAAAGTGCAAATGAGGTCGCAAAAAAACTACCGTATCAAGGAC AGTTAAAACTAT 5170

	5171 TACTAGGAGAATTATTTTTTCTTAGTAAGTTACAGCGACACGGTA TATTAGATGG 5225 5226 TGCCACCGTAGTGTATATAGGATCGGCTCCTGGTACACATATAC GTTATTTGAGA 5280 5281 GATCATTTCTATAATTTAGGAATGATTATCAAATGGATGCTAATT GACGGACGCC 5335 5336 ATCATGATCCTATTCTAAATGGATTGCGTGATGTGACTCTAGTGA CTCGGTTCGT 5390 5391 TGATGAGGAATATCTACGATCCATCAAAAAACAACTGCATCCTT CTAAGATTATT 5445 5446 TTAATTTCTGATGTAAGATCCAAACGAGGAGGAAATGAACCTAG TACGGCGGATT 5500 5501 TACTAAGTAATTACGCTCTACAAAATGTCATGATTAGTATTTTAA ACCCCGTGGC 5555 5556 ATCTAGTCTTAAATGGAGATGCCCGTTTCCAGATCAATGGATCA AGGACTTTTAT 5610 5611 ATCCCACACGGTAATAAAATGTTACAACCTTTTGCTCCTTCATAT TCAGCTGAAA 5665 5666 TGAGATTATTAAGTATTTATACCGGTGAGAACATGAGACTGACT CGAGTTACCAA 5720 5721 ATTAGACGCTGTAAATTATGAAAAAAAGATGTACTACCTTAATA AGATCGTCCGT 5775 5776 AACAAAGTAGTTGTTAACTTTGATTATCCTAATCAGGAATATGA

	CTATTTTCACA 5830 5831 TGTACTTTATGCTGAGGACCGTATACTGCAATAAAACATTTCCTA CTACTAAAGC 5885 5886 AAAGGTACTATTTCTACAACAATCTATATTTCGTTTCTTAAATAT TCCAACAACA 5940 5941 TCAACTGAAAAAGTTAGTCATGAACCAATACAACGTAA 5978
Синтетический вирус осповакцины, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую S-белок вируса SARS-CoV-2. SEQ ID NO: 44	1 ATTTACGGATTCACCAATAAAAATAAACTAGAGAAACTTAGTAC TAATAAGGAAC 55 56 TAGAATCGTATAGTTCTAGCCCTCTTCAAGAACCCATTAGGTTAA ATGATTTTCT 110 111 GGGACTATTGGAATGTGTTAAAAAGAATATTCCTCTAACAGATA TTCCGACAAAG 165 166 GATTGATTACTATAAATGGAGAATGTTCCTAATGTATACTTTAAT CCTGTGTTTA 220 221 TAGAGCCCACGTTTAAACATTCTTTATTAAGTGTTTATAAACACA GATTAATAGT 275 276 TTTATTTGAAGTATTCGTTGTATTCATTCTAATATATGTATTTTTT AGATCTGAA 330 331 TTAAATATGTTCTTCATGCCTAAACGAAAAATACCCGATCCTATT GATAGATTAC 385 386 GACGTGCTAATCTAGCGTGTGAAGACGATAAATTAATGATCTAT GGATTACCATG 440 441 GATGACAACTCAAACATCTGCGTTATCAATAAATAGTAAACCGA

	TAGTGTATAAA 495 496 GATTGTGCAAAGCTTTTGCGATCAATAAATGGATCACAACCAGT ATCTCTTAACG 550 551 ATGTTCTTCGCAGATGATGATTCATTTTTTAAGTATTTGGCTAGT CAAGATGATG 605 606 AATCTTCATTATCTGATATATTGCAAATCACTCAATATCTAGACT TTCTGTTATT 660 661 ATTATTGATCCAATCAAAAAATAAATTAGAAGCCGTGGGTCATT GTTATGAATCT 715 716 CTTTCAGAGGAATACAGACAATTGACAAAATTCACAGACTCTCA AGATTTTAAAA 770 771 AACTGTTTAACAAGGTCCCTATTGTTACAGATGGAAGGGTCAAA CTTAATAAAGG 825 826 ATATTTGTTCGACTTTGTGATTAGTTTGATGCGATTCAAAAAAGA ATCAGCTCTA 880 881 GCTACCACCGCAATAGATCCTGTTAGATACATAGATCCTCGTCG CGATATCGCAT 935 936 TTTCTAACGTGATGGATATATTAAAGTCGAATAAAGTGAACAAT AATTAATTCTT 990 991 TATTGTCATCTTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATATCCGGTA AAATTGAAA 1045 1046 AAATATACACTAATTAGCGTCTCGTTTCAGACGCTAGCTCGAGG TTGGGAGCTCT 1100 1101

	CCGGATCCAAGCTTATCGATTTCGAACCCGGGGTACCGAATTCC TCGAGGTTGGG 1155 1156 AGCTCTCCGGATCCAAGCTTATCGATTTCGAACCCGGGGTACCG AATTCCTCGAG 1210 1211 ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACC TTGACCGGT 1265 1266 GCACCACTTTTGATGATGTTCAAGCTCCTAATTACACTCAACATA CTTCATCTAT 1320 1321 GAGGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTTAGATCAGACACTC TTTATTTAACT 1375 1376 CAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATA CTATTAATC 1430 1431 ATACGTTTGGCAACCCTGTCATACCTTTTAAGGATGGTATTTATT TTGCTGCCAC 1485 1486 AGAGAAATCAAATGTTGTCCGTGGTTGGGTTTTTGGTTCTACCAT GAACAACAAG 1540 1541 TCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATTCTACTAATGTTGTTATA CGAGCATGTA 1595 1596 ACTTTGAATTGTGTGACAACCCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCA TGGGTACACA 1650 1651 GACACATACTATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACTTTCGA GTACATATCT 1705 1706 GATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAGTCAGGTAATTTTAAA CACTTACGAG 1760

	1761 AGTTTGTGTTTAAAAATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGG GCTATCAACC 1815 1816 TATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAA ACCTATTTTT 1870 1871 AAGTTGCCTCTTGGTATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTT ACAGCCTTTT 1925 1926 CACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCAGCCTATTTT GTTGGCTATTT 1980 1981 AAAGCCAACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAA TCACAGATGCT 2035 2036 GTTGATTGTTCTCAAAATCCACTTGCTGAACTCAAATGCTCTGTT AAGAGCTTTG 2090 2091 AGATTGACAAAGGAATTTACCAGACCTCTAATTTCAGGGTTGTT CCCTCAGGAGA 2145 2146 TGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAAACTTGTGTCCTTTTGGAGA GGTTTTTAAT 2200 2201 GCTACTAAATTCCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAAAT TTCTAATTGTG 2255 2256 TTGCTGATTACTCTGTGCTCTACAACTCAACATTCTTTTCAACCTT TAAGTGCTA 2310 2311 TGGCGTTTCTGCCACTAAGTTGAATGATCTTTGCTTCTCCAATGT CTATGCAGAT 2365 2366 TCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAATAGCGCCAGG

	ACAAACTGGTG 2420 2421 TTATTGCTGATTATAATTATAAATTGCCAGATGATTTCATGGGTT GTGTCCTTGC 2475 2476 TTGGAATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATCATA ATTATAAATAT 2530 2531 AGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACAT ATCTAATGTGC 2585 2586 CTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGCACCCCACCTGCTCTTAATT GTTATTGGCC 2640 2641 ATTAAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCA ACCTTACAGA 2695 2696 GTTGTAGTACTTTCTTTTGAACTTTTAAATGCACCGGCCACGGTT TGTGGACCAA 2750 2751 AATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTCAATTTTAATT TTAATGGACT 2805 2806 CACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACC ATTTCAACAA 2860 2861 TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTCGAGATCCT AAAACATCTG 2915 2916 AAATATTAGACATTTCACCTTGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAA TTACACCTGG 2970 2971 AACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGATGTTAA CTGCACTGAT 3025 3026

	GTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCG CATATATTCTA 3080 3081 CTGGAAACAATGTATTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGA GCTGAGCATGT 3135 3136 CGACACTTCTTATGAGTGCGACATTCCTATTGGAGCTGGCATTTG TGCTAGTTAC 3190 3191 CATACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTG GCTTATACTA 3245 3246 TGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCA TTGCTATACC 3300 3301 TACTAACTTTTCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTC TATGGCTAAA 3355 3356 ACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGCGGAGATTCTACTGA ATGTGCTAATT 3410 3411 TGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAACTAAATCGTGCAC TCTCAGGTAT 3465 3466 TGCTGCTGAACAGGATCGCAACACACGTGAAGTGTTCGCTCAAG TCAAACAAATG 3520 3521 TACAAAACCCCAACTTTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTCA CAAATATTAC 3575 3576 CTGACCCTCTAAAGCCAACTAAGAGGTCTTTTATTGAGGACTTG CTCTTTAATAA 3630 3631 GGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAAT GCCTAGGTGAT 3685

	3686 ATTAATGCTAGAGATCTCATTTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACT TACAGTGTTGC 3740 3741 CACCTCTGCTCACTGATGATATGATTGCTGCCTACACTGCTGCTC TAGTTAGTGG 3795 3796 TACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCTCTTCA AATACCTTTT 3850 3851 GCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCA AAATGTTCTCT 3905 3906 ATGAGAACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGAT TAGTCAAATTCA 3960 3961 AGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATTGGGCAAGCTGCAAG ACGTTGTTAAC 4015 4016 CAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTTAAACAACTTAGCTC TAATTTTGGTG 4070 4071 CAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTCGCGACTTGATAAAG TCGAGGCGGA 4125 4126 GGTACAAATTGACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTC AAACCTATGTA 4180 4181 ACACAACAACTAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAA TCTTGCTGCTA 4235 4236 CTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGAC TTTTGTGGAAA 4290 4291 GGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTG

	TTGTCTTCCTA 4345 4346 CATGTCACGTATGTGCCATCCCAGGAGAGGAACTTCACCACAGC GCCAGCAATTT 4400 4401 GTCATGAAGGCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGTGTTTTCGTG TTTAATGGCAC 4455 4456 TTCTTGGTTTATTACACAGAGGAACTTCTTTTCTCCACAAATAAT TACTACAGAC 4510 4511 AATACATTTGTCTCAGGAAATTGTGATGTCGTTATTGGCATCATT AACAACACAG 4565 4566 TTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTCGACTCATTCAAAGAAGAG CTGGACAAGTA 4620 4621 CTTCAAAAATCATACATCACCAGATGTTGATCTTGGCGACATTTC AGGCATTAAC 4675 4676 GCTTCTGTCGTCAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGA GGTCGCTAAAA 4730 4731 ATTTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATAT GAGCAATATAT 4785 4786 TAAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAAT TGCCATCGTC 4840 4841 ATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGC CTCAAGGGTG 4895 4896 CATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTG AGCCAGTTCT 4950 4951

	CAAGGGTGTCAAATTACATTACACATAATATTATATTTTTTATCT AAAAAACTAA 5005 5006 AAATAAACATTGATTAAATTTTAATATAATACTTAAAAATGGAT GTTGTGTCGTT 5060 5061 AGATAAACCGTTTATGTATTTTGAGGAAATTGATAATGAGTTAG ATTACGAACCA 5115 5116 GAAAGTGCAAATGAGGTCGCAAAAAAACTGCCGTATCAAGGAC AGTTAAAACTAT 5170 5171 TACTAGGAGAATTATTTTTTCTTAGTAAGTTACAGCGACACGGTA TATTAGATGG 5225 5226 TGCCACCGTAGTGTATATAGGATCTGCTCCCGGTACACATATAC GTTATTTGAGA 5280 5281 GATCATTTCTATAATTTAGGAGTGATCATCAAATGGATGCTAATT GACGGCCGCC 5335 5336 ATCATGATCCTATTTTAAATGGATTGCGTGATGTGACTCTAGTGA CTCGGTTCGT 5390 5391 TGATGAGGAATATCTACGATCCATCAAAAAACAACTGCATCCTT CTAAGATTATT 5445 5446 TTAATTTCTGATGTGAGATCCAAACGAGGAGGAAATGAACCTAG TACGGCGGATT 5500 5501 TACTAAGTAATTACGCTCTACAAAATGTCATGATTAGTATTTTAA ACCCCGTGGC 5555 5556 ATCTAGTCTTAAATGGAGATGCCCGTTTCCAGATCAATGGATCA AGGACTTTTAT 5610

	5611 ATCCCACACGGTAATAAAATGTTACAACCTTTTGCTCCTTCATAT TCAGCTGAAA 5665 5666 TGAGATTATTAAGTATTTATACCGGTGAGAACATGAGACTGACT CGAGTTACCAA 5720 5721 ATTAGACGCTGTAAATTATGAAAAAAAGATGTACTACCTTAATA AGATCGTCCGT 5775 5776 AACAAAGTAGTTGTTAACTTTGATTATCCTAATCAGGAATATGA CTATTTTCACA 5830 5831 TGTACTTTATGCTGAGGACCGTGTACTGCAATAAAACATTTCCTA CTACTAAAGC 5885 5886 AAAGGTACTATTTCTACAACAATCTATATTTCGTTTCTTAAATAT TCCAACAACA 5940 5941 TCAACTGAAAAAGTTAGTCATGAACCAATACAACGTAA 5978
Нуклеиновая кислота, кодирующая S-белок (21562-25383) под регистрационным номером Gene Bank MN988668 или (21579-25400) под регистрационным номером Gene Bank NC_045512.	21562 atgtttgtt tttcttgttt tattgccact agtctctagt 21601 cagtgtgtta atcttacaac cagaactcaa ttacccccctg catacactaa ttctttcaca 21661 cgtggtgttt attaccctga caaagttttc agatcctcag ttttacattc aactcaggac 21721 ttgttcttac ctttcttttc caatgttact tggttccatg ctatacatgt ctctgggacc 21781 aatggtacta agaggtttga taaccctgtc ctaccattta atgatggtgt ttattttgct 21841 tccactgaga agtctaacat aataagaggc tggatttttg gtactacttt agattcgaag 21901 acccagtccc tacttattgt taataacgct actaatgttg ttattaaagt ctgtgaattt 21961 caattttgta atgatccatt tttgggtgtt tattaccaca aaaacaacaa aagttggatg 22021 gaaagtgagt tcagagttta ttctagtgcg aataattgca cttttgaata tgtctctcag 22081 ccttttctta tggaccttga aggaaaacag ggtaatttca aaaatcttag ggaatttgtg 22141 tttaagaata ttgatggtta ttttaaaata tattctaagc acacgcctat taatttagtg 22201 cgtgatctcc ctcagggttt ttcggcttta gaaccattgg tagatttgcc aataggtatt 22261 aacatcacta ggtttcaaac tttacttgct ttacatagaa gttatttgac tcctggtgat 22321 tcttcttcag gttggacagc tggtgctgca gcttattatg tgggttatct tcaacctagg 22381 acttttctat taaaatataa tgaaaatgga accattacag atgctgtaga ctgtgcactt

SEQ ID NO: 45	22441 gaccctctct cagaaacaaa gtgtacgttg aaatccttca ctgtagaaaa aggaatctat 22501 caaacttcta actttagagt ccaaccaaca gaatctattg ttagatttcc taatattaca 22561 aacttgtgcc cttttggtga agtttttaac gccaccagat ttgcatctgt ttatgcttgg 22621 aacaggaaga gaatcagcaa ctgtgttgct gattattctg tcctatataa ttccgcatca 22681 ttttccactt ttaagtgtta tggagtgtct cctactaaat taaatgatct ctgctttact 22741 aatgtctatg cagattcatt tgtaattaga ggtgatgaag tcagacaaat cgctccaggg 22801 caaactggaa agattgctga ttataattat aaattaccag atgattttac aggctgcgtt 22861 atagcttgga attctaacaa tcttgattct aaggttggtg gtaattataa ttacctgtat 22921 agattgttta ggaagtctaa tctcaaacct tttgagagag atatttcaac tgaaatctat 22981 caggccggta gcacaccttg taatggtgtt gaaggtttta attgttactt tcctttacaa 23041 tcatatggtt tccaacccac taatggtgtt ggttaccaac catacagagt agtagtactt 23101 tcttttgaac ttctacatgc accagcaact gtttgtggac ctaaaaagtc tactaatttg 23161 gttaaaaaca aatgtgtcaa tttcaacttc aatggtttaa caggcacagg tgttcttact 23221 gagtctaaca aaaagtttct gcctttccaa caatttggca gagacattgc tgacactact 23281 gatgctgtcc gtgatccaca gacacttgag attcttgaca ttacaccatg ttcttttggt 23341 ggtgtcagtg ttataacacc aggaacaaat acttctaacc aggttgctgt tctttatcag 23401 gatgttaact gcacagaagt ccctgttgct attcatgcag atcaacttac tcctacttgg 23461 cgtgtttatt ctacaggttc taatgttttt caaacacgtg caggctgttt aataggggct 23521 gaacatgtca acaactcata tgagtgtgac atacccattg gtgcaggtat atgcgctagt 23581 tatcagactc agactaattc tcctcggcgg gcacgtagtg tagctagtca atccatcatt 23641 gcctacacta tgtcacttgg tgcagaaaat tcagttgctt actctaataa ctctattgcc 23701 atacccacaa attttactat tagtgttacc acagaaattc taccagtgtc tatgaccaag 23761 acatcagtag attgtacaat gtacatttgt ggtgattcaa ctgaatgcag caatcttttg 23821 ttgcaatatg gcagtttttg tacacaatta aaccgtgctt taactggaat agctgttgaa 23881 caagacaaaa acacccaaga agtttttgca caagtcaaac aaatttacaa aacaccacca 23941 attaaagatt ttggtggttt taatttttca caaatattac cagatccatc aaaaccaagc 24001 aagaggtcat ttattgaaga tctacttttc aacaaagtga cacttgcaga tgctggcttc 24061 atcaaacaat atggtgattg ccttggtgat attgctgcta gagacctcat ttgtgcacaa 24121 aagtttaacg gccttactgt tttgccacct ttgctcacag atgaaatgat tgctcaatac 24181 acttctgcac tgttagcggg tacaatcact tctggttgga cctttggtgc aggtgctgca 24241 ttacaaatac catttgctat gcaaatggct tataggttta atggtattgg agttacacag 24301 aatgttctct atgagaacca aaaattgatt gccaaccaat ttaatagtgc tattggcaaa 24361 attcaagact cactttcttc cacagcaagt gcacttggaa aacttcaaga tgtggtcaac 24421 caaaatgcac aagctttaaa cacgcttgtt aaacaactta gctccaattt tggtgcaatt 24481 tcaagtgttt taaatgatat cctttcacgt cttgacaaag ttgaggctga agtgcaaatt

	24541 gataggttga tcacaggcag acttcaaagt ttgcagacat atgtgactca acaattaatt 24601 agagctgcag aaatcagagc ttctgctaat cttgctgcta ctaaaatgtc agagtgtgta 24661 cttggacaat caaaaagagt tgatttttgt ggaaagggct atcatcttat gtccttccct 24721 cagtcagcac ctcatggtgt agtcttcttg catgtgactt atgtccctgc acaagaaaag 24781 aacttcacaa ctgctcctgc catttgtcat gatggaaaag cacactttcc tcgtgaaggt 24841 gtctttgttt caaatggcac acactggttt gtaacacaaa ggaattttta tgaaccacaa 24901 atcattacta cagacaacac atttgtgtct ggtaactgtg atgttgtaat aggaattgtc 24961 aacaacacag tttatgatcc tttgcaacct gaattagact cattcaagga ggagttagat 25021 aaatatttta agaatcatac atcaccagat gttgatttag gtgacatctc tggcattaat 25081 gcttcagttg taaacattca aaaagaaatt gaccgcctca atgaggttgc caagaattta 25141 aatgaatctc tcatcgatct ccaagaactt ggaaagtatg agcagtatat aaaatggcca 25201 tggtacattt ggctaggttt tatagctggc ttgattgcca tagtaatggt gacaattatg 25261 ctttgctgta tgaccagttg ctgtagttgt ctcaagggct gttgttcttg tggatcctgc 25321 tgcaaatttg atgaagacga ctctgagcca gtgctcaaag gagtcaaatt acattacaca 25381 taa
Нуклеотидная последовательность изолята SARS-CoV2 2019-nCoV WHU01, полный геном. Регистрационный номер Genbank MN988668.1. SEQ ID NO: 46	1 ttaaaggttt ataccttccc aggtaacaaa ccaaccaact ttcgatctct tgtagatctg 61 ttctctaaac gaactttaaa atctgtgtgg ctgtcactcg gctgcatgct tagtgcactc 121 acgcagtata attaataact aattactgtc gttgacagga cacgagtaac tcgtctatct 181 tctgcaggct gcttacggtt tcgtccgtgt tgcagccgat catcagcaca tctaggtttc 241 gtccgggtgt gaccgaaagg taagatggag agccttgtcc ctggtttcaa cgagaaaaca 301 cacgtccaac tcagtttgcc tgttttacag gttcgcgacg tgctcgtacg tggctttgga 361 gactccgtgg aggaggtctt atcagaggca cgtcaacatc ttaaagatgg cacttgtggc 421 ttagtagaag ttgaaaaagg cgttttgcct caacttgaac agccctatgt gttcatcaaa 481 cgttcggatg ctcgaactgc acctcatggt catgttatgg ttgagctggt agcagaactc 541 gaaggcattc agtacggtcg tagtggtgag acacttggtg tccttgtccc tcatgtgggc 601 gaaataccag tggcttaccg caaggttctt cttcgtaaga acggtaataa aggagctggt 661 ggccatagtt acggcgccga tctaaagtca tttgacttag gcgacgagct tggcactgat 721 ccttatgaag attttcaaga aaactggaac actaaacata gcagtggtgt tacccgtgaa 781 ctcatgcgtg agcttaacgg aggggcatac actcgctatg tcgataacaa cttctgtggc 841 cctgatggct accctcttga gtgcattaaa gaccttctag cacgtgctgg taaagcttca 901 tgcactttgt ccgaacaact ggactttatt gacactaaga ggggtgtata ctgctgccgt 961 gaacatgagc atgaaattgc ttggtacacg gaacgttctg aaaagagcta tgaattgcag 1021 acacctttg aaattaaatt ggcaaagaaa tttgacacct tcaatgggga atgtccaaat 1081 tttgtatttc ccttaaattc cataatcaag actattcaac caagggttga aaagaaaaag 1141 cttgatggct ttatgggtag aattcgatct gtctatccag ttgcgtcacc aaatgaatgc

	1201 aaccaaatgt gcctttcaac tctcatgaag tgtgatcatt gtggtgaaac ttcatggcag 1261 acgggcgatt ttgttaaagc cacttgcgaa ttttgtggca ctgagaattt gactaaagaa 1321 ggtgccacta cttgtggtta cttaccccaa aatgctgttg ttaaaattta ttgtccagca 1381 tgtcacaatt cagaagtagg acctgagcat agtcttgccg aataccataa tgaatctggc 1441 ttgaaaacca ttcttcgtaa gggtggtcgc actattgcct ttggaggctg tgtgttctct 1501 tatgttggtt gccataacaa gtgtgcctat tgggttccac gtgctagcgc taacataggt 1561 tgtaaccata caggtgttgt tggagaaggt tccgaaggtc ttaatgacaa ccttcttgaa 1621 atactccaaa aagagaaagt caacatcaat attgttggtg actttaaact taatgaagag 1681 atcgccatta ttttggcatc tttttctgct tccacaagtg cttttgtgga aactgtgaaa 1741 ggtttggatt ataaagcatt caaacaaatt gttgaatcct gtggtaattt taaagttaca 1801 aaaggaaaag ctaaaaaagg tgcctggaat attggtgaac agaaatcaat actgagtcct 1861 ctttatgcat ttgcatcaga ggctgctcgt gttgtacgat caattttctc ccgcactctt 1921 gaaactgctc aaaattctgt gcgtgtttta cagaaggccg ctataacaat actagatgga 1981 atttcacagt attcactgag actcattgat gctatgatgt tcacatctga tttggctact 2041 aacaatctag ttgtaatggc ctacattaca ggtggtgttg ttcagttgac ttcgcagtgg 2101 ctaactaaca tctttggcac tgtttatgaa aaactcaaac ccgtccttga ttggcttgaa 2161 gagaagttta aggaaggtgt agagtttctt agagacggtt gggaaattgt taaatttatc 2221 tcaacctgtg cttgtgaaat tgtcggtgga caaattgtca cctgtgcaaa ggaaattaag 2281 gagagtgttc agacattctt taagcttgta aataaatttt tggctttgtg tgctgactct 2341 atcattattg gtggagctaa acttaaagcc ttgaatttag gtgaaacatt tgtcacgcac 2401 tcaaagggat tgtacagaaa gtgtgttaaa tccagagaag aaactggcct actcatgcct 2461 ctaaaagccc caaaagaaat tatcttctta gagggagaaa cacttcccac agaagtgtta 2521 acagaggaag ttgtcttgaa aactggtgat ttacaaccat tagaacaacc tactagtgaa 2581 gctgttgaag ctccattggt tggtacacca gtttgtatta acgggcttat gttgctcgaa 2641 atcaaagaca cagaaaagta ctgtgccctt gcacctaata tgatggtaac aaacaatacc 2701 ttcacactca aaggcggtgc accaacaaag gttacttttg gtgatgacac tgtgatagaa 2761 gtgcaaggtt acaagagtgt gaatatcact tttgaacttg atgaaaggat tgataaagta 2821 cttaatgaga agtgctctgc ctatacagtt gaactcggta cagaagtaaa tgagttcgcc 2881 tgtgttgtgg cagatgctgt cataaaaact ttgcaaccag tatctgaatt acttacacca 2941 ctgggcattg atttagatga gtggagtatg gctacatact acttatttga tgagtctggt 3001 gagtttaaat tggcttcaca tatgtattgt tctttctacc ctccagatga ggatgaagaa 3061 gaaggtgatt gtgaagaaga agagtttgag ccatcaactc aatatgagta tggtactgaa 3121 gatgattacc aaggtaaacc tttggaattt ggtgccactt ctgctgctct tcaacctgaa 3181 gaagagcaag aagaagattg gttagatgat gatagtcaac aaactgttgg tcaacaagac 3241 ggcagtgagg acaatcagac aactactatt caaacaattg ttgaggttca acctcaatta

	3301 gagatggaac ttacaccagt tgttcagact attgaagtga atagttttag tggttattta
	3361 aaacttactg acaatgtata cattaaaaat gcagacattg tggaagaagc taaaaaggta
	3421 aaaccaacag tggttgttaa tgcagccaat gtttacctta aacatggagg aggtgttgca
	3481 ggagccttaa ataaggctac taacaatgcc atgcaagttg aatctgatga ttacatagct
	3541 actaatggac cacttaaagt gggtggtagt tgtgttttaa gcggacacaa tcttgctaaa
	3601 cactgtcttc atgttgtcgg cccaaatgtt aacaaaggtg aagacattca acttcttaag
	3661 agtgcttatg aaaattttaa tcagcacgaa gttctacttg caccattatt atcagctggt
	3721 atttttggtg ctgaccctat acattcttta agagtttgtg tagatactgt tcgcacaaat
	3781 gtctacttag ctgtctttga taaaaatctc tatgacaaac ttgtttcaag ctttttggaa
	3841 atgaagagtg aaaagcaagt tgaacaaaag atcgctgaga ttcctaaaga ggaagttaag
	3901 ccatttataa ctgaaagtaa accttcagtt gaacagagaa aacaagatga taagaaaatc
	3961 aaagcttgtg ttgaagaagt tacaacaact ctggaagaaa ctaagttcct cacagaaaac
	4021 ttgttacttt atattgacat taatggcaat cttcatccag attctgccac tcttgttagt
	4081 gacattgaca tcactttctt aaagaaagat gctccatata tagtgggtga tgttgttcaa
	4141 gagggtgttt taactgctgt ggttatacct actaaaaagg ctggtggcac tactgaaatg
	4201 ctagcgaaag ctttgagaaa agtgccaaca gacaattata taaccactta cccgggtcag
	4261 ggtttaaatg gttacactgt agaggaggca aagacagtgc ttaaaaagtg taaaagtgcc
	4321 ttttacattc taccatctat tatctctaat gagaagcaag aaattcttgg aactgtttct
	4381 tggaatttgc gagaaatgct tgcacatgca gaagaaacac gcaaattaat gcctgtctgt
	4441 gtggaaacta aagccatagt ttcaactata cagcgtaaat ataagggtat taaaatacaa
	4501 gagggtgtgg ttgattatgg tgctagattt tacttttaca ccagtaaaac aactgtagcg
	4561 tcacttatca acacacttaa cgatctaaat gaaactcttg ttacaatgcc acttggctat
	4621 gtaacacatg gcttaaattt ggaagaagct gctcggtata tgagatctct caaagtgcca
	4681 gctacagttt ctgtttcttc acctgatgct gttacagcgt ataatggtta tcttacttct
	4741 tcttctaaaa cacctgaaga acattttatt gaaaccatct cacttgctgg ttcctataaa
	4801 gattggtcct attctggaca atctacacaa ctaggtatag aatttcttaa gagaggtgat
	4861 aaaagtgtat attacactag taatcctacc acattccacc tagatggtga agttatcacc
	4921 tttgacaatc ttaagacact tctttctttg agagaagtga ggactattaa ggtgtttaca
	4981 acagtagaca acattaacct ccacacgcaa gttgtggaca tgtcaatgac atatggacaa
	5041 cagtttggtc caacttattt ggatggagct gatgttacta aaataaaacc tcataattca
	5101 catgaaggta aaacatttta tgttttacct aatgatgaca ctctacgtgt tgaggctttt
	5161 gagtactacc acacaactga tcctagtttt ctgggtaggt acatgtcagc attaaatcac
	5221 actaaaaagt ggaaataccc acaagttaat ggtttaactt ctattaaatg ggcagataac
	5281 aactgttatc ttgccactgc attgttaaca ctccaacaaa tagagttgaa gtttaatcca
	5341 cctgctctac aagatgctta ttacagagca agggctggtg aagctgctaa cttttgtgca

	5401 cttatcttag cctactgtaa taagacagta ggtgagttag gtgatgttag agaaacaatg 5461 agttacttgt ttcaacatgc caatttagat tcttgcaaaa gagtcttgaa cgtggtgtgt 5521 aaaacttgtg gacaacagca gacaaccctt aagggtgtag aagctgttat gtacatgggc 5581 acactttctt atgaacaatt taagaaaggt gttcagatac cttgtacgtg tggtaaacaa 5641 gctacaaaat atctagtaca acaggagtca ccttttgtta tgatgtcagc accacctgct 5701 cagtatgaac ttaagcatgg tacatttact tgtgctagtg agtacactgg taattaccag 5761 tgtggtcact ataaacatat aacttctaaa gaaactttgt attgcataga cggtgcttta 5821 cttacaaagt cctcagaata caaaggtcct attacggatg ttttctacaa agaaaacagt 5881 tacacaacaa ccataaaacc agttacttat aaattggatg gtgttgtttg tacagaaatt 5941 gaccctaagt tggacaatta ttataagaaa gacaattctt atttcacaga gcaaccaatt 6001 gatcttgtac caaaccaacc atatccaaac gcaagcttcg ataatttaa gtttgtatgt 6061 gataatatca aatttgctga tgatttaaac cagttaactg gttataagaa acctgcttca 6121 agagagctta aagttacatt tttccctgac ttaaatggtg atgtggtggc tattgattat 6181 aaacactaca caccctcttt taagaaagga gctaaattgt tacataaacc tattgtttgg 6241 catgttaaca atgcaactaa taaagccacg tataaaccaa atacctggtg tatacgttgt 6301 ctttggagca caaaaccagt tgaaacatca aattcgtttg atgtactgaa gtcagaggac 6361 gcgcagggaa tggataatct tgcctgcgaa gatctaaaac cagtctctga agaagtagtg 6421 gaaaatccta ccatacagaa agacgttctt gagtgtaatg tgaaaactac cgaagttgta 6481 ggagacatta tacttaaacc agcaaataat agtttaaaaa ttacagaaga ggttggccac 6541 acagatctaa tggctgctta tgtagacaat tctagtctta ctattaagaa acctaatgaa 6601 ttatctagag tattaggttt gaaaaccctt gctactcatg gtttagctgc tgttaatagt 6661 gtcccttggg atactatagc taattatgct aagccttttc ttaacaaagt tgttagtaca 6721 actactaaca tagttacacg gtgtttaaac cgtgtttgta ctaattatat gccttatttc 6781 tttactttat tgctacaatt gtgtactttt actagaagta caaattctag aattaaagca 6841 tctatgccga ctactatagc aaagaatact gttaagagtg tcggtaaatt ttgtctagag 6901 gcttcattta attatttgaa gtcacctaat ttttctaaac tgataaatat tataatttgg 6961 tttttactat taagtgtttg cctaggttct ttaatctact caaccgctgc tttaggtgtt 7021 ttaatgtcta atttaggcat gccttcttac tgtactggtt acagagaagg ctatttgaac 7081 tctactaatg tcactattgc aacctactgt actggttcta taccttgtag tgtttgtctt 7141 agtggtttag attctttaga cacctatcct tctttagaaa ctatacaaat taccatttca 7201 tcttttaaat gggatttaac tgcttttggc ttagttgcag agtggttttt ggcatatatt 7261 cttttcacta ggtttttcta tgtacttgga ttggctgcaa tcatgcaatt gtttttcagc 7321 tattttgcag tacattttat tagtaattct tggcttatgt ggttaataat taatcttgta 7381 caaatggccc cgatttcagc tatggttaga atgtacatct tctttgcatc attttattat 7441 gtatggaaaa gttatgtgca tgttgtagac ggttgtaatt catcaacttg tatgatgtgt

	7501 tacaaacgta atagagcaac aagagtcgaa tgtacaacta ttgttaatgg tgttagaagg 7561 tccttttatg tctatgctaa tggaggtaaa ggcttttgca aactacacaa ttggaattgt 7621 gttaattgtg atacattctg tgctggtagt acatttatta gtgatgaagt tgcgagagac 7681 ttgtcactac agtttaaaag accaataaat cctactgacc agtcttctta catcgttgat 7741 agtgttacag tgaagaatgg ttccatccat ctttactttg ataaagctgg tcaaaagact 7801 tatgaaagac attctctctc tcattttgtt aacttagaca acctgagagc taataacact 7861 aaaggttcat tgcctattaa tgttatagtt tttgatggta aatcaaaatg tgaagaatca 7921 tctgcaaaat cagcgtctgt ttactacagt cagcttatgt gtcaacctat actgttacta 7981 gatcaggcat tagtgtctga tgttggtgat agtgcggaag ttgcagttaa aatgtttgat 8041 gcttacgtta atacgttttc atcaactttt aacgtaccaa tggaaaaact caaaacacta 8101 gttgcaactg cagaagctga acttgcaaag aatgtgtcct tagacaatgt cttatctact 8161 tttatttcag cagctcggca agggtttgtt gattcagatg tagaaactaa agatgttgtt 8221 gaatgtctta aattgtcaca tcaatctgac atagaagtta ctggcgatag ttgtaataac 8281 tatatgctca cctataacaa agttgaaaac atgacacccc gtgaccttgg tgcttgtatt 8341 gactgtagtg cgcgtcatat taatgcgcag gtagcaaaaa gtcacaacat tgctttgata 8401 tggaacgtta aagatttcat gtcattgtct gaacaactac gaaaacaaat acgtagtgct 8461 gctaaaaaga ataacttacc ttttaagttg acatgtgcaa ctactagaca agttgttaat 8521 gttgtaacaa caaagatagc acttaagggt ggtaaaattg ttaataattg gttgaagcag 8581 ttaattaaag ttacacttgt gttccttttt gttgctgcta ttttctattt aataacacct 8641 gttcatgtca tgtctaaaca tactgacttt tcaagtgaaa tcataggata caaggctatt 8701 gatggtggtg tcactcgtga catagcatct acagatactt gttttgctaa caaacatgct 8761 gattttgaca catggtttag ccagcgtggt ggtagttata ctaatgacaa agcttgccca 8821 ttgattgctg cagtcataac aagagaagtg ggttttgtcg tgcctggttt gcctggcacg 8881 atattacgca caactaatgg tgacttttg catttcttac ctagagtttt tagtgcagtt 8941 ggtaacatct gttacacacc atcaaaactt atagagtaca ctgactttgc aacatcagct 9001 tgtgttttgg ctgctgaatg tacaattttt aaagatgctt ctggtaagcc agtaccatat 9061 tgttatgata ccaatgtact agaaggttct gttgcttatg aaagtttacg ccctgacaca 9121 cgttatgtgc tcatggatgg ctctattatt caatttccta acacctacct tgaaggttct 9181 gttagagtgg taacaacttt tgattctgag tactgtaggc acggcacttg tgaaagatca 9241 gaagctggtg tttgtgtatc tactagtggt agatgggtac ttaacaatga ttattacaga 9301 tctttaccag gagttttctg tggtgtagat gctgtaaatt tacttactaa tatgtttaca 9361 ccactaattc aacctattgg tgctttggac atatcagcat ctatagtagc tggtggtatt 9421 gtagctatcg tagtaacatg ccttgcctac tattttatga ggtttagaag agcttttggt 9481 gaatacagtc atgtagttgc ctttaatact ttactattcc ttatgtcatt cactgtactc 9541 tgtttaacac cagtttactc attcttacct ggtgtttatt ctgttattta cttgtacttg

	9601 acattttatc ttactaatga tgtttctttt ttagcacata ttcagtggat ggttatgttc
	9661 acacctttag tacctttctg gataacaatt gcttatatca tttgtatttc cacaaagcat
	9721 ttctattggt tctttagtaa ttacctaaag agacgtgtag tctttaatgg tgtttccttt
	9781 agtacttttg aagaagctgc gctgtgcacc tttttgttaa ataaagaaat gtatctaaag
	9841 ttgcgtagtg atgtgctatt acctcttacg caatataata gatacttagc tctttataat
	9901 aagtacaagt attttagtgg agcaatggat acaactagct acagagaagc tgcttgttgt
	9961 catctcgcaa aggctctcaa tgacttcagt aactcaggtt ctgatgttct ttaccaacca
	10021 ccacaaacct ctatcacctc agctgttttg cagagtggtt ttagaaaaat ggcattccca
	10081 tctggtaaag ttgagggttg tatggtacaa gtaacttgtg gtacaactac acttaacggt
	10141 ctttggcttg atgacgtagt ttactgtcca agacatgtga tctgcacctc tgaagacatg
	10201 cttaacccta attatgaaga tttactcatt cgtaagtcta atcataattt cttggtacag
	10261 gctggtaatg ttcaactcag ggttattgga cattctatgc aaaattgtgt acttaagctt
	10321 aaggttgata cagccaatcc taagacacct aagtataagt ttgttcgcat tcaaccagga
	10381 cagacttttt cagtgttagc ttgttacaat ggttcaccat ctggtgttta ccaatgtgct
	10441 atgaggccca atttcactat taagggttca ttccttaatg gttcatgtgg tagtgttggt
	10501 tttaacatag attatgactg tgtctctttt tgttacatgc accatatgga attaccaact
	10561 ggagttcatg ctggcacaga cttagaaggt aacttttatg gacctttttgt tgacaggcaa
	10621 acagcacaag cagctggtac ggacacaact attacagtta atgttttagc ttggttgtac
	10681 gctgctgtta taaatggaga caggtggttt ctcaatcgat ttaccacaac tcttaatgac
	10741 tttaaccttg tggctatgaa gtacaattat gaacctctaa cacaagacca tgttgacata
	10801 ctaggacctc tttctgctca aactggaatt gccgttttag atatgtgtgc ttcattaaaa
	10861 gaattactgc aaaatggtat gaatggacgt accatattgg gtagtgcttt attagaagat
	10921 gaatttacac cttttgatgt tgttagacaa tgctcaggtg ttactttcca aagtgcagtg
	10981 aaaagaacaa tcaagggtac acaccactgg ttgttactca caattttgac ttcactttta
	11041 gttttagtcc agagtactca atggtctttg ttctttttt tgtatgaaaa tgccttttta
	11101 ccttttgcta tgggtattat tgctatgtct gcttttgcaa tgatgtttgt caaacataag
	11161 catgcatttc tctgtttgtt tttgttacct tctcttgcca ctgtagctta ttttaatatg
	11221 gtctatatgc ctgctagttg ggtgatgcgt attatgacat ggttggatat ggttgatact
	11281 agtttgtctg gttttaagct aaaagactgt gttatgtatg catcagctgt agtgttacta
	11341 atccttatga cagcaagaac tgtgtatgat gatggtgcta ggagagtgtg gacacttatg
	11401 aatgtcttga cactcgttta taaagtttat tatggtaatg ctttagatca agccatttcc
	11461 atgtgggctc ttataatctc tgttacttct aactactcag gtgtagttac aactgtcatg
	11521 tttttggcca gaggtattgt ttttatgtgt gttgagtatt gccctatttt cttcataact
	11581 ggtaatacac ttcagtgtat aatgctagtt tattgtttct taggctattt ttgtacttgt
	11641 tactttggcc tcttttgttt actcaaccgc tactttagac tgactcttgg tgtttatgat

	11701 tacttagttt ctacacagga gtttagatat atgaattcac agggactact cccacccaag
	11761 aatagcatag atgccttcaa actcaacatt aaattgttgg gtgttggtgg caaaccttgt
	11821 atcaaagtag ccactgtaca gtctaaaatg tcagatgtaa agtgcacatc agtagtctta
	11881 ctctcagttt tgcaacaact cagagtagaa tcatcatcta aattgtgggc tcaatgtgtc
	11941 cagttacaca atgacattct cttagctaaa gatactactg aagcctttga aaaaatggtt
	12001 tcactacttt ctgttttgct ttccatgcag ggtgctgtag acataaacaa gctttgtgaa
	12061 gaaatgctgg acaacagggc aaccttacaa gctatagcct cagagtttag ttcccttcca
	12121 tcatatgcag cttttgctac tgctcaagaa gcttatgagc aggctgttgc taatggtgat
	12181 tctgaagttg ttcttaaaaa gttgaagaag tctttgaatg tggctaaatc tgaatttgac
	12241 cgtgatgcag ccatgcaacg taagttggaa aagatggctg atcaagctat gacccaaatg
	12301 tataaacagg ctagatctga ggacaagagg gcaaaagtta ctagtgctat gcagacaatg
	12361 cttttcacta tgcttagaaa gttggataat gatgcactca acaacattat caacaatgca
	12421 agagatggtt gtgttccctt gaacataata cctcttacaa cagcagccaa actaatggtt
	12481 gtcataccag actataacac atataaaaat acgtgtgatg gtacaacatt tacttatgca
	12541 tcagcattgt gggaaatcca acaggttgta gatgcagata gtaaaattgt tcaacttagt
	12601 gaaattagta tggacaattc acctaattta gcatggcctc ttattgtaac agctttaagg
	12661 gccaattctg ctgtcaaatt acagaataat gagcttagtc ctgttgcact acgacagatg
	12721 tcttgtgctg ccggtactac acaaactgct tgcactgatg acaatgcgtt agcttactac
	12781 aacacaacaa agggaggtag gtttgtactt gcactgttat ccgatttaca ggatttgaaa
	12841 tgggctagat tccctaagag tgatggaact ggtactatct atacagaact ggaaccacct
	12901 tgtaggtttg ttacagacac acctaaaggt cctaaagtga agtatttata ctttattaaa
	12961 ggattaaaca acctaaatag aggtatggta cttggtagtt tagctgccac agtacgtcta
	13021 caagctggta atgcaacaga agtgcctgcc aattcaactg tattatcttt ctgtgctttt
	13081 gctgtagatg ctgctaaagc ttacaaagat tatctagcta gtgggggaca accaatcact
	13141 aattgtgtta agatgttgtg tacacacact ggtactggtc aggcaataac agttacaccg
	13201 gaagccaata tggatcaaga atcctttggt ggtgcatcgt gttgtctgta ctgccgttgc
	13261 cacatagatc atccaaatcc taaaggattt tgtgacttaa aaggtaagta tgtacaaata
	13321 cctacaactt gtgctaatga ccctgtgggt tttacactta aaaacacagt ctgtaccgtc
	13381 tgcggtatgt ggaaaggtta tggctgtagt tgtgatcaac tccgcgaacc catgcttcag
	13441 tcagctgatg cacaatcgtt tttaaacggg tttgcggtgt aagtgcagcc cgtcttacac
	13501 cgtgcggcac aggcactagt actgatgtcg tatacagggc ttttgacatc tacaatgata
	13561 aagtagctgg ttttgctaaa ttcctaaaaa ctaattgttg tcgcttccaa gaaaaggacg
	13621 aagatgacaa tttaattgat tcttactttg tagttaagag acacactttc tctaactacc
	13681 aacatgaaga aacaatttat aatttactta aggattgtcc agctgttgct aaacatgact
	13741 tctttaagtt tagaatagac ggtgacatgg taccacatat atcacgtcaa cgtcttacta

	13801 aatacacaat ggcagacctc gtctatgctt taaggcattt tgatgaaggt aattgtgaca 13861 cattaaaaga aatacttgtc acatacaatt gttgtgatga tgattatttc aataaaaagg 13921 actggtatga ttttgtagaa aacccagata tattacgcgt atacgccaac ttaggtgaac 13981 gtgtacgcca agctttgtta aaaacagtac aattctgtga tgccatgcga aatgctggta 14041 ttgttggtgt actgacatta gataatcaag atctcaatgg taactggtat gatttcggtg 14101 atttcataca aaccacgcca ggtagtggag ttcctgttgt agattcttat tattcattgt 14161 taatgcctat attaaccttg accagggctt taactgcaga gtcacatgtt gacactgact 14221 taacaaagcc ttacattaag tgggatttgt taaaatatga cttcacggaa gagaggttaa 14281 aactctttga ccgttatttt aaatattggg atcagacata ccacccaaat tgtgttaact 14341 gtttggatga cagatgcatt ctgcattgtg caaactttaa tgttttattc tctacagtgt 14401 tcccacctac aagttttgga ccactagtga gaaaaatatt tgttgatggt gttccatttg 14461 tagtttcaac tggataccac ttcagagagc taggtgttgt acataatcag gatgtaaact 14521 tacatagctc tagacttagt tttaaggaat tacttgtgta tgctgctgac cctgctatgc 14581 acgctgcttc tggtaatcta ttactagata aacgcactac gtgcttttca gtagctgcac 14641 ttactaacaa tgttgctttt caaactgtca aacccggtaa ttttaacaaa gacttctatg 14701 actttgctgt gtctaagggt ttctttaagg aaggaagttc tgttgaatta aaacacttct 14761 tctttgctca ggatggtaat gctgctatca gcgattatga ctactatcgt tataatctac 14821 caacaatgtg tgatatcaga caactactat ttgtagttga agttgttgat aagtactttg 14881 attgttacga tggtggctgt attaatgcta accaagtcat cgtcaacaac ctagacaaat 14941 cagctggttt tccatttaat aaatggggta aggctagact ttattatgat tcaatgagtt 15001 atgaggatca agatgcactt ttcgcatata caaaacgtaa tgtcatccct actataactc 15061 aaatgaatct taagtatgcc attagtgcaa agaatagagc tcgcaccgta gctggtgtct 15121 ctatctgtag tactatgacc aatagacagt ttcatcaaaa attattgaaa tcaatagccg 15181 ccactagagg agctactgta gtaattggaa caagcaaatt ctatggtggt tggcacaaca 15241 tgttaaaaac tgtttatagt gatgtagaaa accctcacct tatgggttgg gattatccta 15301 aatgtgatag agccatgcct aacatgctta gaattatggc ctcacttgtt cttgctcgca 15361 aacatacaac gtgttgtagc ttgtcacacc gtttctatag attagctaat gagtgtgctc 15421 aagtattgag tgaaatggtc atgtgtggcg gttcactata tgttaaacca ggtggaacct 15481 catcaggaga tgccacaact gcttatgcta atagtgtttt taacatttgt caagctgtca 15541 cggccaatgt taatgcactt ttatctactg atggtaacaa aattgccgat aagtatgtcc 15601 gcaatttaca acacagactt tatgagtgtc tctatagaaa tagagatgtt gacacagact 15661 ttgtgaatga gttttacgca tatttgcgta aacatttctc aatgatgata ctctctgacg 15721 atgctgttgt gtgtttcaat agcacttatg catctcaagg tctagtggct agcataaaga 15781 actttaagtc agttctttat tatcaaaaca atgtttttat gtctgaagca aaatgttgga 15841 ctgagactga ccttactaaa ggacctcatg aattttgctc tcaacataca atgctagtta

	15901 aacagggtga tgattatgtg taccttcctt acccagatcc atcaagaatc ctaggggccg
	15961 gctgttttgt agatgatatc gtaaaaacag atggtacact tatgattgaa cggttcgtgt
	16021 ctttagctat agatgcttac ccacttacta aacatcctaa tcaggagtat gctgatgtct
	16081 ttcatttgta cttacaatac ataagaaagc tacatgatga gttaacagga cacatgttag
	16141 acatgtattc tgttatgctt actaatgata acacttcaag gtattgggaa cctgagtttt
	16201 atgaggctat gtacacaccg catacagtct tacaggctgt tggggcttgt gttctttgca
	16261 attcacagac ttcattaaga tgtggtgctt gcatacgtag accattctta tgttgtaaat
	16321 gctgttacga ccatgtcata tcaacatcac ataaattagt cttgtctgtt aatccgtatg
	16381 tttgcaatgc tccaggttgt gatgtcacag atgtgactca actttactta ggaggtatga
	16441 gctattattg taaatcacat aaaccaccca ttagttttcc attgtgtgct aatggacaag
	16501 tttttggttt atataaaaat acatgtgttg gtagcgataa tgttactgac tttaatgcaa
	16561 ttgcaacatg tgactggaca aatgctggtg attacatttt agctaacacc tgtactgaaa
	16621 gactcaagct ttttgcagca gaaacgctca aagctactga ggagacattt aaactgtctt
	16681 atggtattgc tactgtacgt gaagtgctgt ctgacagaga attacatctt tcatgggaag
	16741 ttggtaaacc tagaccacca cttaaccgaa attatgtctt tactggttat cgtgtaacta
	16801 aaaacagtaa agtacaaata ggagagtaca cctttgaaaa aggtgactat ggtgatgctg
	16861 ttgtttaccg aggtacaaca acttacaaat taaatgttgg tgattatttt gtgctgacat
	16921 cacatacagt aatgccatta agtgcaccta cactagtgcc acaagagcac tatgttagaa
	16981 ttactggctt atacccaaca ctcaatatct cagatgagtt ttctagcaat gttgcaaatt
	17041 atcaaaaggt tggtatgcaa aagtattcta cactccaggg accacctggt actggtaaga
	17101 gtcattttgc tattggccta gctctctact acccttctgc tcgcatagtg tatacagctt
	17161 gctctcatgc cgctgttgat gcactatgtg agaaggcatt aaaatatttg cctatagata
	17221 aatgtagtag aattatacct gcacgtgctc gtgtagagtg ttttgataaa ttcaaagtga
	17281 attcaacatt agaacagtat gtcttttgta ctgtaaatgc attgcctgag acgacagcag
	17341 atatagttgt ctttgatgaa atttcaatgg ccacaaatta tgatttgagt gttgtcaatg
	17401 ccagattacg tgctaagcac tatgtgtaca ttggcgaccc tgctcaatta cctgcaccac
	17461 gcacattgct aactaagggc acactagaac cagaatattt caattcagtg tgtagactta
	17521 tgaaaactat aggtccagac atgttcctcg gaacttgtcg gcgttgtcct gctgaaattg
	17581 ttgacactgt gagtgctttg gtttatgata ataagcttaa agcacataaa gacaaatcag
	17641 ctcaatgctt taaaatgttt tataagggtg ttatcacgca tgatgtttca tctgcaatta
	17701 acaggccaca aataggcgtg gtaagagaat tccttacacg taaccctgct tggagaaaag
	17761 ctgtctttat ttcaccttat aattcacaga atgctgtagc ctcaaagatt ttgggactac
	17821 caactcaaac tgttgattca tcacagggct cagaatatga ctatgtcata ttcactcaaa
	17881 ccactgaaac agctcactct tgtaatgtaa acagatttaa tgttgctatt accagagcaa
	17941 aagtaggcat actttgcata atgtctgata gagaccttta tgacaagttg caatttacaa

	18001 gtcttgaaat tccacgtagg aatgtggcaa ctttacaagc tgaaaatgta acaggactct 18061 ttaaagattg tagtaaggta atcactgggt tacatcctac acaggcacct acacacctca 18121 gtgttgacac taaattcaaa actgaaggtt tatgtgttga catacctggc atacctaagg 18181 acatgaccta tagaagactc atctctatga tgggttttaa aatgaattat caagttaatg 18241 gttaccctaa catgtttatc acccgcgaag aagctataag acatgtacgt gcatggattg 18301 gcttcgatgt cgaggggtgt catgctacta gagaagctgt tggtaccaat ttacctttac 18361 agctaggttt ttctacaggt gttaacctag ttgctgtacc tacaggttat gttgatacac 18421 ctaataatac agatttttcc agagttagtg ctaaaccacc gcctggagat caatttaaac 18481 acctcatacc acttatgtac aaaggacttc cttggaatgt agtgcgtata aagattgtac 18541 aaatgttaag tgacacactt aaaaatctct ctgacagagt cgtatttgtc ttatgggcac 18601 atggctttga gttgacatct atgaagtatt ttgtgaaaat aggacctgag cgcacctgtt 18661 gtctatgtga tagacgtgcc acatgctttt ccactgcttc agacacttat gcctgttggc 18721 atcattctat tggatttgat tacgtctata atccgtttat gattgatgtt caacaatggg 18781 gttttacagg taacctacaa agcaaccatg atctgtattg tcaagtccat ggtaatgcac 18841 atgtagctag ttgtgatgca atcatgacta ggtgtctagc tgtccacgag tgctttgtta 18901 agcgtgttga ctggactatt gaatatccta taattggtga tgaactgaag attaatgcgg 18961 cttgtagaaa ggttcaacac atggttgtta aagctgcatt attagcagac aaattcccag 19021 ttcttcacga cattggtaac cctaaagcta ttaagtgtgt acctcaagct gatgtagaat 19081 ggaagttcta tgatgcacag ccttgtagtg acaaagctta taaaatagaa gaattattct 19141 attcttatgc cacacattct gacaaattca cagatggtgt atgcctattt tggaattgca 19201 atgtcgatag atatcctgct aattccattg tttgtagatt tgacactaga gtgctatcta 19261 accttaactt gcctggttgt gatggtggca gtttgtatgt aaataaacat gcattccaca 19321 caccagcttt tgataaaagt gcttttgtta atttaaaaca attaccattt ttctattact 19381 ctgacagtcc atgtgagtct catggaaaac aagtagtgtc agatatagat tatgtaccac 19441 taaagtctgc tacgtgtata acacgttgca atttaggtgg tgctgtctgt agacatcatg 19501 ctaatgagta cagattgtat ctcgatgctt ataacatgat gatctcagct ggctttagct 19561 tgtgggttta caaacaattt gatacttata acctctggaa cacttttaca agacttcaga 19621 gtttagaaaa tgtggctttt aatgttgtaa ataagggaca ctttgatgga caacagggtg 19681 aagtaccagt ttctatcatt aataacactg tttacacaaa agttgatggt gttgatgtag 19741 aattgtttga aaataaaaca acattacctg ttaatgtagc atttgagctt tgggctaagc 19801 gcaacattaa accagtacca gaggtgaaaa tactcaataa tttgggtgtg gacattgctg 19861 ctaatactgt gatctgggac tacaaaagag atgctccagc acatatatct actattggtg 19921 tttgttctat gactgacata gccaagaaac caactgaaac gatttgtgca ccactcactg 19981 tctttttga tggtagagtt gatggtcaag tagacttatt tagaaatgcc cgtaatggtg 20041 ttcttattac agaaggtagt gttaaaggtt tacaaccatc tgtaggtccc aaacaagcta

	20101 gtcttaatgg agtcacatta attggagaag ccgtaaaaac acagttcaat tattataaga
	20161 aagttgatgg tgttgtccaa caattacctg aaacttactt tactcagagt agaaatttac
	20221 aagaatttaa acccaggagt caaatggaaa ttgatttctt agaattagct atggatgaat
	20281 tcattgaacg gtataaatta gaaggctatg ccttcgaaca tatcgtttat ggagatttta
	20341 gtcatagtca gttaggtggt ttacatctac tgattggact agctaaacgt tttaaggaat
	20401 cacctttga attagaagat tttattccta tggacagtac agttaaaaac tatttcataa
	20461 cagatgcgca aacaggttca tctaagtgtg tgtgttctgt tattgattta ttacttgatg
	20521 attttgttga aataataaaa tcccaagatt tatctgtagt ttctaaggtt gtcaaagtga
	20581 ctattgacta tacagaaatt tcatttatgc tttggtgtaa agatggccat gtagaaacat
	20641 tttacccaaa attacaatct agtcaagcgt ggcaaccggg tgttgctatg cctaatcttt
	20701 acaaaatgca aagaatgcta ttagaaaagt gtgaccttca aaattatggt gatagtgcaa
	20761 cattacctaa aggcataatg atgaatgtcg caaaatatac tcaactgtgt caatatttaa
	20821 acacattaac attagctgta ccctataata tgagagttat acattttggt gctggttctg
	20881 ataaaggagt tgcaccaggt acagctgttt taagacagtg gttgcctacg ggtacgctgc
	20941 ttgtcgattc agatcttaat gactttgtct ctgatgcaga ttcaactttg attggtgatt
	21001 gtgcaactgt acatacagct aataaatggg atctcattat tagtgatatg tacgacccta
	21061 agactaaaaa tgttacaaaa gaaaatgact ctaaagaggg ttttttcact tacatttgtg
	21121 ggtttataca acaaaagcta gctcttggag gttccgtggc tataaagata acagaacatt
	21181 cttggaatgc tgatctttat aagctcatgg gacacttcgc atggtggaca gcctttgtta
	21241 ctaatgtgaa tgcgtcatca tctgaagcat ttttaattgg atgtaattat cttggcaaac
	21301 cacgcgaaca aatagatggt tatgtcatgc atgcaaatta catattttgg aggaatacaa
	21361 atccaattca gttgtcttcc tattctttat ttgacatgag taaatttccc cttaaattaa
	21421 ggggtactgc tgttatgtct ttaaaagaag gtcaaatcaa tgatatgatt ttatctcttc
	21481 ttagtaaagg tagacttata attagagaaa acaacagagt tgttatttct agtgatgttc
	21541 ttgttaacaa ctaaacgaac aatgtttgtt tttcttgttt tattgccact agtctctagt
	21601 cagtgtgtta atcttacaac cagaactcaa ttacccccctg catacactaa ttctttcaca
	21661 cgtggtgttt attaccctga caaagttttc agatcctcag ttttacattc aactcaggac
	21721 ttgttcttac ctttcttttc caatgttact tggttccatg ctatacatgt ctctgggacc
	21781 aatggtacta agaggtttga taaccctgtc ctaccattta atgatggtgt ttattttgct
	21841 tccactgaga agtctaacat aataagaggc tggatttttg gtactacttt agattcgaag
	21901 acccagtccc tacttattgt taataacgct actaatgttg ttattaaagt ctgtgaattt
	21961 caattttgta atgatccatt tttgggtgtt tattaccaca aaaacaacaa aagttggatg
	22021 gaaagtgagt tcagagttta ttctagtgcg aataattgca cttttgaata tgtctctcag
	22081 ccttttctta tggaccttga aggaaaacag ggtaatttca aaaatcttag ggaatttgtg
	22141 tttaagaata ttgatggtta ttttaaaata tattctaagc acacgcctat taatttagtg

	22201 cgtgatctcc ctcagggttt ttcggcttta gaaccattgg tagatttgcc aataggtatt
	22261 aacatcacta ggtttcaaac tttacttgct ttacatagaa gttatttgac tcctggtgat
	22321 tcttcttcag gttggacagc tggtgctgca gcttattatg tgggttatct tcaacctagg
	22381 acttttctat taaaatataa tgaaaatgga accattacag atgctgtaga ctgtgcactt
	22441 gaccctctct cagaaacaaa gtgtacgttg aaatccttca ctgtagaaaa aggaatctat
	22501 caaacttcta actttagagt ccaaccaaca gaatctattg ttagatttcc taatattaca
	22561 aacttgtgcc cttttggtga agtttttaac gccaccagat ttgcatctgt ttatgcttgg
	22621 aacaggaaga gaatcagcaa ctgtgttgct gattattctg tcctatataa ttccgcatca
	22681 ttttccactt ttaagtgtta tggagtgtct cctactaaat taaatgatct ctgctttact
	22741 aatgtctatg cagattcatt tgtaattaga ggtgatgaag tcagacaaat cgctccaggg
	22801 caaactggaa agattgctga ttataattat aaattaccag atgattttac aggctgcgtt
	22861 atagcttgga attctaacaa tcttgattct aaggttggtg gtaattataa ttacctgtat
	22921 agattgttta ggaagtctaa tctcaaacct tttgagagag atatttcaac tgaaatctat
	22981 caggccggta gcacaccttg taatggtgtt gaaggtttta attgttactt tcctttacaa
	23041 tcatatggtt tccaacccac taatggtgtt ggttaccaac catacagagt agtagtactt
	23101 tcttttgaac ttctacatgc accagcaact gtttgtggac ctaaaaagtc tactaatttg
	23161 gttaaaaaca aatgtgtcaa tttcaacttc aatggtttaa caggcacagg tgttcttact
	23221 gagtctaaca aaaagtttct gcctttccaa caatttggca gagacattgc tgacactact
	23281 gatgctgtcc gtgatccaca gacacttgag attcttgaca ttacaccatg ttcttttggt
	23341 ggtgtcagtg ttataacacc aggaacaaat acttctaacc aggttgctgt tctttatcag
	23401 gatgttaact gcacagaagt ccctgttgct attcatgcag atcaacttac tcctacttgg
	23461 cgtgtttatt ctacaggttc taatgttttt caaacacgtg caggctgttt aataggggct
	23521 gaacatgtca acaactcata tgagtgtgac atacccattg gtgcaggtat atgcgctagt
	23581 tatcagactc agactaattc tcctcggcgg gcacgtagtg tagctagtca atccatcatt
	23641 gcctacacta tgtcacttgg tgcagaaaat tcagttgctt actctaataa ctctattgcc
	23701 atacccacaa attttactat tagtgttacc acagaaattc taccagtgtc tatgaccaag
	23761 acatcagtag attgtacaat gtacatttgt ggtgattcaa ctgaatgcag caatcttttg
	23821 ttgcaatatg gcagtttttg tacacaatta aaccgtgctt taactggaat agctgttgaa
	23881 caagacaaaa acacccaaga agtttttgca caagtcaaac aaatttacaa aacaccacca
	23941 attaaagatt ttggtggttt taatttttca caaatattac cagatccatc aaaaccaagc
	24001 aagaggtcat ttattgaaga tctacttttc aacaaagtga cacttgcaga tgctggcttc
	24061 atcaaacaat atggtgattg ccttggtgat attgctgcta gagacctcat ttgtgcacaa
	24121 aagtttaacg gccttactgt tttgccacct ttgctcacag atgaaatgat tgctcaatac
	24181 acttctgcac tgttagcggg tacaatcact tctggttgga cctttggtgc aggtgctgca
	24241 ttacaaatac catttgctat gcaaatggct tataggttta atggtattgg agttacacag

	24301 aatgttctct atgagaacca aaaattgatt gccaaccaat ttaatagtgc tattggcaaa
	24361 attcaagact cactttcttc cacagcaagt gcacttggaa aacttcaaga tgtggtcaac
	24421 caaaatgcac aagctttaaa cacgcttgtt aaacaactta gctccaattt tggtgcaatt
	24481 tcaagtgttt taaatgatat cctttcacgt cttgacaaag ttgaggctga agtgcaaatt
	24541 gataggttga tcacaggcag acttcaaagt ttgcagacat atgtgactca acaattaatt
	24601 agagctgcag aaatcagagc ttctgctaat cttgctgcta ctaaaatgtc agagtgtgta
	24661 cttggacaat caaaaagagt tgatttttgt ggaaagggct atcatcttat gtccttccct
	24721 cagtcagcac ctcatggtgt agtcttcttg catgtgactt atgtccctgc acaagaaaag
	24781 aacttcacaa ctgctcctgc catttgtcat gatggaaaag cacactttcc tcgtgaaggt
	24841 gtctttgttt caaatggcac acactggttt gtaacacaaa ggaattttta tgaaccacaa
	24901 atcattacta cagacaacac atttgtgtct ggtaactgtg atgttgtaat aggaattgtc
	24961 aacaacacag tttatgatcc tttgcaacct gaattagact cattcaagga ggagttagat
	25021 aaatatttta agaatcatac atcaccagat gttgatttag gtgacatctc tggcattaat
	25081 gcttcagttg taaacattca aaaagaaatt gaccgcctca atgaggttgc caagaattta
	25141 aatgaatctc tcatcgatct ccaagaactt ggaaagtatg agcagtatat aaaatggcca
	25201 tggtacattt ggctaggttt tatagctggc ttgattgcca tagtaatggt gacaattatg
	25261 ctttgctgta tgaccagttg ctgtagttgt ctcaagggct gttgttcttg tggatcctgc
	25321 tgcaaatttg atgaagacga ctctgagcca gtgctcaaag gagtcaaatt acattacaca
	25381 taaacgaact tatggatttg tttatgagaa tcttcacaat tggaactgta actttgaagc
	25441 aaggtgaaat caaggatgct actccttcag attttgttcg cgctactgca acgataccga
	25501 tacaagcctc actcctttc ggatggctta ttgttggcgt tgcacttctt gctgtttttc
	25561 agagcgcttc caaaatcata accctcaaaa agagatggca actagcactc tccaagggtg
	25621 ttcactttgt ttgcaacttg ctgttgttgt ttgtaacagt ttactcacac cttttgctcg
	25681 ttgctgctgg ccttgaagcc ccttttctct atctttatgc tttagtctac ttcttgcaga
	25741 gtataaactt tgtaagaata ataatgaggc tttggctttg ctggaaatgc cgttccaaaa
	25801 acccattact ttatgatgcc aactattttc tttgctggca tactaattgt tacgactatt
	25861 gtatacctta caatagtgta acttcttcaa ttgtcattac ttcaggtgat ggcacaacaa
	25921 gtcctatttc tgaacatgac taccagattg gtggttatac tgaaaaatgg gaatctggag
	25981 taaaagactg tgttgtatta cacagttact tcacttcaga ctattaccag ctgtactcaa
	26041 ctcaattgag tacagacact ggtgttgaac atgttacctt cttcatctac aataaaattg
	26101 ttgatgagcc tgaagaacat gtccaaattc acacaatcga cggttcatcc ggagttgtta
	26161 atccagtaat ggaaccaatt tatgatgaac cgacgacgac tactagcgtg cctttgtaag
	26221 cacaagctga tgagtacgaa cttatgtact cattcgtttc ggaagagaca ggtacgttaa
	26281 tagttaatag cgtacttctt tttcttgctt tcgtggtatt cttgctagtt acactagcca
	26341 tccttactgc gcttcgattg tgtgcgtact gctgcaatat tgttaacgtg agtcttgtaa

	26401 aaccttcttt ttacgtttac tctcgtgtta aaaatctgaa ttcttctaga gttcctgatc
	26461 ttctggtcta aacgaactaa atattatatt agtttttctg tttggaactt taattttagc
	26521 catggcagat tccaacggta ctattaccgt tgaagagctt aaaaagctcc ttgaacaatg
	26581 gaacctagta ataggtttcc tattccttac atggatttgt cttctacaat ttgcctatgc
	26641 caacaggaat aggtttttgt atataattaa gttaattttc ctctggctgt tatggccagt
	26701 aactttagct tgttttgtgc ttgctgctgt ttacagaata aattggatca ccggtggaat
	26761 tgctatcgca atggcttgtc ttgtaggctt gatgtggctc agctacttca ttgcttcttt
	26821 cagactgttt gcgcgtacgc gttccatgtg gtcattcaat ccagaaacta acattcttct
	26881 caacgtgcca ctccatggca ctattctgac cagaccgctt ctagaaagtg aactcgtaat
	26941 cggagctgtg atccttcgtg gacatcttcg tattgctgga caccatctag gacgctgtga
	27001 catcaaggac ctgcctaaag aaatcactgt tgctacatca cgaacgcttt cttattacaa
	27061 attgggagct tcgcagcgtg tagcaggtga ctcaggtttt gctgcataca gtcgctacag
	27121 gattggcaac tataaattaa acacagacca ttccagtagc agtgacaata ttgctttgct
	27181 tgtacagtaa gtgacaacag atgtttcatc tcgttgactt tcaggttact atagcagaga
	27241 tattactaat tattatgagg acttttaaag tttccatttg gaatcttgat tacatcataa
	27301 acctcataat taaaaattta tctaagtcac taactgagaa taaatattct caattagatg
	27361 aagagcaacc aatggagatt gattaaacga acatgaaaat tattcttttc ttggcactga
	27421 taacactcgc tacttgtgag ctttatcact accaagagtg tgttagaggt acaacagtac
	27481 ttttaaaaga accttgctct tctggaacat acgagggcaa ttcaccattt catcctctag
	27541 ctgataacaa atttgcactg acttgcttta gcactcaatt tgcttttgct tgtcctgacg
	27601 gcgtaaaaca cgtctatcag ttacgtgcca gatcagtttc acctaaactg ttcatcagac
	27661 aagaggaagt tcaagaactt tactctccaa tttttcttat tgttgcggca atagtgttta
	27721 taacactttg cttcacactc aaaagaaaga cagaatgatt gaactttcat taattgactt
	27781 ctatttgtgc tttttagcct ttctgctatt ccttgtttta attatgctta ttatcttttg
	27841 gttctcactt gaactgcaag atcataatga aacttgtcac gcctaaacga acatgaaatt
	27901 tcttgttttc ttaggaatca tcacaactgt agctgcattt caccaagaat gtagtttaca
	27961 gtcatgtact caacatcaac catatgtagt tgatgacccg tgtcctattc acttctattc
	28021 taaatggtat attagagtag gagctagaaa atcagcacct ttaattgaat tgtgcgtgga
	28081 tgaggctggt tctaaatcac ccattcagta catcgatatc ggtaattata cagtttcctg
	28141 tttacctttt acaattaatt gccaggaacc taaattgggt agtcttgtag tgcgttgttc
	28201 gttctatgaa gacttttag agtatcatga cgttcgtgtt gttttagatt tcatctaaac
	28261 gaacaaacta aaatgtctga taatggaccc caaaatcagc gaaatgcacc ccgcattacg
	28321 tttggtggac cctcagattc aactggcagt aaccagaatg gagaacgcag tggggcgcga
	28381 tcaaaacaac gtcggcccca aggtttaccc aataatactg cgtcttggtt caccgctctc
	28441 actcaacatg gcaaggaaga ccttaaattc cctcgaggac aaggcgttcc aattaacacc

	28501 aatagcagtc cagatgacca aattggctac taccgaagag ctaccagacg aattcgtggt 28561 ggtgacggta aaatgaaaga tctcagtcca agatggtatt tctactacct aggaactggg 28621 ccagaagctg gacttcccta tggtgctaac aaagacggca tcatatgggt tgcaactgag 28681 ggagccttga atacaccaaa agatcacatt ggcacccgca atcctgctaa caatgctgca 28741 atcgtgctac aacttcctca aggaacaaca ttgccaaaag gcttctacgc agaagggagc 28801 agaggcggca gtcaagcctc ttctcgttcc tcatcacgta gtcgcaacag ttcaagaaat 28861 tcaactccag gcagcagtag gggaacttct cctgctagaa tggctggcaa tggcggtgat 28921 gctgctcttg ctttgctgct gcttgacaga ttgaaccagc ttgagagcaa aatgtctggt 28981 aaaggccaac aacaacaagg ccaaactgtc actaagaaat ctgctgctga ggcttctaag 29041 aagcctcggc aaaaacgtac tgccactaaa gcatacaatg taacacaagc tttcggcaga 29101 cgtggtccag aacaaaccca aggaaatttt ggggaccagg aactaatcag acaaggaact 29161 gattacaaac attggccgca aattgcacaa tttgccccca gcgcttcagc gttcttcgga 29221 atgtcgcgca ttggcatgga agtcacacct tcgggaacgt ggttgaccta cacaggtgcc 29281 atcaaattgg atgacaaaga tccaaatttc aaagatcaag tcattttgct gaataagcat 29341 attgacgcat acaaaacatt cccaccaaca gagcctaaaa aggacaaaaa gaagaaggct 29401 gatgaaactc aagccttacc gcagagacag aagaaacagc aaactgtgac tcttcttcct 29461 gctgcagatt tggatgattt ctccaaacaa ttgcaacaat ccatgagcag tgctgactca 29521 actcaggcct aaactcatgc agaccacaca aggcagatgg gctatataaa cgttttcgct 29581 tttccgttta cgatatatag tctactcttg tgcagaatga attctcgtaa ctacatagca 29641 caagtagatg tagttaactt taatctcaca tagcaatctt taatcagtgt gtaacattag 29701 ggaggacttg aaagagccac acattttca ccgaggccac gcggagtacg atcgagtgta 29761 cagtgaacaa tgctagggag agctgcctat atggaagagc cctaatgtgt aaaattaatt 29821 ttagtagtgc tatccccatg tgattttaat agcttcttag gagaatgaca aaaaaaaaaa 29881 a
Аминокислотная последовательность S-белка из записи под регистрационным номером MN988668. SEQ ID NO: 47	1 MFVFLVLLPL VSSQCVNLTT RTQLPPAYTN SFTRGVYYPD KVFRSSVLHS TQDLFLPFFS NVTWFHAIHV SGTNGTKRFD 81 NPVLPFNDGV YFASTEKSNI IRGWIFGTTL DSKTQSLLIV NNATNVVIKV CEFQFCNDPF LGVYYHKNNK SWMESEFRVY 161 SSANNCTFEY VSQPFLMDLE GKQGNFKNLR EFVFKNIDGY FKIYSKHTPI NLVRDLPQGF SALEPLVDLP IGINITRFQT 241 LLALHRSYLT PGDSSSGWTA GAAAYYVGYL QPRTFLLKYN ENGTITDAVD CALDPLSETK CTLKSFTVEK GIYQTSNFRV 321 QPTESIVRFP NITNLCPFGE VFNATRFASV YAWNRKRISN CVADYSVLYN SASFSTFKCY GVSPTKLNDL CFTNVYADSF 401 VIRGDEVRQI APGQTGKIAD YNYKLPDDFT GCVIAWNSNN

	LDSKVGGNYN YLYRLFRKSN LKPFERDIST EIYQAGSTPC 481 NGVEGFNCYF PLQSYGFQPT NGVGYQPYRV VVLSFELLHA PATVCGPKKS TNLVKNKCVN FNFNGLTGTG VLTESNKKFL 561 PFQQFGRDIA DTTDAVRDPQ TLEILDITPC SFGGVSVITP GTNTSNQVAV LYQDVNCTEV PVAIHADQLT PTWRVYSTGS 641 NVFQTRAGCL IGAEHVNNSY ECDIPIGAGI CASYQTQTNS PRRARSVASQ SIIAYTMSLG AENSVAYSNN SIAIPTNFTI 721 SVTTEILPVS MTKTSVDCTM YICGDSTECS NLLLQYGSFC TQLNRALTGI AVEQDKNTQE VFAQVKQIYK TPPIKDFGGF 801 NFSQILPDPS KPSKRSFIED LLFNKVTLAD AGFIKQYGDC LGDIAARDLI CAQKFNGLTV LPPLLTDEMI AQYTSALLAG 881 TITSGWTFGA GAALQIPFAM QMAYRFNGIG VTQNVLYENQ KLIANQFNSA IGKIQDSLSS TASALGKLQD VVNQNAQALN 961 TLVKQLSSNF GAISSVLNDI LSRLDKVEAE VQIDRLITGR LQSLQTYVTQ QLIRAAEIRA SANLAATKMS ECVLGQSKRV 1041 DFCGKGYHLM SFPQSAPHGV VFLHVTYVPA QEKNFTTAPA ICHDGKAHFP REGVFVSNGT HWFVTQRNFY EPQIITTDNT 1121 FVSGNCDVVI GIVNNTVYDP LQPELDSFKE ELDKYFKNHT SPDVDLGDIS GINASVVNIQ KEIDRLNEVA KNLNESLIDL 1201 QELGKYEQYI KWPWYIWLGF IAGLIAIVMV TIMLCCMTSC CSCLKGCCSC GSCCKFDEDD SEPVLKGVKL HYT
Аминокислотная последовательность M-белка из записи под регистрационным номером MN988668. SEQ ID NO: 48	MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFLTWICLLQFAYANRNR FLYIIKLIFLWLLWPVTLACFVLAAVYRINWITGGIAIAMACLVGLM WLSYFIASFRL FARTRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESELVIGAVILRGHLR IAGHHLGRCD IKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKL NTDHSSSSDNIA LLVQ
Аминокислотная последовательность N-белка из записи под	MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQG LPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPINTNSSPDDQIGYYRRA TRRIRGGDGKMK DLSPRWYFYYLGTGPEAGLPYGANKDGIIWVATEGALNTPKDHIG TRNPANNAAIVLQ

регистрационным номером MN988668. SEQ ID NO: 49	LPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRSRNSSRNSTPGSSRGTSP ARMAGNGGDAA LALLLLDRLNQLESKMSGKGQQQQGQTVTKKSAAEASKKPRQKR TATKAYNVTQAFGR RGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGM EVTPSGTWLTYT GAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADETQ ALPQRQKKQQTV TLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA
Нуклеотидная последовательность SARS-CoV-2-Spike-co (кодон-оптимизированного для экспрессии VACV). SEQ ID NO: 50	aGCGGCCGCaaaattgaaattttatttttttttttggaatataaataATGTTCGTGTTCCTA GTCCTACTACCGCTAGT CTCTTCCCAGTGTGTAAACCTAACAACGAGAACACAACTACCAC CGGCGTACACCAATTCTTTCACAAGAGGAGTATATT ACCCGGACAAGGTGTTCAGATCCTCCGTACTACATTCTACCCAG GACCTATTCCTACCGTTCTTCTCTAACGTAACATGG TTCCACGCGATCCATGTCTCTGGAACAAACGGAACGAAGAGATT CGATAACCCGGTCTTGCCGTTCAACGATGGTGTATA CTTTGCGTCCACCGAGAAGTCCAACATCATCAGAGGATGGATCT TCGGAACCACCTTGGATTCTAAGACCCAGTCCTTGC TAATCGTCAACAACGCGACCAACGTCGTCATCAAAGTCTGCGAA TTCCAGTTCTGTAACGACCCGTTTTTGGGAGTCTAC TACCACAAGAACAACAAGTCCTGGATGGAATCCGAGTTCAGAG TCTACTCTTCCGCGAACAACTGCACCTTCGAATATGT ATCTCAGCCGTTCCTAATGGACCTAGAGGGAAAGCAGGGAAAC TTCAAGAACCTAAGAGAGTTCGTATTCAAGAACATCG ACGGATACTTCAAGATCTACTCCAAGCACACCCCGATCAACCTA GTTAGAGATCTACCGCAAGGATTCTCTGCGCTAGAA CCGTTAGTAGATTTGCCGATCGGAATCAACATCACCAGATTCCA GACACTACTAGCGCTACACAGATCTTACCTAACGCC GGGAGATTCTTCTTCTGGATGGACTGCTGGTGCTGCGGCTTATTA TGTAGGATACCTACAGCCGAGAACCTTCCTATTGA AGTACAACGAAAACGGAACCATCACCGATGCCGTAGATTGTGCT CTAGATCCGCTATCCGAAACGAAGTGCACCCTAAAG TCTTTCACCGTCGAGAAGGGAATCTACCAGACCTCCAACTTTAG AGTACAGCCGACCGAATCCATCGTCAGATTTCCGAA

	CATCACGAACCTATGTCCGTTCGGAGAAGTGTTCAACGCGACAA
	GATTTGCGTCTGTCTATGCGTGGAACAGAAAAAGAA
	TCAGTAACTGCGTCGCGGACTACTCCGTCCTATACAACTCTGCCT
	CTTTCTCCACGTTCAAATGCTACGGTGTATCCCCG
	ACAAAGCTAAACGATCTATGCTTCACCAACGTCTACGCGGACTC
	CTTCGTAATCAGAGGAGATGAAGTTAGACAGATTGC
	GCCGGGACAAACTGGAAAGATCGCGGATTATAACTACAAGCTA
	CCGGACGACTTCACCGGATGTGTAATTGCGTGGAATT
	CGAACAACCTAGACTCCAAAGTCGGAGGAAACTACAACTACTT
	GTACAGACTATTCAGAAAGTCCAACCTAAAGCCGTTC
	GAGAGAGACATCTCCACCGAAATCTATCAGGCTGGATCTACACC
	GTGTAATGGTGTCGAAGGATTCAACTGCTACTTCCC
	GCTACAGTCTTACGGATTTCAACCGACAAACGGTGTAGGATATC
	AGCCGTACAGAGTCGTCGTACTATCCTTCGAACTAC
	TACATGCTCCGGCGACAGTATGTGGACCGAAAAAGTCTACCAAC
	CTAGTCAAGAACAAATGCGTCAACTTTAACTTCAAC
	GGACTAACCGGAACCGGTGTCCTAACCGAATCTAACAAGAAGTT
	TCTACCGTTCCAGCAGTTCGGAAGAGATATCGCGGA
	TACAACAGACGCTGTCAGAGATCCGCAAACCTTGGAGATCCTAG
	ATATCACCCCGTGTTCTTTCGGTGGTGTCTCTGTAA
	TTACTCCGGGAACGAACACCTCCAATCAAGTAGCGGTACTATAC
	CAGGACGTGAACTGTACAGAAGTACCGGTAGCTATT
	CACGCGGATCAACTAACACCAACTTGGAGAGTGTACTCCACCGG
	ATCTAACGTATTCCAAACAAGAGCGGGATGTCTAAT
	CGGAGCGGAACACGTAAACAACTCCTACGAATGTGATATCCCG
	ATTGGAGCGGGAATCTGTGCGTCTTACCAAACACAAA
	CAAACTCCCCGAGAAGAGCGAGATCTGTAGCCTCTCAATCTATT
	ATCGCCTACACCATGTCCTTGGGAGCCGAAAATTCT
	GTCGCGTACTCCAACAATTCTATCGCGATCCCGACAAACTTCAC
	CATCTCTGTAACAACCGAGATCCTACCGGTGTCTAT
	GACCAAGACATCTGTCGATTGCACCATGTACATCTGCGGAGATT
	CCACCGAGTGCTCCAACCTACTACTACAGTACGGAT
	CTTTCTGTACCCAGCTAAACAGAGCGTTGACTGGAATCGCTGTA
	GAGCAGGATAAGAACACCCAAGAGGTATTCGCGCAA
	GTCAAGCAGATCTATAAGACTCCGCCGATCAAGGACTTCGGAGG

	TTTTAACTTCTCTCAGATCTTGCCGGATCCGTCCAA ACCGTCTAAGAGATCTTTCATCGAGGACCTACTATTCAACAAAG TCACCCTAGCTGACGCGGGATTCATCAAACAATACG GAGATTGCTTGGGAGACATTGCGGCGAGAGATCTAATTTGCGCG CAGAAGTTTAACGGATTGACAGTACTACCGCCGCTA CTAACCGATGAGATGATTGCGCAGTACACGTCTGCTCTATTGGC GGGAACAATTACAAGTGGATGGACATTTGGAGCCGG TGCCGCTCTACAAATTCCGTTTGCTATGCAAATGGCGTACAGAT TCAACGGAATCGGAGTAACCCAGAACGTCTTGTACG AGAACCAGAAGCTAATCGCGAACCAGTTCAATTCCGCGATCGG AAAGATCCAGGACAGTCTATCTTCTACTGCTTCGGCG TTGGGAAAGCTACAGGATGTAGTAAATCAAAACGCGCAGGCGC TAAACACCTTGGTCAAGCAACTATCCTCTAACTTCGG AGCGATCTCGTCCGTCCTAAACGACATCTTATCCAGACTAGATA AGGTCGAAGCGGAGGTCCAGATCGATAGACTAATCA CTGGAAGATTGCAGTCCCTACAGACCTACGTAACACAGCAACTA ATTAGAGCGGCGGAGATTAGAGCCTCTGCTAATCTA GCTGCGACCAAGATGTCCGAATGTGTCTTGGGACAATCCAAGAG AGTCGACTTTTGCGGAAAGGGATACCACCTAATGTC TTTTCCACAATCTGCGCCGCATGGTGTCGTATTCCTACATGTAAC ATATGTGCCGGCGCAAGAAAAGAACTTTACAACAG CTCCAGCGATCTGCCATGATGGAAAAGCTCATTTTCCGAGAGAG GGAGTCTTTGTCTCTAACGGAACTCATTGGTTCGTC ACCCAGAGAAACTTTTACGAGCCGCAGATCATCACCACCGACAA CACATTTGTTTCGGGAAACTGCGACGTGGTCATCGG AATCGTAAACAATACCGTCTACGATCCGTTGCAGCCGGAACTAG ACTCCTTCAAAGAAGAGTTGGACAAGTACTTTAAGA ACCACACCTCTCCGGATGTCGACTTGGGAGATATTTCTGGAATC AACGCGTCCGTCGTCAACATCCAGAAAGAAATCGAT AGATTGAACGAGGTCGCGAAGAACTTGAACGAGTCCCTAATCG ACCTACAAGAGCTAGGAAAATACGAGCAGTACATCAA GTGGCCGTGGTACATTTGGCTAGGATTCATTGCTGGACTAATTG CGATCGTCATGGTCACCATCATGCTATGCTGTATGA CCTCCTGTTGCTCCTGTCTAAAGGGATGTTGTTCCTGCGGATCCT GTTGCAAGTTCGATGAAGATGATAGTGAACCGGTC

	CTAAAGGGTGTCAAGCTACACTACACATAAAAGCTT
Нуклеотидная последовательность целевого локуса гена HPXV095 для инсерции спайкового белка SARS-CoV-2. SEQ ID NO: 51	tttggctagtcaagatgatgaatcttcattatctgatatattgcaaatcactcaatatctagactttctgttattatta t tgatccaatcaaaaaataaattagaagccgtgggtcattgttatgaatctctttcagaggaatacagacaattg acaaaa ttcacagactttcaagattttaaaaaaactgtttaacaaggtccctattgttacagatggaagggtcaaacttaat aaagg atatttgttcgactttgtgattagtttgatgcgattcaaaaaagaatcctctctagctaccaccgcaatagatcct atta gatacatagatcctcgtcgtgatatcgcattttctaacgtgatggatatattaaagttgaataaagtgaacaata attaa ttctttattgtcatcGGATCCCACgatGTGctaGACtctctcGTCtacGCGGCCGCaA ctgagagaccAAGCTTGTCGAC tattatatttttttatctaaaaaactaaaaataaacattgattaaatttttaatataatacttaaaaatggatgttgtgtc g ttagataaaccgtttatgtattttgaggaaattgataatgagttagattacgaaccagaaagtgcaaatgaggt cgcaaa aaaactaccgtatcaaggacagttaaaactattactaggagaattatttttttcttagtaagttacagcgacacg gtatat tagatggtgccaccgtagtgtatataggatcggctcctggtacacatatacgttatttgagagatcatttctata attta ggaatgattatcaaatggatgctaattgacggacgccatcatgatcctattctaaatggattgcgtgatgtgac tctagt
Нуклеотидная последовательность целевого локуса гена HPXV200 для инсерции спайкового белка SARS-COV-2. SEQ ID NO: 52	gagtattctaggtgtttctatagaatgtaagaagtcAtcgacattacttacttttttgaccgtgcgtaaaatgac Ccgag tatttaatagatttccagatatggcttattatcgaggagactgtttaaaagccgtttatgtaacaatgacttataaa aat actaaaactggagagactgattacacgtacctctctaatgggggttgcctgcatactatcgtaatggggtcg atggttga ttattgattagtatattccttattctttttattcacacaaaaagaacatttttataaacatgaaaccactgtctaaatg t aattatgatcttgatttatagatgaagatcagcctttagaggattttaaccagtatgtttaatatgaaaaaaataa acat aacatattttgagattaagcgctattgtgcttaattattttgctctataaactgaatatatagccacaattattgacg gg

	cttgtttatgaccggcaatcGGATCCCACgatGTGctaGACtctctcGTCtacGCGGCC GCaActgagagaccAAGCTTG TCGACtaaaatagtttaactcttttaaaaccagtttggtactggaatttcagttcattactcgttgagaaattg atgatt tttttaaaatgatattacttttatatgcttgcatcgcagaatgatattcacaagtattattaaaaatgagtatcggta gt tacattaccatatcatccatgctcatatggatctccatccattatataatcaatgatacatgtattaaaatactttcc ga ataagtcttttaaatattgtattaattatgaaaaactatgctatgcgagtatgatgcaaagatgtttaatgatacga tac tagattttatctctagcgagagatgtcgttagaatcatttatcataactacgtttaataataattcatcaacgaata tcg ataacatgtgtcatttatactttaaatacgttaaagtctgtccgtcttctctattgtttagactgtttgtagaatgctg t gatataaacaaactagtagaaggta
Нуклеотидная последовательность SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (регистрационный номер NC_045512.2). SEQ ID NO: 53	1 attaaaggtt tataccttcc caggtaacaa accaaccaac tttcgatctc ttgtagatct 61 gttctctaaa cgaactttaa aatctgtgtg gctgtcactc ggctgcatgc ttagtgcact 121 cacgcagtat aattaataac taattactgt cgttgacagg acacgagtaa ctcgtctatc 181 ttctgcaggc tgcttacggt ttcgtccgtg ttgcagccga tcatcagcac atctaggttt 241 cgtccgggtg tgaccgaaag gtaagatgga gagccttgtc cctggtttca acgagaaaac 301 acacgtccaa ctcagtttgc ctgttttaca ggttcgcgac gtgctcgtac gtggctttgg 361 agactccgtg gaggaggtct tatcagaggc acgtcaacat cttaaagatg gcacttgtgg 421 cttagtagaa gttgaaaaag gcgttttgcc tcaacttgaa cagccctatg tgttcatcaa 481 acgttcggat gctcgaactg cacctcatgg tcatgttatg gttgagctgg tagcagaact 541 cgaaggcatt cagtacggtc gtagtggtga gacacttggt gtccttgtcc ctcatgtggg 601 cgaaatacca gtggcttacc gcaaggttct tcttcgtaag aacggtaata aaggagctgg 661 tggccatagt tacggcgccg atctaaagtc atttgactta ggcgacgagc ttggcactga 721 tccttatgaa gattttcaag aaaactggaa cactaaacat agcagtggtg ttacccgtga 781 actcatgcgt gagcttaacg gaggggcata cactcgctat gtcgataaca acttctgtgg 841 ccctgatggc taccctcttg agtgcattaa agaccttcta gcacgtgctg gtaaagcttc 901 atgcactttg tccgaacaac tggactttat tgacactaag aggggtgtat actgctgccg 961 tgaacatgag catgaaattg cttggtacac ggaacgttct gaaaagagct atgaattgca 1021 gacacctttt gaaattaaat tggcaaagaa atttgacacc ttcaatgggg aatgtccaaa 1081 ttttgtattt cccttaaatt ccataatcaa gactattcaa ccaagggttg aaaagaaaaa 1141 gcttgatggc tttatgggta gaattcgatc tgtctatcca gttgcgtcac caaatgaatg

	1201 caaccaaatg tgcctttcaa ctctcatgaa gtgtgatcat tgtggtgaaa cttcatggca 1261 gacgggcgat tttgttaaag ccacttgcga attttgtggc actgagaatt tgactaaaga 1321 aggtgccact acttgtggtt acttacccca aaatgctgtt gttaaaattt attgtccagc 1381 atgtcacaat tcagaagtag gacctgagca tagtcttgcc gaataccata atgaatctgg 1441 cttgaaaacc attcttcgta agggtggtcg cactattgcc tttggaggct gtgtgttctc 1501 ttatgttggt tgccataaca agtgtgccta ttgggttcca cgtgctagcg ctaacatagg 1561 ttgtaaccat acaggtgttg ttggagaagg ttccgaaggt cttaatgaca accttcttga 1621 aatactccaa aaagagaaag tcaacatcaa tattgttggt gactttaaac ttaatgaaga 1681 gatcgccatt attttggcat ctttttctgc ttccacaagt gcttttgtgg aaactgtgaa 1741 aggtttggat tataaagcat tcaaacaaat tgttgaatcc tgtggtaatt ttaaagttac 1801 aaaaggaaaa gctaaaaaag gtgcctggaa tattggtgaa cagaaatcaa tactgagtcc 1861 tctttatgca tttgcatcag aggctgctcg tgttgtacga tcaattttct cccgcactct 1921 tgaaactgct caaaattctg tgcgtgtttt acagaaggcc gctataacaa tactagatgg 1981 aatttcacag tattcactga gactcattga tgctatgatg ttcacatctg atttggctac 2041 taacaatcta gttgtaatgg cctacattac aggtggtgtt gttcagttga cttcgcagtg 2101 gctaactaac atctttggca ctgtttatga aaaactcaaa cccgtccttg attggcttga 2161 agagaagttt aaggaaggtg tagagtttct tagagacggt tgggaaattg ttaaatttat 2221 ctcaacctgt gcttgtgaaa ttgtcggtgg acaaattgtc acctgtgcaa aggaaattaa 2281 ggagagtgtt cagacattct ttaagcttgt aaataaattt ttggctttgt gtgctgactc 2341 tatcattatt ggtggagcta aacttaaagc cttgaattta ggtgaaacat ttgtcacgca 2401 ctcaaaggga ttgtacagaa agtgtgttaa atccagagaa gaaactggcc tactcatgcc 2461 tctaaaagcc ccaaaagaaa ttatcttctt agagggagaa acacttccca cagaagtgtt 2521 aacagaggaa gttgtcttga aaactggtga tttacaacca ttagaacaac ctactagtga 2581 agctgttgaa gctccattgg ttggtacacc agtttgtatt aacgggctta tgttgctcga 2641 aatcaaagac acagaaaagt actgtgccct tgcacctaat atgatggtaa caaacaatac 2701 cttcacactc aaaggcggtg caccaacaaa ggttactttt ggtgatgaca ctgtgataga 2761 agtgcaaggt tacaagagtg tgaatatcac ttttgaactt gatgaaagga ttgataaagt 2821 acttaatgag aagtgctctg cctatacagt tgaactcggt acagaagtaa atgagttcgc 2881 ctgtgttgtg gcagatgctg tcataaaaac tttgcaacca gtatctgaat tacttacacc 2941 actgggcatt gatttagatg agtggagtat ggctacatac tacttatttg atgagtctgg 3001 tgagtttaaa ttggcttcac atatgtattg ttctttctac cctccagatg aggatgaaga 3061 agaaggtgat tgtgaagaag aagagtttga gccatcaact caatatgagt atggtactga 3121 agatgattac caaggtaaac ctttggaatt tggtgccact tctgctgctc ttcaacctga 3181 agaagagcaa gaagaagatt ggttagatga tgatagtcaa caaactgttg gtcaacaaga 3241 cggcagtgag gacaatcaga caactactat tcaaacaatt gttgaggttc aacctcaatt

	3301 agagatggaa cttacaccag ttgttcagac tattgaagtg aatagtttta gtggttattt
	3361 aaaacttact gacaatgtat acattaaaaa tgcagacatt gtggaagaag ctaaaaaggt
	3421 aaaaccaaca gtggttgtta atgcagccaa tgtttacctt aaacatggag gaggtgttgc
	3481 aggagcctta aataaggcta ctaacaatgc catgcaagtt gaatctgatg attacatagc
	3541 tactaatgga ccacttaaag tgggtggtag ttgtgtttta agcggacaca atcttgctaa
	3601 acactgtctt catgttgtcg gcccaaatgt taacaaaggt gaagacattc aacttcttaa
	3661 gagtgcttat gaaaatttta atcagcacga agttctactt gcaccattat tatcagctgg
	3721 tatttttggt gctgacccta tacattcttt aagagtttgt gtagatactg ttcgcacaaa
	3781 tgtctactta gctgtctttg ataaaaatct ctatgacaaa cttgtttcaa gctttttgga
	3841 aatgaagagt gaaaagcaag ttgaacaaaa gatcgctgag attcctaaag aggaagttaa
	3901 gccatttata actgaaagta aaccttcagt tgaacagaga aaacaagatg ataagaaaat
	3961 caaagcttgt gttgaagaag ttacaacaac tctggaagaa actaagttcc tcacagaaaa
	4021 cttgttactt tatattgaca ttaatggcaa tcttcatcca gattctgcca ctcttgttag
	4081 tgacattgac atcactttct taaagaaaga tgctccatat atagtgggtg atgttgttca
	4141 agagggtgtt ttaactgctg tggttatacc tactaaaaag gctggtggca ctactgaaat
	4201 gctagcgaaa gctttgagaa aagtgccaac agacaattat ataaccactt acccgggtca
	4261 gggtttaaat ggttacactg tagaggaggc aaagacagtg cttaaaaagt gtaaaagtgc
	4321 cttttacatt ctaccatcta ttatctctaa tgagaagcaa gaaattcttg gaactgtttc
	4381 ttggaatttg cgagaaatgc ttgcacatgc agaagaaaca cgcaaattaa tgcctgtctg
	4441 tgtggaaact aaagccatag tttcaactat acagcgtaaa tataagggta ttaaaataca
	4501 agagggtgtg gttgattatg gtgctagatt ttacttttac accagtaaaa caactgtagc
	4561 gtcacttatc aacacactta acgatctaaa tgaaactctt gttacaatgc cacttggcta
	4621 tgtaacacat ggcttaaatt tggaagaagc tgctcggtat atgagatctc tcaaagtgcc
	4681 agctacagtt tctgtttctt cacctgatgc tgttacagcg tataatggtt atcttacttc
	4741 ttcttctaaa acacctgaag aacattttat tgaaaccatc tcacttgctg gttcctataa
	4801 agattggtcc tattctggac aatctacaca actaggtata gaatttctta agagaggtga
	4861 taaaagtgta tattacacta gtaatcctac cacattccac ctagatggtg aagttatcac
	4921 ctttgacaat cttaagacac ttctttcttt gagagaagtg aggactatta aggtgtttac
	4981 aacagtagac aacattaacc tccacacgca agttgtggac atgtcaatga catatggaca
	5041 acagtttggt ccaacttatt tggatggagc tgatgttact aaaataaaac ctcataattc
	5101 acatgaaggt aaaacatttt atgttttacc taatgatgac actctacgtg ttgaggcttt
	5161 tgagtactac cacacaactg atcctagttt tctgggtagg tacatgtcag cattaaatca
	5221 cactaaaaag tggaaatacc cacaagttaa tggtttaact tctattaaat gggcagataa
	5281 caactgttat cttgccactg cattgttaac actccaacaa atagagttga agtttaatcc
	5341 acctgctcta caagatgctt attacagagc aagggctggt gaagctgcta acttttgtgc

	5401 acttatctta gcctactgta ataagacagt aggtgagtta ggtgatgtta gagaaacaat
	5461 gagttacttg tttcaacatg ccaatttaga ttcttgcaaa agagtcttga acgtggtgtg
	5521 taaaacttgt ggacaacagc agacaaccct taagggtgta gaagctgtta tgtacatggg
	5581 cacactttct tatgaacaat ttaagaaagg tgttcagata ccttgtacgt gtggtaaaca
	5641 agctacaaaa tatctagtac aacaggagtc acctttgtt atgatgtcag caccacctgc
	5701 tcagtatgaa cttaagcatg gtacatttac ttgtgctagt gagtacactg gtaattacca
	5761 gtgtggtcac tataaacata taacttctaa agaaactttg tattgcatag acggtgcttt
	5821 acttacaaag tcctcagaat acaaaggtcc tattacggat gttttctaca aagaaaacag
	5881 ttacacaaca accataaaac cagttactta taaattggat ggtgttgttt gtacagaaat
	5941 tgaccctaag ttggacaatt attataagaa agacaattct tatttcacag agcaaccaat
	6001 tgatcttgta ccaaaccaac catatccaaa cgcaagcttc gataatttta agtttgtatg
	6061 tgataatatc aaatttgctg atgatttaaa ccagttaact ggttataaga aacctgcttc
	6121 aagagagctt aaagttacat ttttccctga cttaaatggt gatgtggtgg ctattgatta
	6181 taaacactac acaccctctt ttaagaaagg agctaaattg ttacataaac ctattgtttg
	6241 gcatgttaac aatgcaacta ataaagccac gtataaacca aatacctggt gtatacgttg
	6301 tctttggagc acaaaaccag ttgaaacatc aaattcgttt gatgtactga agtcagagga
	6361 cgcgcaggga atggataatc ttgcctgcga agatctaaaa ccagtctctg aagaagtagt
	6421 ggaaaatcct accatacaga aagacgttct tgagtgtaat gtgaaaacta ccgaagttgt
	6481 aggagacatt atacttaaac cagcaaataa tagtttaaaa attacagaag aggttggcca
	6541 cacagatcta atggctgctt atgtagacaa ttctagtctt actattaaga aacctaatga
	6601 attatctaga gtattaggtt tgaaaaccct tgctactcat ggtttagctg ctgttaatag
	6661 tgtcccttgg gatactatag ctaattatgc taagcctttt cttaacaaag ttgttagtac
	6721 aactactaac atagttacac ggtgtttaaa ccgtgtttgt actaattata tgccttattt
	6781 ctttacttta ttgctacaat tgtgtacttt tactagaagt acaaattcta gaattaaagc
	6841 atctatgccg actactatag caaagaatac tgttaagagt gtcggtaaat tttgtctaga
	6901 ggcttcattt aattatttga agtcacctaa tttttctaaa ctgataaata ttataatttg
	6961 gtttttacta ttaagtgttt gcctaggttc tttaatctac tcaaccgctg ctttaggtgt
	7021 tttaatgtct aatttaggca tgccttctta ctgtactggt tacagagaag gctatttgaa
	7081 ctctactaat gtcactattg caacctactg tactggttct ataccttgta gtgtttgtct
	7141 tagtggttta gattctttag acacctatcc ttctttagaa actatacaaa ttaccatttc
	7201 atcttttaaa tgggatttaa ctgcttttgg cttagttgca gagtggtttt tggcatatat
	7261 tcttttcact aggtttttct atgtacttgg attggctgca atcatgcaat tgtttttcag
	7321 ctattttgca gtacatttta ttagtaattc ttggcttatg tggttaataa ttaatcttgt
	7381 acaaatggcc ccgatttcag ctatggttag aatgtacatc ttctttgcat cattttatta
	7441 tgtatggaaa agttatgtgc atgttgtaga cggttgtaat tcatcaactt gtatgatgtg

	7501 ttacaaacgt aatagagcaa caagagtcga atgtacaact attgttaatg gtgttagaag 7561 gtccttttat gtctatgcta atggaggtaa aggcttttgc aaactacaca attggaattg 7621 tgttaattgt gatacattct gtgctggtag tacatttatt agtgatgaag ttgcgagaga 7681 cttgtcacta cagtttaaaa gaccaataaa tcctactgac cagtcttctt acatcgttga 7741 tagtgttaca gtgaagaatg gttccatcca tctttacttt gataaagctg gtcaaaagac 7801 ttatgaaaga cattctctct ctcattttgt taacttagac aacctgagag ctaataacac 7861 taaaggttca ttgcctatta atgttatagt ttttgatggt aaatcaaaat gtgaagaatc 7921 atctgcaaaa tcagcgtctg tttactacag tcagcttatg tgtcaaccta tactgttact 7981 agatcaggca ttagtgtctg atgttggtga tagtgcggaa gttgcagtta aaatgtttga 8041 tgcttacgtt aatacgtttt catcaacttt taacgtacca atggaaaaac tcaaaacact 8101 agttgcaact gcagaagctg aacttgcaaa gaatgtgtcc ttagacaatg tcttatctac 8161 ttttatttca gcagctcggc aagggtttgt tgattcagat gtagaaacta aagatgttgt 8221 tgaatgtctt aaattgtcac atcaatctga catagaagtt actggcgata gttgtaataa 8281 ctatatgctc acctataaca aagttgaaaa catgacaccc cgtgaccttg gtgcttgtat 8341 tgactgtagt gcgcgtcata ttaatgcgca ggtagcaaaa agtcacaaca ttgctttgat 8401 atggaacgtt aaagatttca tgtcattgtc tgaacaacta cgaaaacaaa tacgtagtgc 8461 tgctaaaaag aataacttac cttttaagtt gacatgtgca actactagac aagttgttaa 8521 tgttgtaaca acaaagatag cacttaaggg tggtaaaatt gttaataatt ggttgaagca 8581 gttaattaaa gttacacttg tgttcctttt tgttgctgct attttctatt taataacacc 8641 tgttcatgtc atgtctaaac atactgactt ttcaagtgaa atcataggat acaaggctat 8701 tgatggtggt gtcactcgtg acatagcatc tacagatact tgttttgcta acaaacatgc 8761 tgattttgac acatggttta gccagcgtgg tggtagttat actaatgaca aagcttgccc 8821 attgattgct gcagtcataa caagagaagt gggttttgtc gtgcctggtt tgcctggcac 8881 gatattacgc acaactaatg gtgacttttt gcatttctta cctagagttt ttagtgcagt 8941 tggtaacatc tgttacacac catcaaaact tatagagtac actgactttg caacatcagc 9001 ttgtgttttg gctgctgaat gtacaatttt taaagatgct tctggtaagc cagtaccata 9061 ttgttatgat accaatgtac tagaaggttc tgttgcttat gaaagtttac gccctgacac 9121 acgttatgtg ctcatggatg gctctattat tcaatttcct aacacctacc ttgaaggttc 9181 tgttagagtg gtaacaactt ttgattctga gtactgtagg cacggcactt gtgaaagatc 9241 agaagctggt gtttgtgtat ctactagtgg tagatgggta cttaacaatg attattacag 9301 atctttacca ggagttttct gtggtgtaga tgctgtaaat ttacttacta atatgtttac 9361 accactaatt caacctattg gtgctttgga catatcagca tctatagtag ctggtggtat 9421 tgtagctatc gtagtaacat gccttgccta ctattttatg aggtttagaa gagcttttgg 9481 tgaatacagt catgtagttg cctttaatac tttactattc cttatgtcat tcactgtact 9541 ctgtttaaca ccagtttact cattcttacc tggtgtttat tctgttattt acttgtactt

	9601 gacattttat cttactaatg atgtttcttt tttagcacat attcagtgga tggttatgtt 9661 cacaccttta gtacctttct ggataacaat tgcttatatc atttgtattt ccacaaagca 9721 tttctattgg ttctttagta attacctaaa gagacgtgta gtctttaatg gtgtttcctt 9781 tagtactttt gaagaagctg cgctgtgcac ctttttgtta aataaagaaa tgtatctaaa 9841 gttgcgtagt gatgtgctat tacctcttac gcaatataat agatacttag ctctttataa 9901 taagtacaag tattttagtg gagcaatgga tacaactagc tacagagaag ctgcttgttg 9961 tcatctcgca aaggctctca atgacttcag taactcaggt tctgatgttc tttaccaacc 10021 accacaaacc tctatcacct cagctgtttt gcagagtggt tttagaaaaa tggcattccc 10081 atctggtaaa gttgagggtt gtatggtaca agtaacttgt ggtacaacta cacttaacgg 10141 tctttggctt gatgacgtag tttactgtcc aagacatgtg atctgcacct ctgaagacat 10201 gcttaaccct aattatgaag atttactcat tcgtaagtct aatcataatt tcttggtaca 10261 ggctggtaat gttcaactca gggttattgg acattctatg caaaattgtg tacttaagct 10321 taaggttgat acagccaatc ctaagacacc taagtataag tttgttcgca ttcaaccagg 10381 acagactttt tcagtgttag cttgttacaa tggttcacca tctggtgttt accaatgtgc 10441 tatgaggccc aatttcacta ttaagggttc attccttaat ggttcatgtg gtagtgttgg 10501 ttttaacata gattatgact gtgtctcttt ttgttacatg caccatatgg aattaccaac 10561 tggagttcat gctggcacag acttagaagg taacttttat ggacctttg ttgacaggca 10621 aacagcacaa gcagctggta cggacacaac tattacagtt aatgttttag cttggttgta 10681 cgctgctgtt ataaatggag acaggtggtt tctcaatcga tttaccacaa ctcttaatga 10741 ctttaacctt gtggctatga agtacaatta tgaacctcta acacaagacc atgttgacat 10801 actaggacct ctttctgctc aaactggaat tgccgtttta gatatgtgtg cttcattaaa 10861 agaattactg caaaatggta tgaatggacg taccatattg ggtagtgctt tattagaaga 10921 tgaatttaca ccttttgatg ttgttagaca atgctcaggt gttactttcc aaagtgcagt 10981 gaaaagaaca atcaagggta cacaccactg gttgttactc acaattttga cttcactttt 11041 agttttagtc cagagtactc aatggtcttt gttctttttt ttgtatgaaa atgccttttt 11101 acctttgct atgggtatta ttgctatgtc tgcttttgca atgatgtttg tcaaacataa 11161 gcatgcattt ctctgtttgt ttttgttacc ttctcttgcc actgtagctt attttaatat 11221 ggtctatatg cctgctagtt gggtgatgcg tattatgaca tggttggata tggttgatac 11281 tagtttgtct ggttttaagc taaaagactg tgttatgtat gcatcagctg tagtgttact 11341 aatccttatg acagcaagaa ctgtgtatga tgatggtgct aggagagtgt ggacacttat 11401 gaatgtcttg acactcgttt ataaagttta ttatggtaat gctttagatc aagccatttc 11461 catgtgggct cttataatct ctgttacttc taactactca ggtgtagtta caactgtcat 11521 gtttttggcc agaggtattg tttttatgtg tgttgagtat tgccctattt tcttcataac 11581 tggtaataca cttcagtgta taatgctagt ttattgtttc ttaggctatt tttgtacttg 11641 ttactttggc ctcttttgtt tactcaaccg ctactttaga ctgactcttg gtgtttatga

	11701 ttacttagtt tctacacagg agtttagata tatgaattca cagggactac tcccacccaa
	11761 gaatagcata gatgccttca aactcaacat taaattgttg ggtgttggtg gcaaaccttg
	11821 tatcaaagta gccactgtac agtctaaaat gtcagatgta aagtgcacat cagtagtctt
	11881 actctcagtt ttgcaacaac tcagagtaga atcatcatct aaattgtggg ctcaatgtgt
	11941 ccagttacac aatgacattc tcttagctaa agatactact gaagcctttg aaaaaatggt
	12001 ttcactactt tctgttttgc tttccatgca gggtgctgta gacataaaca agctttgtga
	12061 agaaatgctg gacaacaggg caaccttaca agctatagcc tcagagttta gttcccttcc
	12121 atcatatgca gcttttgcta ctgctcaaga agcttatgag caggctgttg ctaatggtga
	12181 ttctgaagtt gttcttaaaa agttgaagaa gtctttgaat gtggctaaat ctgaatttga
	12241 ccgtgatgca gccatgcaac gtaagttgga aaagatggct gatcaagcta tgacccaaat
	12301 gtataaacag gctagatctg aggacaagag ggcaaaagtt actagtgcta tgcagacaat
	12361 gcttttcact atgcttagaa agttggataa tgatgcactc aacaacatta tcaacaatgc
	12421 aagagatggt tgtgttccct tgaacataat acctcttaca acagcagcca aactaatggt
	12481 tgtcatacca gactataaca catataaaaa tacgtgtgat ggtacaacat ttacttatgc
	12541 atcagcattg tgggaaatcc aacaggttgt agatgcagat agtaaaattg ttcaacttag
	12601 tgaaattagt atggacaatt cacctaattt agcatggcct cttattgtaa cagctttaag
	12661 ggccaattct gctgtcaaat tacagaataa tgagcttagt cctgttgcac tacgacagat
	12721 gtcttgtgct gccggtacta cacaaactgc ttgcactgat gacaatgcgt tagcttacta
	12781 caacacaaca aagggaggta ggtttgtact tgcactgtta tccgatttac aggatttgaa
	12841 atgggctaga ttccctaaga gtgatggaac tggtactatc tatacagaac tggaaccacc
	12901 ttgtaggttt gttacagaca cacctaaagg tcctaaagtg aagtatttat actttattaa
	12961 aggattaaac aacctaaata gaggtatggt acttggtagt ttagctgcca cagtacgtct
	13021 acaagctggt aatgcaacag aagtgcctgc caattcaact gtattatctt tctgtgcttt
	13081 tgctgtagat gctgctaaag cttacaaaga ttatctagct agtgggggac aaccaatcac
	13141 taattgtgtt aagatgttgt gtacacacac tggtactggt caggcaataa cagttacacc
	13201 ggaagccaat atggatcaag aatcctttgg tggtgcatcg tgttgtctgt actgccgttg
	13261 ccacatagat catccaaatc ctaaaggatt ttgtgactta aaaggtaagt atgtacaaat
	13321 acctacaact tgtgctaatg accctgtggg ttttacactt aaaaacacag tctgtaccgt
	13381 ctgcggtatg tggaaaggtt atggctgtag ttgtgatcaa ctccgcgaac ccatgcttca
	13441 gtcagctgat gcacaatcgt ttttaaacgg gtttgcggtg taagtgcagc ccgtcttaca
	13501 ccgtgcggca caggcactag tactgatgtc gtatacaggg cttttgacat ctacaatgat
	13561 aaagtagctg gttttgctaa attcctaaaa actaattgtt gtcgcttcca agaaaaggac
	13621 gaagatgaca atttaattga ttcttacttt gtagttaaga gacacacttt ctctaactac
	13681 caacatgaag aaacaattta taatttactt aaggattgtc cagctgttgc taaacatgac
	13741 ttctttaagt ttagaataga cggtgacatg gtaccacata tatcacgtca acgtcttact

	13801 aaatacacaa tggcagacct cgtctatgct ttaaggcatt ttgatgaagg taattgtgac 13861 acattaaaag aaatacttgt cacatacaat tgttgtgatg atgattattt caataaaaag 13921 gactggtatg attttgtaga aaacccagat atattacgcg tatacgccaa cttaggtgaa 13981 cgtgtacgcc aagctttgtt aaaaacagta caattctgtg atgccatgcg aaatgctggt 14041 attgttggtg tactgacatt agataatcaa gatctcaatg gtaactggta tgatttcggt 14101 gatttcatac aaaccacgcc aggtagtgga gttcctgttg tagattctta ttattcattg 14161 ttaatgccta tattaacctt gaccagggct ttaactgcag agtcacatgt tgacactgac 14221 ttaacaaagc cttacattaa gtgggatttg ttaaaatatg acttcacgga agagaggtta 14281 aaactctttg accgttattt taaatattgg gatcagacat accacccaaa ttgtgttaac 14341 tgtttggatg acagatgcat tctgcattgt gcaaacttta atgttttatt ctctacagtg 14401 ttcccaccta caagttttgg accactagtg agaaaaatat ttgttgatgg tgttccattt 14461 gtagtttcaa ctggatacca cttcagagag ctaggtgttg tacataatca ggatgtaaac 14521 ttacatagct ctagacttag ttttaaggaa ttacttgtgt atgctgctga ccctgctatg 14581 cacgctgctt ctggtaatct attactagat aaacgcacta cgtgcttttc agtagctgca 14641 cttactaaca atgttgcttt tcaaactgtc aaacccggta attttaacaa agacttctat 14701 gactttgctg tgtctaaggg tttctttaag gaaggaagtt ctgttgaatt aaaacacttc 14761 ttctttgctc aggatggtaa tgctgctatc agcgattatg actactatcg ttataatcta 14821 ccaacaatgt gtgatatcag acaactacta tttgtagttg aagttgttga taagtacttt 14881 gattgttacg atggtggctg tattaatgct aaccaagtca tcgtcaacaa cctagacaaa 14941 tcagctggtt ttccatttaa taaatggggt aaggctagac tttattatga ttcaatgagt 15001 tatgaggatc aagatgcact tttcgcatat acaaaacgta atgtcatccc tactataact 15061 caaatgaatc ttaagtatgc cattagtgca aagaatagag ctcgcaccgt agctggtgtc 15121 tctatctgta gtactatgac caatagacag tttcatcaaa aattattgaa atcaatagcc 15181 gccactagag gagctactgt agtaattgga acaagcaaat tctatggtgg ttggcacaac 15241 atgttaaaaa ctgtttatag tgatgtagaa aaccctcacc ttatgggttg ggattatcct 15301 aaatgtgata gagccatgcc taacatgctt agaattatgg cctcacttgt tcttgctcgc 15361 aaacatacaa cgtgttgtag cttgtcacac cgtttctata gattagctaa tgagtgtgct 15421 caagtattga gtgaaatggt catgtgtggc ggttcactat atgttaaacc aggtggaacc 15481 tcatcaggag atgccacaac tgcttatgct aatagtgttt ttaacatttg tcaagctgtc 15541 acggccaatg ttaatgcact tttatctact gatggtaaca aaattgccga taagtatgtc 15601 cgcaatttac aacacagact ttatgagtgt ctctatagaa atagagatgt tgacacagac 15661 tttgtgaatg agttttacgc atatttgcgt aaacatttct caatgatgat actctctgac 15721 gatgctgttg tgtgtttcaa tagcacttat gcatctcaag gtctagtggc tagcataaag 15781 aactttaagt cagttcttta ttatcaaaac aatgttttta tgtctgaagc aaaatgttgg 15841 actgagactg accttactaa aggacctcat gaattttgct ctcaacatac aatgctagtt

	15901 aaacagggtg atgattatgt gtaccttcct tacccagatc catcaagaat cctaggggcc
	15961 ggctgttttg tagatgatat cgtaaaaaca gatggtacac ttatgattga acggttcgtg
	16021 tctttagcta tagatgctta cccacttact aaacatccta atcaggagta tgctgatgtc
	16081 tttcatttgt acttacaata cataagaaag ctacatgatg agttaacagg acacatgtta
	16141 gacatgtatt ctgttatgct tactaatgat aacacttcaa ggtattggga acctgagttt
	16201 tatgaggcta tgtacacacc gcatacagtc ttacaggctg ttggggcttg tgttctttgc
	16261 aattcacaga cttcattaag atgtggtgct tgcatacgta gaccattctt atgttgtaaa
	16321 tgctgttacg accatgtcat atcaacatca cataaattag tcttgtctgt taatccgtat
	16381 gtttgcaatg ctccaggttg tgatgtcaca gatgtgactc aactttactt aggaggtatg
	16441 agctattatt gtaaatcaca taaaccaccc attagttttc cattgtgtgc taatggacaa
	16501 gtttttggtt tatataaaaa tacatgtgtt ggtagcgata atgttactga ctttaatgca
	16561 attgcaacat gtgactggac aaatgctggt gattacattt tagctaacac ctgtactgaa
	16621 agactcaagc tttttgcagc agaaacgctc aaagctactg aggagacatt taaactgtct
	16681 tatggtattg ctactgtacg tgaagtgctg tctgacagag aattacatct ttcatgggaa
	16741 gttggtaaac ctagaccacc acttaaccga aattatgtct ttactggtta tcgtgtaact
	16801 aaaaacagta aagtacaaat aggagagtac acctttgaaa aaggtgacta tggtgatgct
	16861 gttgtttacc gaggtacaac aacttacaaa ttaaatgttg gtgattattt tgtgctgaca
	16921 tcacatacag taatgccatt aagtgcacct acactagtgc cacaagagca ctatgttaga
	16981 attactggct tatacccaac actcaatatc tcagatgagt tttctagcaa tgttgcaaat
	17041 tatcaaaagg ttggtatgca aaagtattct acactccagg gaccacctgg tactggtaag
	17101 agtcattttg ctattggcct agctctctac tacccttctg ctcgcatagt gtatacagct
	17161 tgctctcatg ccgctgttga tgcactatgt gagaaggcat taaaatattt gcctatagat
	17221 aaatgtagta gaattatacc tgcacgtgct cgtgtagagt gttttgataa attcaaagtg
	17281 aattcaacat tagaacagta tgtcttttgt actgtaaatg cattgcctga gacgacagca
	17341 gatatagttg tctttgatga aatttcaatg gccacaaatt atgatttgag tgttgtcaat
	17401 gccagattac gtgctaagca ctatgtgtac attggcgacc ctgctcaatt acctgcacca
	17461 cgcacattgc taactaaggg cacactagaa ccagaatatt tcaattcagt gtgtagactt
	17521 atgaaaacta taggtccaga catgttcctc ggaacttgtc ggcgttgtcc tgctgaaatt
	17581 gttgacactg tgagtgcttt ggtttatgat aataagctta aagcacataa agacaaatca
	17641 gctcaatgct ttaaaatgtt ttataagggt gttatcacgc atgatgtttc atctgcaatt
	17701 aacaggccac aaataggcgt ggtaagagaa ttccttacac gtaaccctgc ttggagaaaa
	17761 gctgtcttta tttcacctta taattcacag aatgctgtag cctcaaagat tttgggacta
	17821 ccaactcaaa ctgttgattc atcacagggc tcagaatatg actatgtcat attcactcaa
	17881 accactgaaa cagctcactc ttgtaatgta aacagattta atgttgctat taccagagca
	17941 aaagtaggca tactttgcat aatgtctgat agagaccttt atgacaagtt gcaatttaca

	18001 agtcttgaaa ttccacgtag gaatgtggca actttacaag ctgaaaatgt aacaggactc 18061 tttaaagatt gtagtaaggt aatcactggg ttacatccta cacaggcacc tacacacctc 18121 agtgttgaca ctaaattcaa aactgaaggt ttatgtgttg acatacctgg catacctaag 18181 gacatgacct atagaagact catctctatg atgggtttta aaatgaatta tcaagttaat 18241 ggttacccta acatgtttat cacccgcgaa gaagctataa gacatgtacg tgcatggatt 18301 ggcttcgatg tcgaggggtg tcatgctact agagaagctg ttggtaccaa tttaccttta 18361 cagctaggtt tttctacagg tgttaaccta gttgctgtac ctacaggtta tgttgataca 18421 cctaataata cagatttttc cagagttagt gctaaaccac cgcctggaga tcaatttaaa 18481 cacctcatac cacttatgta caaaggactt ccttggaatg tagtgcgtat aaagattgta 18541 caaatgttaa gtgacacact taaaaatctc tctgacagag tcgtatttgt cttatgggca 18601 catggctttg agttgacatc tatgaagtat tttgtgaaaa taggacctga gcgcacctgt 18661 tgtctatgtg atagacgtgc cacatgcttt tccactgctt cagacactta tgcctgttgg 18721 catcattcta ttggatttga ttacgtctat aatccgttta tgattgatgt tcaacaatgg 18781 ggttttacag gtaacctaca aagcaaccat gatctgtatt gtcaagtcca tggtaatgca 18841 catgtagcta gttgtgatgc aatcatgact aggtgtctag ctgtccacga gtgctttgtt 18901 aagcgtgttg actggactat tgaatatcct ataattggtg atgaactgaa gattaatgcg 18961 gcttgtagaa aggttcaaca catggttgtt aaagctgcat tattagcaga caaattccca 19021 gttcttcacg acattggtaa ccctaaagct attaagtgtg tacctcaagc tgatgtagaa 19081 tggaagttct atgatgcaca gccttgtagt gacaaagctt ataaaataga agaattattc 19141 tattcttatg ccacacattc tgacaaattc acagatggtg tatgcctatt ttggaattgc 19201 aatgtcgata gatatcctgc taattccatt gtttgtagat ttgacactag agtgctatct 19261 aaccttaact tgcctggttg tgatggtggc agtttgtatg taaataaaca tgcattccac 19321 acaccagctt ttgataaaag tgcttttgtt aatttaaaac aattaccatt tttctattac 19381 tctgacagtc catgtgagtc tcatggaaaa caagtagtgt cagatataga ttatgtacca 19441 ctaaagtctg ctacgtgtat aacacgttgc aatttaggtg gtgctgtctg tagacatcat 19501 gctaatgagt acagattgta tctcgatgct tataacatga tgatctcagc tggctttagc 19561 ttgtgggttt acaaacaatt tgatacttat aacctctgga acacttttac aagacttcag 19621 agtttagaaa atgtggcttt taatgttgta aataagggac actttgatgg acaacagggt 19681 gaagtaccag tttctatcat taataacact gtttacacaa aagttgatgg tgttgatgta 19741 gaattgtttg aaaataaaac aacattacct gttaatgtag catttgagct ttgggctaag 19801 cgcaacatta aaccagtacc agaggtgaaa atactcaata atttgggtgt ggacattgct 19861 gctaatactg tgatctggga ctacaaaaga gatgctccag cacatatatc tactattggt 19921 gtttgttcta tgactgacat agccaagaaa ccaactgaaa cgatttgtgc accactcact 19981 gtctttttg atggtagagt tgatggtcaa gtagacttat ttagaaatgc ccgtaatggt 20041 gttcttatta cagaaggtag tgttaaaggt ttacaaccat ctgtaggtcc caaacaagct

	20101 agtcttaatg gagtcacatt aattggagaa gccgtaaaaa cacagttcaa ttattataag
	20161 aaagttgatg gtgttgtcca acaattacct gaaacttact ttactcagag tagaaattta
	20221 caagaattta aacccaggag tcaaatggaa attgatttct tagaattagc tatggatgaa
	20281 ttcattgaac ggtataaatt agaaggctat gccttcgaac atatcgttta tggagatttt
	20341 agtcatagtc agttaggtgg tttacatcta ctgattggac tagctaaacg ttttaaggaa
	20401 tcacctttg aattagaaga ttttattcct atggacagta cagttaaaaa ctatttcata
	20461 acagatgcgc aaacaggttc atctaagtgt gtgtgttctg ttattgattt attacttgat
	20521 gattttgttg aaataataaa atcccaagat ttatctgtag tttctaaggt tgtcaaagtg
	20581 actattgact atacagaaat ttcatttatg ctttggtgta aagatggcca tgtagaaaca
	20641 ttttacccaa aattacaatc tagtcaagcg tggcaaccgg gtgttgctat gcctaatctt
	20701 tacaaaatgc aaagaatgct attagaaaag tgtgaccttc aaaattatgg tgatagtgca
	20761 acattaccta aaggcataat gatgaatgtc gcaaaatata ctcaactgtg tcaatattta
	20821 aacacattaa cattagctgt accctataat atgagagtta tacattttgg tgctggttct
	20881 gataaaggag ttgcaccagg tacagctgtt ttaagacagt ggttgcctac gggtacgctg
	20941 cttgtcgatt cagatcttaa tgactttgtc tctgatgcag attcaacttt gattggtgat
	21001 tgtgcaactg tacatacagc taataaatgg gatctcatta ttagtgatat gtacgaccct
	21061 aagactaaaa atgttacaaa agaaaatgac tctaaagagg gttttttcac ttacatttgt
	21121 gggtttatac aacaaaagct agctcttgga ggttccgtgg ctataaagat aacagaacat
	21181 tcttggaatg ctgatcttta taagctcatg ggacacttcg catggtggac agcctttgtt
	21241 actaatgtga atgcgtcatc atctgaagca tttttaattg gatgtaatta tcttggcaaa
	21301 ccacgcgaac aaatagatgg ttatgtcatg catgcaaatt acatattttg gaggaataca
	21361 aatccaattc agttgtcttc ctattcttta tttgacatga gtaaatttcc ccttaaatta
	21421 aggggtactg ctgttatgtc tttaaaagaa ggtcaaatca atgatatgat tttatctctt
	21481 cttagtaaag gtagacttat aattagagaa aacaacagag ttgttatttc tagtgatgtt
	21541 cttgttaaca actaaacgaa caatgtttgt ttttcttgtt ttattgccac tagtctctag
	21601 tcagtgtgtt aatcttacaa ccagaactca attacccccc gcatacacta attctttcac
	21661 acgtggtgtt tattaccctg acaaagtttt cagatcctca gttttacatt caactcagga
	21721 cttgttctta cctttctttt ccaatgttac ttggttccat gctatacatg tctctgggac
	21781 caatggtact aagaggtttg ataaccctgt cctaccattt aatgatggtg tttattttgc
	21841 ttccactgag aagtctaaca taataagagg ctggattttt ggtactactt tagattcgaa
	21901 gacccagtcc ctacttattg ttaataacgc tactaatgtt gttattaaag tctgtgaatt
	21961 tcaattttgt aatgatccat ttttgggtgt ttattaccac aaaaacaaca aaagttggat
	22021 ggaaagtgag ttcagagttt attctagtgc gaataattgc acttttgaat atgtctctca
	22081 gccttttctt atggaccttg aaggaaaaca gggtaatttc aaaaatctta gggaatttgt
	22141 gtttaagaat attgatggtt attttaaaat atattctaag cacacgccta ttaatttagt

	22201 gcgtgatctc cctcagggtt tttcggcttt agaaccattg gtagatttgc caataggtat 22261 taacatcact aggtttcaaa ctttacttgc tttacataga agttatttga ctcctggtga 22321 ttcttcttca ggttggacag ctggtgctgc agcttattat gtgggttatc ttcaacctag 22381 gacttttcta ttaaaatata atgaaaatgg aaccattaca gatgctgtag actgtgcact 22441 tgaccctctc tcagaaacaa agtgtacgtt gaaatccttc actgtagaaa aaggaatcta 22501 tcaaacttct aactttagag tccaaccaac agaatctatt gttagatttc ctaatattac 22561 aaacttgtgc ccttttggtg aagtttttaa cgccaccaga tttgcatctg tttatgcttg 22621 gaacaggaag agaatcagca actgtgttgc tgattattct gtcctatata attccgcatc 22681 attttccact tttaagtgtt atggagtgtc tcctactaaa ttaaatgatc tctgctttac 22741 taatgtctat gcagattcat ttgtaattag aggtgatgaa gtcagacaaa tcgctccagg 22801 gcaaactgga aagattgctg attataatta taaattacca gatgatttta caggctgcgt 22861 tatagcttgg aattctaaca atcttgattc taaggttggt ggtaattata attacctgta 22921 tagattgttt aggaagtcta atctcaaacc ttttgagaga gatatttcaa ctgaaatcta 22981 tcaggccggt agcacacctt gtaatggtgt tgaaggtttt aattgttact ttcctttaca 23041 atcatatggt ttccaaccca ctaatggtgt tggttaccaa ccatacagag tagtagtact 23101 ttcttttgaa cttctacatg caccagcaac tgtttgtgga cctaaaaagt ctactaattt 23161 ggttaaaaac aaatgtgtca atttcaactt caatggttta acaggcacag gtgttcttac 23221 tgagtctaac aaaaagtttc tgcctttcca acaatttggc agagacattg ctgacactac 23281 tgatgctgtc cgtgatccac agacacttga gattcttgac attacaccat gttcttttgg 23341 tggtgtcagt gttataacac caggaacaaa tacttctaac caggttgctg ttctttatca 23401 ggatgttaac tgcacagaag tccctgttgc tattcatgca gatcaactta ctcctacttg 23461 gcgtgtttat tctacaggtt ctaatgtttt tcaaacacgt gcaggctgtt taataggggc 23521 tgaacatgtc aacaactcat atgagtgtga catacccatt ggtgcaggta tatgcgctag 23581 ttatcagact cagactaatt ctcctcggcg ggcacgtagt gtagctagtc aatccatcat 23641 tgcctacact atgtcacttg gtgcagaaaa ttcagttgct tactctaata actctattgc 23701 catacccaca aattttacta ttagtgttac cacagaaatt ctaccagtgt ctatgaccaa 23761 gacatcagta gattgtacaa tgtacatttg tggtgattca actgaatgca gcaatctttt 23821 gttgcaatat ggcagttttt gtacacaatt aaaccgtgct ttaactggaa tagctgttga 23881 acaagacaaa aacacccaag aagtttttgc acaagtcaaa caaatttaca aaacaccacc 23941 aattaaagat tttggtggtt ttaatttttc acaaatatta ccagatccat caaaaccaag 24001 caagaggtca tttattgaag atctactttt caacaaagtg acacttgcag atgctggctt 24061 catcaaacaa tatggtgatt gccttggtga tattgctgct agagacctca tttgtgcaca 24121 aaagtttaac ggccttactg ttttgccacc tttgctcaca gatgaaatga ttgctcaata 24181 cacttctgca ctgttagcgg gtacaatcac ttctggttgg acctttggtg caggtgctgc 24241 attacaaata ccatttgcta tgcaaatggc ttataggttt aatggtattg gagttacaca

	24301 gaatgttctc tatgagaacc aaaaattgat tgccaaccaa tttaatagtg ctattggcaa 24361 aattcaagac tcactttctt ccacagcaag tgcacttgga aaacttcaag atgtggtcaa 24421 ccaaaatgca caagctttaa acacgcttgt taaacaactt agctccaatt ttggtgcaat 24481 ttcaagtgtt ttaaatgata tcctttcacg tcttgacaaa gttgaggctg aagtgcaaat 24541 tgataggttg atcacaggca gacttcaaag tttgcagaca tatgtgactc aacaattaat 24601 tagagctgca gaaatcagag cttctgctaa tcttgctgct actaaaatgt cagagtgtgt 24661 acttggacaa tcaaaaagag ttgatttttg tggaaagggc tatcatctta tgtccttccc 24721 tcagtcagca cctcatggtg tagtcttctt gcatgtgact tatgtccctg cacaagaaaa 24781 gaacttcaca actgctcctg ccatttgtca tgatggaaaa gcacactttc ctcgtgaagg 24841 tgtctttgtt tcaaatggca cacactggtt tgtaacacaa aggaattttt atgaaccaca 24901 aatcattact acagacaaca catttgtgtc tggtaactgt gatgttgtaa taggaattgt 24961 caacaacaca gtttatgatc ctttgcaacc tgaattagac tcattcaagg aggagttaga 25021 taaatatttt aagaatcata catcaccaga tgttgattta ggtgacatct ctggcattaa 25081 tgcttcagtt gtaaacattc aaaaagaaat tgaccgcctc aatgaggttg ccaagaattt 25141 aaatgaatct ctcatcgatc tccaagaact tggaaagtat gagcagtata taaaatggcc 25201 atggtacatt tggctaggtt ttatagctgg cttgattgcc atagtaatgg tgacaattat 25261 gctttgctgt atgaccagtt gctgtagttg tctcaagggc tgttgttctt gtggatcctg 25321 ctgcaaattt gatgaagacg actctgagcc agtgctcaaa ggagtcaaat tacattacac 25381 ataaacgaac ttatggattt gtttatgaga atcttcacaa ttggaactgt aactttgaag 25441 caaggtgaaa tcaaggatgc tactccttca gattttgttc gcgctactgc aacgataccg 25501 atacaagcct cactcccttt cggatggctt attgttggcg ttgcacttct tgctgttttt 25561 cagagcgctt ccaaaatcat aaccctcaaa aagagatggc aactagcact ctccaagggt 25621 gttcactttg tttgcaactt gctgttgttg tttgtaacag tttactcaca ccttttgctc 25681 gttgctgctg gccttgaagc ccctttttctc tatctttatg ctttagtcta cttcttgcag 25741 agtataaact ttgtaagaat aataatgagg ctttggcttt gctggaaatg ccgttccaaa 25801 aacccattac tttatgatgc caactatttt ctttgctggc atactaattg ttacgactat 25861 tgtatacctt acaatagtgt aacttcttca attgtcatta cttcaggtga tggcacaaca 25921 agtcctattt ctgaacatga ctaccagatt ggtggttata ctgaaaaatg ggaatctgga 25981 gtaaaagact gtgttgtatt acacagttac ttcacttcag actattacca gctgtactca 26041 actcaattga gtacagacac tggtgttgaa catgttacct tcttcatcta caataaaatt 26101 gttgatgagc ctgaagaaca tgtccaaatt cacacaatcg acggttcatc cggagttgtt 26161 aatccagtaa tggaaccaat ttatgatgaa ccgacgacga ctactagcgt gcctttgtaa 26221 gcacaagctg atgagtacga acttatgtac tcattcgttt cggaagagac aggtacgtta 26281 atagttaata gcgtacttct ttttcttgct ttcgtggtat tcttgctagt tacactagcc 26341 atccttactg cgcttcgatt gtgtgcgtac tgctgcaata ttgttaacgt gagtcttgta

	26401 aaaccttctt tttacgttta ctctcgtgtt aaaaatctga attcttctag agttcctgat 26461 cttctggtct aaacgaacta aatattatat tagtttttct gtttggaact ttaattttag 26521 ccatggcaga ttccaacggt actattaccg ttgaagagct taaaaagctc cttgaacaat 26581 ggaacctagt aataggtttc ctattcctta catggatttg tcttctacaa tttgcctatg 26641 ccaacaggaa taggtttttg tatataatta agttaatttt cctctggctg ttatggccag 26701 taactttagc ttgttttgtg cttgctgctg tttacagaat aaattggatc accggtggaa 26761 ttgctatcgc aatggcttgt cttgtaggct tgatgtggct cagctacttc attgcttctt 26821 tcagactgtt tgcgcgtacg cgttccatgt ggtcattcaa tccagaaact aacattcttc 26881 tcaacgtgcc actccatggc actattctga ccagaccgct tctagaaagt gaactcgtaa 26941 tcggagctgt gatccttcgt ggacatcttc gtattgctgg acaccatcta ggacgctgtg 27001 acatcaagga cctgcctaaa gaaatcactg ttgctacatc acgaacgctt tcttattaca 27061 aattgggagc ttcgcagcgt gtagcaggtg actcaggttt tgctgcatac agtcgctaca 27121 ggattggcaa ctataaatta aacacagacc attccagtag cagtgacaat attgctttgc 27181 ttgtacagta agtgacaaca gatgtttcat ctcgttgact ttcaggttac tatagcagag 27241 atattactaa ttattatgag gacttttaaa gtttccattt ggaatcttga ttacatcata 27301 aacctcataa ttaaaaattt atctaagtca ctaactgaga ataaatattc tcaattagat 27361 gaagagcaac caatggagat tgattaaacg aacatgaaaa ttattctttt cttggcactg 27421 ataacactcg ctacttgtga gctttatcac taccaagagt gtgttagagg tacaacagta 27481 cttttaaaag aaccttgctc ttctggaaca tacgagggca attcaccatt tcatcctcta 27541 gctgataaca aatttgcact gacttgcttt agcactcaat ttgcttttgc ttgtcctgac 27601 ggcgtaaaac acgtctatca gttacgtgcc agatcagttt cacctaaact gttcatcaga 27661 caagaggaag ttcaagaact ttactctcca atttttctta ttgttgcggc aatagtgttt 27721 ataacacttt gcttcacact caaaagaaag acagaatgat tgaactttca ttaattgact 27781 tctatttgtg ctttttagcc tttctgctat tccttgtttt aattatgctt attatctttt 27841 ggttctcact tgaactgcaa gatcataatg aaacttgtca cgcctaaacg aacatgaaat 27901 ttcttgtttt cttaggaatc atcacaactg tagctgcatt tcaccaagaa tgtagtttac 27961 agtcatgtac tcaacatcaa ccatatgtag ttgatgaccc gtgtcctatt cacttctatt 28021 ctaaatggta tattagagta ggagctagaa aatcagcacc tttaattgaa ttgtgcgtgg 28081 atgaggctgg ttctaaatca cccattcagt acatcgatat cggtaattat acagtttcct 28141 gtttaccttt tacaattaat tgccaggaac ctaaattggg tagtcttgta gtgcgttgtt 28201 cgttctatga agacttttta gagtatcatg acgttcgtgt tgttttagat ttcatctaaa 28261 cgaacaaact aaaatgtctg ataatggacc ccaaaatcag cgaaatgcac cccgcattac 28321 gtttggtgga ccctcagatt caactggcag taaccagaat ggagaacgca gtggggcgcg 28381 atcaaaacaa cgtcggcccc aaggtttacc caataatact gcgtcttggt tcaccgctct 28441 cactcaacat ggcaaggaag accttaaatt ccctcgagga caaggcgttc caattaacac

	28501 caatagcagt ccagatgacc aaattggcta ctaccgaaga gctaccagac gaattcgtgg 28561 tggtgacggt aaaatgaaag atctcagtcc aagatggtat ttctactacc taggaactgg 28621 gccagaagct ggacttccct atggtgctaa caaagacggc atcatatggg ttgcaactga 28681 gggagccttg aatacaccaa aagatcacat tggcacccgc aatcctgcta acaatgctgc 28741 aatcgtgcta caacttcctc aaggaacaac attgccaaaa ggcttctacg cagaagggag 28801 cagaggcggc agtcaagcct cttctcgttc ctcatcacgt agtcgcaaca gttcaagaaa 28861 ttcaactcca ggcagcagta ggggaacttc tcctgctaga atggctggca atggcggtga 28921 tgctgctctt gctttgctgc tgcttgacag attgaaccag cttgagagca aaatgtctgg 28981 taaaggccaa caacaacaag gccaaactgt cactaagaaa tctgctgctg aggcttctaa 29041 gaagcctcgg caaaaacgta ctgccactaa agcatacaat gtaacacaag ctttcggcag 29101 acgtggtcca gaacaaaccc aaggaaattt tggggaccag gaactaatca gacaaggaac 29161 tgattacaaa cattggccgc aaattgcaca atttgccccc agcgcttcag cgttcttcgg 29221 aatgtcgcgc attggcatgg aagtcacacc ttcgggaacg tggttgacct acacaggtgc 29281 catcaaattg gatgacaaag atccaaattt caaagatcaa gtcattttgc tgaataagca 29341 tattgacgca tacaaaacat tcccaccaac agagcctaaa aaggacaaaa agaagaaggc 29401 tgatgaaact caagccttac cgcagagaca gaagaaacag caaactgtga ctcttcttcc 29461 tgctgcagat ttggatgatt tctccaaaca attgcaacaa tccatgagca gtgctgactc 29521 aactcaggcc taaactcatg cagaccacac aaggcagatg ggctatataa acgttttcgc 29581 ttttccgttt acgatatata gtctactctt gtgcagaatg aattctcgta actacatagc 29641 acaagtagat gtagttaact ttaatctcac atagcaatct ttaatcagtg tgtaacatta 29701 gggaggactt gaaagagcca ccacattttc accgaggcca cgcggagtac gatcgagtgt 29761 acagtgaaca atgctaggga gagctgccta tatggaagag ccctaatgtg taaaattaat 29821 tttagtagtg ctatccccat gtgattttaa tagcttctta ggagaatgac aaaaaaaaaa 29881 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
Нуклеотидная последовательность спайкового белка SARS-CoV-2 в локусе TK. SEQ ID NO: 54	1 ttggctagtc aagatgatga atcttcatta tctgatatat tgcaaatcac tcaatatcta 61 gactttctgt tattattatt gatccaatca aaaaataaat tagaagccgt gggtcattgt 121 tatgaatctc tttcagagga atacagacaa ttgacaaaat tcacagactt tcaagatttt 181 aaaaaactgt ttaacaaggt ccctattgtt acagatggaa gggtcaaact taataaagga 241 tatttgttcg actttgtgat tagtttgatg cgattcaaaa aagaatcctc tctagctacc 301 accgcaatag atcctattag atacatagat cctcgtcgtg atatcgcatt ttctaacgtg 361 atggatatat taaagttgaa taaagtgaac aataattaat tctttattgt catcggatcc 421 cacgatgtgc tagactctct cgtctacgcg gccgcaaaaa ttgaaatttt attttttttt 481 tttggaatat aaataatgtt cgtgttccta gtcctactac cgctagtctc ttcccagtgt 541 gtaaacctaa caacgagaac acaactacca ccggcgtaca ccaattcttt cacaagagga 601 gtatattacc cggacaaggt gttcagatcc tccgtactac attctaccca ggacctattc

	661 ctaccgttct tctctaacgt aacatggttc cacgcgatcc atgtctctgg aacaaacgga 721 acgaagagat tcgataaccc ggtcttgccg ttcaacgatg gtgtatactt tgcgtccacc 781 gagaagtcca acatcatcag aggatggatc ttcggaacca ccttggattc taagacccag 841 tccttgctaa tcgtcaacaa cgcgaccaac gtcgtcatca aagtctgcga attccagttc 901 tgtaacgacc cgtttttggg agtctactac cacaagaaca acaagtcctg gatggaatcc 961 gagttcagag tctactcttc cgcgaacaac tgcaccttcg aatatgtatc tcagccgttc 1021 ctaatggacc tagagggaaa gcagggaaac ttcaagaacc taagagagtt cgtattcaag 1081 aacatcgacg gatacttcaa gatctactcc aagcacaccc cgatcaacct agttagagat 1141 ctaccgcaag gattctctgc gctagaaccg ttagtagatt tgccgatcgg aatcaacatc 1201 accagattcc agacactact agcgctacac agatcttacc taacgccggg agattcttct 1261 tctggatgga ctgctggtgc tgcggcttat tatgtaggat acctacagcc gagaaccttc 1321 ctattgaagt acaacgaaaa cggaaccatc accgatgccg tagattgtgc tctagatccg 1381 ctatccgaaa cgaagtgcac cctaaagtct ttcaccgtcg agaagggaat ctaccagacc 1441 tccaacttta gagtacagcc gaccgaatcc atcgtcagat ttccgaacat cacgaaccta 1501 tgtccgttcg gagaagtgtt caacgcgaca agatttgcgt ctgtctatgc gtggaacaga 1561 aaaagaatca gtaactgcgt cgcggactac tccgtcctat acaactctgc ctctttctcc 1621 acgttcaaat gctacggtgt atccccgaca aagctaaacg atctatgctt caccaacgtc 1681 tacgcggact ccttcgtaat cagaggagat gaagttagac agattgcgcc gggacaaact 1741 ggaaagatcg cggattataa ctacaagcta ccggacgact tcaccggatg tgtaattgcg 1801 tggaattcga acaacctaga ctccaaagtc ggaggaaact acaactactt gtacagacta 1861 ttcagaaagt ccaacctaaa gccgttcgag agagacatct ccaccgaaat ctatcaggct 1921 ggatctacac cgtgtaatgg tgtcgaagga ttcaactgct acttcccgct acagtcttac 1981 ggatttcaac cgacaaacgg tgtaggatat cagccgtaca gagtcgtcgt actatccttc 2041 gaactactac atgctccggc gacagtatgt ggaccgaaaa agtctaccaa cctagtcaag 2101 aacaaatgcg tcaactttaa cttcaacgga ctaaccggaa ccggtgtcct aaccgaatct 2161 aacaagaagt ttctaccgtt ccagcagttc ggaagagata tcgcggatac aacagacgct 2221 gtcagagatc cgcaaacctt ggagatccta gatatcaccc cgtgttcttt cggtggtgtc 2281 tctgtaatta ctccgggaac gaacacctcc aatcaagtag cggtactata ccaggacgtg 2341 aactgtacag aagtaccggt agctattcac gcggatcaac taacaccaac ttggagagtg 2401 tactccaccg gatctaacgt attccaaaca agagcgggat gtctaatcgg agcggaacac 2461 gtaaacaact cctacgaatg tgatatcccg attggagcgg gaatctgtgc gtcttaccaa 2521 acacaaacaa actccccgag aagagcgaga tctgtagcct ctcaatctat tatcgcctac 2581 accatgtcct tgggagccga aaattctgtc gcgtactcca acaattctat cgcgatcccg 2641 acaaacttca ccatctctgt aacaaccgag atcctaccgg tgtctatgac caagacatct 2701 gtcgattgca ccatgtacat ctgcggagat tccaccgagt gctccaacct actactacag

	2761 tacggatctt tctgtaccca gctaaacaga gcgttgactg gaatcgctgt agagcaggat 2821 aagaacaccc aagaggtatt cgcgcaagtc aagcagatct ataagactcc gccgatcaag 2881 gacttcggag gttttaactt ctctcagatc ttgccggatc cgtccaaacc gtctaagaga 2941 tctttcatcg aggacctact attcaacaaa gtcaccctag ctgacgcggg attcatcaaa 3001 caatacggag attgcttggg agacattgcg gcgagagatc taatttgcgc gcagaagttt 3061 aacggattga cagtactacc gccgctacta accgatgaga tgattgcgca gtacacgtct 3121 gctctattgg cgggaacaat tacaagtgga tggacatttg gagccggtgc cgctctacaa 3181 attccgtttg ctatgcaaat ggcgtacaga ttcaacggaa tcggagtaac ccagaacgtc 3241 ttgtacgaga accagaagct aatcgcgaac cagttcaatt ccgcgatcgg aaagatccag 3301 gacagtctat cttctactgc ttcggcgttg ggaaagctac aggatgtagt aaatcaaaac 3361 gcgcaggcgc taaacacctt ggtcaagcaa ctatcctcta acttcggagc gatctcgtcc 3421 gtcctaaacg acatcttatc cagactagat aaggtcgaag cggaggtcca gatcgataga 3481 ctaatcactg gaagattgca gtccctacag acctacgtaa cacagcaact aattagagcg 3541 gcggagatta gagcctctgc taatctagct gcgaccaaga tgtccgaatg tgtcttggga 3601 caatccaaga gagtcgactt ttgcggaaag ggataccacc taatgtcttt tccacaatct 3661 gcgccgcatg gtgtcgtatt cctacatgta acatatgtgc cggcgcaaga aaagaacttt 3721 acaacagctc cagcgatctg ccatgatgga aaagctcatt ttccgagaga gggagtcttt 3781 gtctctaacg gaactcattg gttcgtcacc cagagaaact tttacgagcc gcagatcatc 3841 accaccgaca acacatttgt ttcgggaaac tgcgacgtgg tcatcggaat cgtaaacaat 3901 accgtctacg atccgttgca gccggaacta gactccttca aagaagagtt ggacaagtac 3961 tttaagaacc acacctctcc ggatgtcgac ttgggagata tttctggaat caacgcgtcc 4021 gtcgtcaaca tccagaaaga aatcgataga ttgaacgagg tcgcgaagaa cttgaacgag 4081 tccctaatcg acctacaaga gctaggaaaa tacgagcagt acatcaagtg gccgtggtac 4141 atttggctag gattcattgc tggactaatt gcgatcgtca tggtcaccat catgctatgc 4201 tgtatgacct cctgttgctc ctgtctaaag ggatgttgtt cctgcggatc ctgttgcaag 4261 ttcgatgaag atgatagtga accggtccta aagggtgtca agctacacta cacataaaag 4321 cttgtcgact attatatttt ttatctaaaa aactaaaaat aaacattgat taaattttaa 4381 tataatactt aaaaatggat gttgtgtcgt tagataaacc gtttatgtat tttgaggaaa 4441 ttgataatga gttagattac gaaccagaaa gtgcaaatga ggtcgcaaaa aaactaccgt 4501 atcaaggaca gttaaaacta ttactaggag aattattttt tcttagtaag ttacagcgac 4561 acggtatatt agatggtgcc accgtagtgt atataggatc ggctcctggt acacatatac 4621 gttatttgag agatcatttc tataatttag gaatgattat caaatggatg ctaattgacg 4681 gacgccatca tgatcctatt ctaaatggat tgcgtgatgt gactctagta tggtcatag
Нуклеотидная последовательн	1 gagtattcta ggtgtttcta tagaatgtaa gaagtcatcg acattactta ctttttgac 61 cgtgcgtaaa atgacccgag tatttaatag atttccagat atggcttatt atcgaggaga

ость спайкового белка SARS-CoV-2 в локусе HPXV200 (B22R). SEQ ID NO: 55	121 ctgtttaaaa gccgtttatg taacaatgac ttataaaaat actaaaactg gagagactga 181 ttacacgtac ctctctaatg ggggttgcct gcatactatc gtaatggggt cgatggttga 241 ttattgatta gtatattcct tattcttttt attcacacaa aaagaacatt tttataaaca 301 tgaaaccact gtctaaatgt aattatgatc ttgatttata gatgaagatc agcctttaga 361 ggattttaac cagtatgttt aatatgaaaa aaataaacat aacatatttt gagattaagc 421 gctattgtgc ttaattattt tgctctataa actgaatata tagccacaat tattgacggg 481 cttgtttatg accggcaatc ggatcccacg atgtgctaga ctctctcgtc tacgcggccg 541 caaaaattga aattttattt tttttttttg gaatataaat aatgttcgtg ttcctagtcc 601 tactaccgct agtctcttcc cagtgtgtaa acctaacaac gagaacacaa ctaccaccgg 661 cgtacaccaa ttctttcaca agaggagtat attacccgga caaggtgttc agatcctccg 721 tactacattc tacccaggac ctattcctac cgttcttctc taacgtaaca tggttccacg 781 cgatccatgt ctctggaaca aacggaacga agagattcga taacccggtc ttgccgttca 841 acgatggtgt atactttgcg tccaccgaga agtccaacat catcagagga tggatcttcg 901 gaaccacctt ggattctaag acccagtcct tgctaatcgt caacaacgcg accaacgtcg 961 tcatcaaagt ctgcgaattc cagttctgta acgacccgtt tttgggagtc tactaccaca 1021 agaacaacaa gtcctggatg gaatccgagt tcagagtcta ctcttccgcg aacaactgca 1081 ccttcgaata tgtatctcag ccgttcctaa tggacctaga gggaaagcag ggaaacttca 1141 agaacctaag agagttcgta ttcaagaaca tcgacggata cttcaagatc tactccaagc 1201 acaccccgat caacctagtt agagatctac cgcaaggatt ctctgcgcta gaaccgttag 1261 tagatttgcc gatcggaatc aacatcacca gattccagac actactagcg ctacacagat 1321 cttacctaac gccgggagat tcttcttctg gatggactgc tggtgctgcg gcttattatg 1381 taggatacct acagccgaga accttcctat tgaagtacaa cgaaaacgga accatcaccg 1441 atgccgtaga ttgtgctcta gatccgctat ccgaaacgaa gtgcacccta aagtctttca 1501 ccgtcgagaa gggaatctac cagacctcca actttagagt acagccgacc gaatccatcg 1561 tcagatttcc gaacatcacg aacctatgtc cgttcggaga agtgttcaac gcgacaagat 1621 ttgcgtctgt ctatgcgtgg aacagaaaaa gaatcagtaa ctgcgtcgcg gactactccg 1681 tcctatacaa ctctgcctct ttctccacgt tcaaatgcta cggtgtatcc ccgacaaagc 1741 taaacgatct atgcttcacc aacgtctacg cggactcctt cgtaatcaga ggagatgaag 1801 ttagacagat tgcgccggga caaactggaa agatcgcgga ttataactac aagctaccgg 1861 acgacttcac cggatgtgta attgcgtgga attcgaacaa cctagactcc aaagtcggag 1921 gaaactacaa ctacttgtac agactattca gaaagtccaa cctaaagccg ttcgagagag 1981 acatctccac cgaaatctat caggctggat ctacaccgtg taatggtgtc gaaggattca 2041 actgctactt cccgctacag tcttacggat ttcaaccgac aaacggtgta ggatatcagc 2101 cgtacagagt cgtcgtacta tccttcgaac tactacatgc tccggcgaca gtatgtggac 2161 cgaaaaagtc taccaaccta gtcaagaaca aatgcgtcaa ctttaacttc aacggactaa

	2221 ccggaaccgg tgtcctaacc gaatctaaca agaagtttct accgttccag cagttcggaa
	2281 gagatatcgc ggatacaaca gacgctgtca gagatccgca aaccttggag atcctagata
	2341 tcaccccgtg ttctttcggt ggtgtctctg taattactcc gggaacgaac acctccaatc
	2401 aagtagcggt actataccag gacgtgaact gtacagaagt accggtagct attcacgcgg
	2461 atcaactaac accaacttgg agagtgtact ccaccggatc taacgtattc caaacaagag
	2521 cgggatgtct aatcggagcg gaacacgtaa acaactccta cgaatgtgat atcccgattg
	2581 gagcgggaat ctgtgcgtct taccaaacac aaacaaactc cccgagaaga gcgagatctg
	2641 tagcctctca atctattatc gcctacacca tgtccttggg agccgaaaat tctgtcgcgt
	2701 actccaacaa ttctatcgcg atcccgacaa acttcaccat ctctgtaaca accgagatcc
	2761 taccggtgtc tatgaccaag acatctgtcg attgcaccat gtacatctgc ggagattcca
	2821 ccgagtgctc caacctacta ctacagtacg gatctttctg tacccagcta aacagagcgt
	2881 tgactggaat cgctgtagag caggataaga acacccaaga ggtattcgcg caagtcaagc
	2941 agatctataa gactccgccg atcaaggact tcggaggttt taacttctct cagatcttgc
	3001 cggatccgtc caaaccgtct aagagatctt tcatcgagga cctactattc aacaaagtca
	3061 ccctagctga cgcgggattc atcaaacaat acggagattg cttgggagac attgcggcga
	3121 gagatctaat ttgcgcgcag aagtttaacg gattgacagt actaccgccg ctactaaccg
	3181 atgagatgat tgcgcagtac acgtctgctc tattggcggg aacaattaca agtggatgga
	3241 catttggagc cggtgccgct ctacaaattc cgtttgctat gcaaatggcg tacagattca
	3301 acggaatcgg agtaacccag aacgtcttgt acgagaacca gaagctaatc gcgaaccagt
	3361 tcaattccgc gatcggaaag atccaggaca gtctatcttc tactgcttcg gcgttgggaa
	3421 agctacagga tgtagtaaat caaaacgcgc aggcgctaaa caccttggtc aagcaactat
	3481 cctctaactt cggagcgatc tcgtccgtcc taaacgacat cttatccaga ctagataagg
	3541 tcgaagcgga ggtccagatc gatagactaa tcactggaag attgcagtcc ctacagacct
	3601 acgtaacaca gcaactaatt agagcggcgg agattagagc ctctgctaat ctagctgcga
	3661 ccaagatgtc cgaatgtgtc ttgggacaat ccaagagagt cgacttttgc ggaaagggat
	3721 accacctaat gtcttttcca caatctgcgc cgcatggtgt cgtattccta catgtaacat
	3781 atgtgccggc gcaagaaaag aactttacaa cagctccagc gatctgccat gatggaaaag
	3841 ctcattttcc gagagaggga gtctttgtct ctaacggaac tcattggttc gtcacccaga
	3901 gaaactttta cgagccgcag atcatcacca ccgacaacac atttgtttcg ggaaactgcg
	3961 acgtggtcat cggaatcgta aacaataccg tctacgatcc gttgcagccg gaactagact
	4021 ccttcaaaga agagttggac aagtacttta agaaccacac ctctccggat gtcgacttgg
	4081 gagatatttc tggaatcaac gcgtccgtcg tcaacatcca gaaagaaatc gatagattga
	4141 acgaggtcgc gaagaacttg aacgagtccc taatcgacct acaagagcta ggaaaatacg
	4201 agcagtacat caagtggccg tggtacattt ggctaggatt cattgctgga ctaattgcga
	4261 tcgtcatggt caccatcatg ctatgctgta tgacctcctg ttgctcctgt ctaaagggat

	4321 gttgttcctg cggatcctgt tgcaagttcg atgaagatga tagtgaaccg gtcctaaagg 4381 gtgtcaagct acactacaca taaaagcttg tcgactaaaa tagtttaact cttttaaaac 4441 cagtttggta ctggaatttc agttcattac tcgttgagaa attgatgatt tttttaaaat 4501 gatattactt ttatatgctt gcatcgcaga atgatattca caagtattat taaaaatgag 4561 tatcggtagt tacattacca tatcatccat gctcatatgg atctccatcc attatataat 4621 caatgataca tgtattaaaa tactttccga ataagtcttt taaatattgt attaattatg 4681 aaaaactatg ctatgcgagt atgatgcaaa gatgtttaat gatacgatac tagattttat 4741 ctctagcgag agatgtcgtt agaatcattt atcataacta cgtttaataa taattcatca 4801 acgaatatcg ataacatgtg tcatttatac tttaaatacg ttaaagtctg tccgtcttct 4861 ctattgttta gactgtttgt agaatgctgt gatataaaca aactagtaga aggta
Нуклеотидная последовательность левого плеча и правого плеча HPXV Дельта TK (SEQ ID NO: 62)	1 atttacggat tcaccaataa aaataaacta gagaaactta gtactaataa ggaactagaa 61 tcgtatagtt ctagccctct tcaagaaccc attaggttaa atgattttct gggactattg 121 gaatgtatta aaaagaatat tcctctaaca gatattccga caaaggattg attactataa 181 atggagaatg ttcctaatgt atactttaat cctgtgttta tagagcccac gtttaaacat 241 tctttattaa gtgtttataa acacagatta atagttttat ttgaagtatt cattgtattc 301 attctaatat atgtattttt tagatctgaa ttaaatatgt tcttcatgcc taaacgaaaa 361 atacccgatc ctattgatag attacgacgt gctaatctag cgtgtgaaga cgataagtta 421 atgatctatg gattaccatg gatgacaact caaacatctg cgttatcaat aaatagtaaa 481 ccgatagtgt ataaagattg tgcaaagctt ttgcgatcaa taaatggatc acaaccagta 541 tctcttaacg atgttcttcg cagatgatga ttcatttttt aagtatttgg ctagtcaaga 601 tgatgaatct tcattatctg atatattgca aatcactcaa tatctagact ttctgttatt 661 attattgatc caatcaaaaa ataaattaga agccgtgggt cattgttatg aatctctttc 721 agaggaatac agacaattga caaaattcac agactttcaa gattttaaaa aactgtttaa 781 caaggtccct attgttacag atggaagggt caaacttaat aaaggatatt tgttcgactt 841 tgtgattagt ttgatgcgat tcaaaaaaga atcctctcta gctaccaccg caatagatcc 901 tattagatac atagatcctc gtcgtgatat cgcattttct aacgtgatgg atatattaaa 961 gttgaataaa gtgaacaata attaattctt tattgtcatc tattatattt tttatctaaa 1021 aaactaaaaa taaacattga ttaaatttta atataatact taaaaatgga tgttgtgtcg 1081 ttagataaac cgtttatgta ttttgaggaa attgataatg agttagatta cgaaccagaa 1141 agtgcaaatg aggtcgcaaa aaaactaccg tatcaaggac agttaaaact attactagga 1201 gaattatttt ttcttagtaa gttacagcga cacggtatat tagatggtgc caccgtagtg 1261 tatataggat cggctcctgg tacacatata cgttatttga gagatcattt ctataattta 1321 ggaatgatta tcaaatggat gctaattgac ggacgccatc atgatcctat tctaaatgga 1381 ttgcgtgatg tgactctagt gactcggttc gttgatgagg aatatctacg atccatcaaa 1441 aaacaactgc atccttctaa gattatttta atttctgatg taagatccaa acgaggagga

	1501 aatgaaccta gtacggcgga tttactaagt aattacgctc tacaaaatgt catgattagt 1561 attttaaacc ccgtggcatc tagtcttaaa tggagatgcc cgtttccaga tcaatggatc 1621 aaggactttt atatcccaca cggtaataaa atgttacaac cttttgctcc ttcatattca 1681 gctgaaatga gattattaag tatttatacc ggtgagaaca tgagactgac tcgagttacc 1741 aaattagacg ctgtaaatta tgaaaaaaag atgtactacc ttaataagat cgtccgtaac 1801 aaagtagttg ttaactttga ttatcctaat caggaatatg actattttca catgtacttt 1861 atgctgagga ccgtatactg caataaaaca tttcctacta ctaaagcaaa ggtactattt 1921 ctacaacaat ctatatttcg tttcttaaat attccaacaa catcaactga aaaagttagt 1981 catgaaccaa tacaacgtaa
Нуклеотидная последовательность HPXV_COVID-19_Spike_Delta_T5NT (SEQ ID NO: 63)	1 atttacggat tcaccaataa aaataaacta gagaaactta gtactaataa ggaactagaa 61 tcgtatagtt ctagccctct tcaagaaccc attaggttaa atgattttct gggactattg 121 gaatgtatta aaaagaatat tcctctaaca gatattccga caaaggattg attactataa 181 atggagaatg ttcctaatgt atactttaat cctgtgttta tagagcccac gtttaaacat 241 tctttattaa gtgtttataa acacagatta atagttttat ttgaagtatt cattgtattc 301 attctaatat atgtattttt tagatctgaa ttaaatatgt tcttcatgcc taaacgaaaa 361 atacccgatc ctattgatag attacgacgt gctaatctag cgtgtgaaga cgataagtta 421 atgatctatg gattaccatg gatgacaact caaacatctg cgttatcaat aaatagtaaa 481 ccgatagtgt ataaagattg tgcaaagctt ttgcgatcaa taaatggatc acaaccagta 541 tctcttaacg atgttcttcg cagatgatga ttcatttttt aagtatttgg ctagtcaaga 601 tgatgaatct tcattatctg atatattgca aatcactcaa tatctagact ttctgttatt 661 attattgatc caatcaaaaa ataaattaga agccgtgggt cattgttatg aatctctttc 721 agaggaatac agacaattga caaaattcac agactttcaa gattttaaaa aactgtttaa 781 caaggtccct attgttacag atggaagggt caaacttaat aaaggatatt tgttcgactt 841 tgtgattagt ttgatgcgat tcaaaaaaga atcctctcta gctaccaccg caatagatcc 901 tattagatac atagatcctc gtcgtgatat cgcattttct aacgtgatgg atatattaaa 961 gttgaataaa gtgaacaata attaattctt tattgtcatc ttttattttt ttttttgga 1021 atataaatat ccggtaaaat tgaaaaaata tacactaatt agcgtctcgt ttcagacgct 1081 agctcgaggt tgggagctct ccggatccaa gcttatcgat ttcgaacccg gggtaccgaa 1141 ttcctcgagg ttgggagctc tccggatcca agcttatcga tttcgaaccc ggggtaccga 1201 attcctcgag atgtttgttt tccttgtttt attgccacta gtctctagtc agtgtgttaa 1261 tcttacaacc agaactcaat taccccctgc atacactaat tctttcacac gtggtgttta 1321 ttaccctgac aaagttttca gatcctcagt tttacattca actcaggact tgttcttacc 1381 tttcttttcc aatgttactt ggttccatgc tatacatgtc tctgggacca atggtactaa 1441 gaggtttgat aaccctgtcc taccatttaa tgatggtgtt tattttgctt ccactgagaa 1501 gtctaacata ataagaggct ggatttttgg tactacttta gattcgaaga cccagtccct

	1561 acttattgtt aataacgcta ctaatgttgt tattaaagtc tgtgaatttc aattttgtaa
	1621 tgatccattt ttgggtgttt attaccacaa aaacaacaaa agttggatgg aaagtgagtt
	1681 cagagtttat tctagtgcga ataattgcac ttttgaatat gtctctcagc cttttcttat
	1741 ggaccttgaa ggaaaacagg gtaatttcaa aaatcttagg gaatttgtgt ttaagaatat
	1801 tgatggttat tttaaaatat attctaagca cacgcctatt aatttagtgc gtgatctccc
	1861 tcagggtttt tcggctttag aaccattggt agatttgcca ataggtatta acatcactag
	1921 gtttcaaact ttacttgctt tacatagaag ttatttgact cctggtgatt cttcttcagg
	1981 ttggacagct ggtgctgcag cttattatgt gggttatctt caacctagga cttttctatt
	2041 aaaatataat gaaaatggaa ccattacaga tgctgtagac tgtgcacttg accctctctc
	2101 agaaacaaag tgtacgttga aatccttcac tgtagaaaaa ggaatctatc aaacttctaa
	2161 ctttagagtc caaccaacag aatctattgt tagatttcct aatattacaa acttgtgccc
	2221 ttttggtgaa gtttttaacg ccaccagatt tgcatctgtt tatgcttgga acaggaagag
	2281 aatcagcaac tgtgttgctg attattctgt cctatataat tccgcatcat tttccacttt
	2341 taagtgttat ggagtgtctc ctactaaatt aaatgatctc tgctttacta atgtctatgc
	2401 agattcattt gtaattagag gtgatgaagt cagacaaatc gctccagggc aaactggaaa
	2461 gattgctgat tataattata aattaccaga tgattttaca ggctgcgtta tagcttggaa
	2521 ttctaacaat cttgattcta aggttggtgg taattataat tacctgtata gattgtttag
	2581 gaagtctaat ctcaaacctt ttgagagaga tatttcaact gaaatctatc aggccggtag
	2641 cacaccttgt aatggtgttg aaggttttaa ttgttacttt cctttacaat catatggttt
	2701 ccaacccact aatggtgttg gttaccaacc atacagagta gtagtacttt cttttgaact
	2761 tctacatgca ccagcaactg tttgtggacc taaaaagtct actaatttgg ttaaaaacaa
	2821 atgtgtcaat ttcaacttca atggtttaac aggcacaggt gttcttactg agtctaacaa
	2881 aaagtttctg cctttccaac aatttggcag agacattgct gacactactg atgctgtccg
	2941 tgatccacag acacttgaga ttcttgacat tacaccatgt tcttttggtg gtgtcagtgt
	3001 tataacacca ggaacaaata cttctaacca ggttgctgtt ctttatcagg atgttaactg
	3061 cacagaagtc cctgttgcta ttcatgcaga tcaacttact cctacttggc gtgtttattc
	3121 tacaggttct aatgtttttc aaacacgtgc aggctgttta ataggggctg aacatgtcaa
	3181 caactcatat gagtgtgaca tacccattgg tgcaggtata tgcgctagtt atcagactca
	3241 gactaattct cctcggcggg cacgtagtgt agctagtcaa tccatcattg cctacactat
	3301 gtcacttggt gcagaaaatt cagttgctta ctctaataac tctattgcca tacccacaaa
	3361 ttttactatt agtgttacca cagaaattct accagtgtct atgaccaaga catcagtaga
	3421 ttgtacaatg tacatttgtg gtgattcaac tgaatgcagc aatcttttgt tgcaatatgg
	3481 cagtttctgt acacaattaa accgtgcttt aactggaata gctgttgaac aagacaaaaa
	3541 cacccaagaa gtttttgcac aagtcaaaca aatttacaaa acaccaccaa ttaaagattt
	3601 tggtggtttt aatttttcac aaatattacc agatccatca aaaccaagca agaggtcatt

	3661 tattgaagat ctacttttca acaaagtgac acttgcagat gctggcttca tcaaacaata
	3721 tggtgattgc cttggtgata ttgctgctag agacctcatt tgtgcacaaa agtttaacgg
	3781 ccttactgtt ttgccacctt tgctcacaga tgaaatgatt gctcaataca cttctgcact
	3841 gttagcgggt acaatcactt ctggttggac ctttggtgca ggtgctgcat tacaaatacc
	3901 atttgctatg caaatggctt ataggtttaa tggtattgga gttacacaga atgttctcta
	3961 tgagaaccaa aaattgattg ccaaccaatt taatagtgct attggcaaaa ttcaagactc
	4021 actttcttcc acagcaagtg cacttggaaa acttcaagat gtggtcaacc aaaatgcaca
	4081 agctttaaac acgcttgtta aacaacttag ctccaatttt ggtgcaattt caagtgtttt
	4141 aaatgatatc ctttcacgtc ttgacaaagt tgaggctgaa gtgcaaattg ataggttgat
	4201 cacaggcaga cttcaaagtt tgcagacata tgtgactcaa caattaatta gagctgcaga
	4261 aatcagagct tctgctaatc ttgctgctac taaaatgtca gagtgtgtac ttggacaatc
	4321 aaaaagagtt gatttctgtg gaaagggcta tcatcttatg tccttccctc agtcagcacc
	4381 tcatggtgta gtcttcttgc atgtgactta tgtccctgca caagaaaaga acttcacaac
	4441 tgctcctgcc atttgtcatg atggaaaagc acactttcct cgtgaaggtg tctttgtttc
	4501 aaatggcaca cactggtttg taacacaaag gaacttttat gaaccacaaa tcattactac
	4561 agacaacaca tttgtgtctg gtaactgtga tgttgtaata ggaattgtca acaacacagt
	4621 ttatgatcct ttgcaacctg aattagactc attcaaggag gagttagata aatattttaa
	4681 gaatcataca tcaccagatg ttgatttagg tgacatctct ggcattaatg cttcagttgt
	4741 aaacattcaa aaagaaattg accgcctcaa tgaggttgcc aagaatttaa atgaatctct
	4801 catcgatctc caagaacttg gaaagtatga gcagtatata aaatggccat ggtacatttg
	4861 gctaggtttt atagctggct tgattgccat agtaatggtg acaattatgc tttgctgtat
	4921 gaccagttgc tgtagttgtc tcaagggctg ttgttcttgt ggatcctgct gcaaatttga
	4981 tgaagacgac tctgagccag tgctcaaagg agtcaaatta cattacacat aatattatat
	5041 tttttatcta aaaaactaaa aataaacatt gattaaattt taatataata cttaaaaatg
	5101 gatgttgtgt cgttagataa accgtttatg tattttgagg aaattgataa tgagttagat
	5161 tacgaaccag aaagtgcaaa tgaggtcgca aaaaaactac cgtatcaagg acagttaaaa
	5221 ctattactag gagaattatt ttttcttagt aagttacagc gacacggtat attagatggt
	5281 gccaccgtag tgtatatagg atcggctcct ggtacacata tacgttattt gagagatcat
	5341 ttctataatt taggaatgat tatcaaatgg atgctaattg acggacgcca tcatgatcct
	5401 attctaaatg gattgcgtga tgtgactcta gtgactcggt tcgttgatga ggaatatcta
	5461 cgatccatca aaaaacaact gcatccttct aagattattt taatttctga tgtaagatcc
	5521 aaacgaggag gaaatgaacc tagtacggcg gatttactaa gtaattacgc tctacaaaat
	5581 gtcatgatta gtattttaaa ccccgtggca tctagtctta aatggagatg cccgtttcca
	5641 gatcaatgga tcaaggactt ttatatccca cacggtaata aaatgttaca acctttgct
	5701 ccttcatatt cagctgaaat gagattatta agtatttata ccggtgagaa catgagactg

	5761 actcgagtta ccaaattaga cgctgtaaat tatgaaaaaa agatgtacta ccttaataag 5821 atcgtccgta acaaagtagt tgttaacttt gattatccta atcaggaata tgactatttt 5881 cacatgtact ttatgctgag gaccgtatac tgcaataaaa catttcctac tactaaagca 5941 aaggtactat ttctacaaca atctatattt cgtttcttaa atattccaac aacatcaact 6001 gaaaaagtta gtcatgaacc aatacaacgt aa
Нуклеотидная последовательность HPXV_SARS_Ad_Spike_Delta_T5NT (SEQ ID NO: 64)	1 atttacggat tcaccaataa aaataaacta gagaaactta gtactaataa ggaactagaa 61 tcgtatagtt ctagccctct tcaagaaccc attaggttaa atgattttct gggactattg 121 gaatgtatta aaaagaatat tcctctaaca gatattccga caaaggattg attactataa 181 atggagaatg ttcctaatgt atactttaat cctgtgttta tagagcccac gtttaaacat 241 tctttattaa gtgtttataa acacagatta atagttttat ttgaagtatt cattgtattc 301 attctaatat atgtattttt tagatctgaa ttaaatatgt tcttcatgcc taaacgaaaa 361 atacccgatc ctattgatag attacgacgt gctaatctag cgtgtgaaga cgataagtta 421 atgatctatg gattaccatg gatgacaact caaacatctg cgttatcaat aaatagtaaa 481 ccgatagtgt ataaagattg tgcaaagctt ttgcgatcaa taaatggatc acaaccagta 541 tctcttaacg atgttcttcg cagatgatga ttcatttttt aagtatttgg ctagtcaaga 601 tgatgaatct tcattatctg atatattgca aatcactcaa tatctagact ttctgttatt 661 attattgatc caatcaaaaa ataaattaga agccgtgggt cattgttatg aatctctttc 721 agaggaatac agacaattga caaaattcac agactttcaa gattttaaaa aactgtttaa 781 caaggtccct attgttacag atggaagggt caaacttaat aaaggatatt tgttcgactt 841 tgtgattagt ttgatgcgat tcaaaaaaga atcctctcta gctaccaccg caatagatcc 901 tattagatac atagatcctc gtcgtgatat cgcattttct aacgtgatgg atatattaaa 961 gttgaataaa gtgaacaata attaattctt tattgtcatc ttttattttt ttttttgga 1021 atataaatat ccggtaaaat tgaaaaaata tacactaatt agcgtctcgt ttcagacgct 1081 agctcgaggt tgggagctct ccggatccaa gcttatcgat ttcgaacccg gggtaccgaa 1141 ttcctcgagg ttgggagctc tccggatcca agcttatcga tttcgaaccc ggggtaccga 1201 attcctcgag atgtttattt tcttattatt tcttactctc actagtggta gtgaccttga 1261 ccggtgcacc acttttgatg atgttcaagc tcctaattac actcaacata cttcatctat 1321 gaggggggtt tactatcctg atgaaatttt tagatcagac actctttatt taactcagga 1381 tttatttctt ccattttatt ctaatgttac agggtttcat actattaatc atacgtttgg 1441 caaccctgtc atacctttta aggatggtat ttattttgct gccacagaga aatcaaatgt 1501 tgtccgtggt tgggtttttg gttctaccat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat 1561 taacaattct actaatgttg ttatacgagc atgtaacttt gaattgtgtg acaacccttt 1621 ctttgctgtt tctaaaccca tgggtacaca gacacatact atgatattcg ataatgcatt 1681 taattgcact ttcgagtaca tatctgatgc cttttcgctt gatgtttcag aaaagtcagg 1741 taattttaaa cacttacgag agtttgtgtt taaaaataaa gatgggtttc tctatgttta

	1801 taagggctat caacctatag atgtagttcg tgatctacct tctggtttta acactttgaa 1861 acctattttt aagttgcctc ttggtattaa cattacaaat tttagagcca ttcttacagc 1921 cttttcacct gctcaagaca tttggggcac gtcagctgca gcctattttg ttggctattt 1981 aaagccaact acatttatgc tcaagtatga tgaaaatggt acaatcacag atgctgttga 2041 ttgttctcaa aatccacttg ctgaactcaa atgctctgtt aagagctttg agattgacaa 2101 aggaatttac cagacctcta atttcagggt tgttccctca ggagatgttg tgagattccc 2161 taatattaca aacttgtgtc cttttggaga ggtttttaat gctactaaat tcccttctgt 2221 ctatgcatgg gagagaaaaa aaatttctaa ttgtgttgct gattactctg tgctctacaa 2281 ctcaacattc ttttcaacct ttaagtgcta tggcgtttct gccactaagt tgaatgatct 2341 ttgcttctcc aatgtctatg cagattcttt tgtagtcaag ggagatgatg taagacaaat 2401 agcgccagga caaactggtg ttattgctga ttataattat aaattgccag atgatttcat 2461 gggttgtgtc cttgcttgga atactaggaa cattgatgct acttcaactg gtaatcataa 2521 ttataaatat aggtatctta gacatggcaa gcttaggccc tttgagagag acatatctaa 2581 tgtgcctttc tcccctgatg gcaaaccttg caccccacct gctcttaatt gttattggcc 2641 attaaatgat tatggttttt acaccactac tggcattggc taccaacctt acagagttgt 2701 agtactttct tttgaacttt taaatgcacc ggccacggtt tgtggaccaa aattatccac 2761 tgaccttatt aagaaccagt gtgtcaattt taattttaat ggactcactg gtactggtgt 2821 gttaactcct tcttcaaaga gatttcaacc atttcaacaa tttggccgtg atgtttctga 2881 tttcactgat tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata ttagacattt caccttgctc 2941 ttttgggggt gtaagtgtaa ttacacctgg aacaaatgct tcatctgaag ttgctgttct 3001 atatcaagat gttaactgca ctgatgtttc tacagcaatt catgcagatc aactcacacc 3061 agcttggcgc atatattcta ctggaaacaa tgtattccag actcaagcag gctgtcttat 3121 aggagctgag catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt cctattggag ctggcatttg 3181 tgctagttac catacagttt ctttattacg tagtactagc caaaaatcta ttgtggctta 3241 tactatgtct ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct aataacacca ttgctatacc 3301 tactaacttt tcaattagca ttactacaga agtaatgcct gtttctatgg ctaaaacctc 3361 cgtagattgt aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa tgtgctaatt tgcttctcca 3421 atatggtagc ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga 3481 tcgcaacaca cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaaatg tacaaaaccc caactttgaa 3541 atattttggt ggttttaatt tttcacaaat attacctgac cctctaaagc caactaagag 3601 gtcttttatt gaggacttgc tctttaataa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa 3661 gcaatatggc gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat ctcatttgtg cgcagaagtt 3721 caatggactt acagtgttgc cacctctgct cactgatgat atgattgctg cctacactgc 3781 tgctctagtt agtggtactg ccactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctcttca 3841 aatacctttt gctatgcaaa tggcatatag gttcaatggc attggagtta cccaaaatgt

	3901 tctctatgag aaccaaaaac aaatcgccaa ccaatttaac aaggcgatta gtcaaattca 3961 agaatcactt acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgttg ttaaccagaa 4021 tgctcaagca ttaaacacac ttgttaaaca acttagctct aattttggtg caatttcaag 4081 tgtgctaaat gatatccttt cgcgacttga taaagtcgag gcggaggtac aaattgacag 4141 gttaattaca ggcagacttc aaagccttca aacctatgta acacaacaac taatcagggc 4201 tgctgaaatc agggcttctg ctaatcttgc tgctactaaa atgtctgagt gtgttcttgg 4261 acaatcaaaa agagttgact tttgtggaaa gggctaccac cttatgtcct tcccacaagc 4321 agccccgcat ggtgttgtct tcctacatgt cacgtatgtg ccatcccagg agaggaactt 4381 caccacagcg ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac ttccctcgtg aaggtgtttt 4441 cgtgtttaat ggcacttctt ggtttattac acagaggaac ttcttttctc cacaaataat 4501 tactacagac aatacatttg tctcaggaaa ttgtgatgtc gttattggca tcattaacaa 4561 cacagtttat gatcctctgc aacctgagct cgactcattc aaagaagagc tggacaagta 4621 cttcaaaaat catacatcac cagatgttga tcttggcgac atttcaggca ttaacgcttc 4681 tgtcgtcaac attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gtcgctaaaa atttaaatga 4741 atcactcatt gaccttcaag aattgggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta 4801 tgtttggctc ggcttcattg ctggactaat tgccatcgtc atggttacaa tcttgctttg 4861 ttgcatgact agttgttgca gttgcctcaa gggtgcatgc tcttgtggtt cttgctgcaa 4921 gtttgatgag gatgactctg agccagttct caagggtgtc aaattacatt acacataata 4981 ttatattttt tatctaaaaa actaaaaata aacattgatt aaattttaat ataatactta 5041 aaaatggatg ttgtgtcgtt agataaaccg tttatgtatt ttgaggaaat tgataatgag 5101 ttagattacg aaccagaaag tgcaaatgag gtcgcaaaaa aactaccgta tcaaggacag 5161 ttaaaactat tactaggaga attatttttt cttagtaagt tacagcgaca cggtatatta 5221 gatggtgcca ccgtagtgta tataggatcg gctcctggta cacatatacg ttatttgaga 5281 gatcatttct ataatttagg aatgattatc aaatggatgc taattgacgg acgccatcat 5341 gatcctattc taaatggatt gcgtgatgtg actctagtga ctcggttcgt tgatgaggaa 5401 tatctacgat ccatcaaaaa acaactgcat ccttctaaga ttattttaat ttctgatgta 5461 agatccaaac gaggaggaaa tgaacctagt acggcggatt tactaagtaa ttacgctcta 5521 caaaatgtca tgattagtat tttaaacccc gtggcatcta gtcttaaatg gagatgcccg 5581 tttccagatc aatggatcaa ggacttttat atcccacacg gtaataaaat gttacaacct 5641 tttgctcctt catattcagc tgaaatgaga ttattaagta tttataccgg tgagaacatg 5701 agactgactc gagttaccaa attagacgct gtaaattatg aaaaaaagat gtactacctt 5761 aataagatcg tccgtaacaa agtagttgtt aactttgatt atcctaatca ggaatatgac 5821 tattttcaca tgtactttat gctgaggacc gtatactgca ataaaacatt tcctactact 5881 aaagcaaagg tactatttct acaacaatct atatttcgtt tcttaaatat tccaacaaca 5941 tcaactgaaa aagttagtca tgaaccaata caacgtaa

Нуклеотидная последовательность synVACV_SARS_Ad_Spike_deltaT5NT (SEQ ID NO: 65)	1 atttacggat tcaccaataa aaataaacta gagaaactta gtactaataa ggaactagaa 61 tcgtatagtt ctagccctct tcaagaaccc attaggttaa atgattttct gggactattg 121 gaatgtgtta aaaagaatat tcctctaaca gatattccga caaaggattg attactataa 181 atggagaatg ttcctaatgt atactttaat cctgtgttta tagagcccac gtttaaacat 241 tctttattaa gtgtttataa acacagatta atagttttat ttgaagtatt cgttgtattc 301 attctaatat atgtattttt tagatctgaa ttaaatatgt tcttcatgcc taaacgaaaa 361 atacccgatc ctattgatag attacgacgt gctaatctag cgtgtgaaga cgataaatta 421 atgatctatg gattaccatg gatgacaact caaacatctg cgttatcaat aaatagtaaa 481 ccgatagtgt ataaagattg tgcaaagctt ttgcgatcaa taaatggatc acaaccagta 541 tctcttaacg atgttcttcg cagatgatga ttcatttttt aagtatttgg ctagtcaaga 601 tgatgaatct tcattatctg atatattgca aatcactcaa tatctagact ttctgttatt 661 attattgatc caatcaaaaa ataaattaga agccgtgggt cattgttatg aatctctttc 721 agaggaatac agacaattga caaaattcac agactctcaa gattttaaaa aactgtttaa 781 caaggtccct attgttacag atggaagggt caaacttaat aaaggatatt tgttcgactt 841 tgtgattagt ttgatgcgat tcaaaaaaga atcagctcta gctaccaccg caatagatcc 901 tgttagatac atagatcctc gtcgcgatat cgcattttct aacgtgatgg atatattaaa 961 gtcgaataaa gtgaacaata attaattctt tattgtcatc ttttattttt ttttttgga 1021 atataaatat ccggtaaaat tgaaaaaata tacactaatt agcgtctcgt ttcagacgct 1081 agctcgaggt tgggagctct ccggatccaa gcttatcgat ttcgaacccg gggtaccgaa 1141 ttcctcgagg ttgggagctc tccggatcca agcttatcga tttcgaaccc ggggtaccga 1201 attcctcgag atgtttattt tcttattatt tcttactctc actagtggta gtgaccttga 1261 ccggtgcacc acttttgatg atgttcaagc tcctaattac actcaacata cttcatctat 1321 gagggggggtt tactatcctg atgaaatttt tagatcagac actctttatt taactcagga 1381 tttatttctt ccattttatt ctaatgttac agggtttcat actattaatc atacgtttgg 1441 caaccctgtc atacctttta aggatggtat ttattttgct gccacagaga aatcaaatgt 1501 tgtccgtggt tgggtttttg gttctaccat gaacaacaag tcacagtcgg tgattattat 1561 taacaattct actaatgttg ttatacgagc atgtaacttt gaattgtgtg acaacccttt 1621 ctttgctgtt tctaaaccca tgggtacaca gacacatact atgatattcg ataatgcatt 1681 taattgcact ttcgagtaca tatctgatgc cttttcgctt gatgtttcag aaaagtcagg 1741 taattttaaa cacttacgag agtttgtgtt taaaaataaa gatgggtttc tctatgttta 1801 taagggctat caacctatag atgtagttcg tgatctacct tctggtttta acactttgaa 1861 acctatttttt aagttgcctc ttggtattaa cattacaaat tttagagcca ttcttacagc 1921 cttttcacct gctcaagaca tttggggcac gtcagctgca gcctattttg ttggctattt 1981 aaagccaact acatttatgc tcaagtatga tgaaaatggt acaatcacag atgctgttga 2041 ttgttctcaa aatccacttg ctgaactcaa atgctctgtt aagagctttg agattgacaa

	2101 aggaatttac cagacctcta atttcagggt tgttccctca ggagatgttg tgagattccc 2161 taatattaca aacttgtgtc cttttggaga ggtttttaat gctactaaat tcccttctgt 2221 ctatgcatgg gagagaaaaa aaatttctaa ttgtgttgct gattactctg tgctctacaa 2281 ctcaacattc ttttcaacct ttaagtgcta tggcgtttct gccactaagt tgaatgatct 2341 ttgcttctcc aatgtctatg cagattcttt tgtagtcaag ggagatgatg taagacaaat 2401 agcgccagga caaactggtg ttattgctga ttataattat aaattgccag atgatttcat 2461 gggttgtgtc cttgcttgga atactaggaa cattgatgct acttcaactg gtaatcataa 2521 ttataaatat aggtatctta gacatggcaa gcttaggccc tttgagagag acatatctaa 2581 tgtgcctttc tcccctgatg gcaaaccttg caccccacct gctcttaatt gttattggcc 2641 attaaatgat tatggttttt acaccactac tggcattggc taccaacctt acagagttgt 2701 agtactttct tttgaacttt taaatgcacc ggccacggtt tgtggaccaa aattatccac 2761 tgaccttatt aagaaccagt gtgtcaattt taattttaat ggactcactg gtactggtgt 2821 gttaactcct tcttcaaaga gatttcaacc atttcaacaa tttggccgtg atgtttctga 2881 tttcactgat tccgttcgag atcctaaaac atctgaaata ttagacattt caccttgctc 2941 ttttgggggt gtaagtgtaa ttacacctgg aacaaatgct tcatctgaag ttgctgttct 3001 atatcaagat gttaactgca ctgatgtttc tacagcaatt catgcagatc aactcacacc 3061 agcttggcgc atatattcta ctggaaacaa tgtattccag actcaagcag gctgtcttat 3121 aggagctgag catgtcgaca cttcttatga gtgcgacatt cctattggag ctggcatttg 3181 tgctagttac catacagttt ctttattacg tagtactagc caaaaatcta ttgtggctta 3241 tactatgtct ttaggtgctg atagttcaat tgcttactct aataacacca ttgctatacc 3301 tactaacttt tcaattagca ttactacaga agtaatgcct gtttctatgg ctaaaacctc 3361 cgtagattgt aatatgtaca tctgcggaga ttctactgaa tgtgctaatt tgcttctcca 3421 atatggtagc ttttgcacac aactaaatcg tgcactctca ggtattgctg ctgaacagga 3481 tcgcaacaca cgtgaagtgt tcgctcaagt caaacaaatg tacaaaaccc caactttgaa 3541 atattttggt ggttttaatt tttcacaaat attacctgac cctctaaagc caactaagag 3601 gtcttttatt gaggacttgc tctttaataa ggtgacactc gctgatgctg gcttcatgaa 3661 gcaatatggc gaatgcctag gtgatattaa tgctagagat ctcatttgtg cgcagaagtt 3721 caatggactt acagtgttgc cacctctgct cactgatgat atgattgctg cctacactgc 3781 tgctctagtt agtggtactg ccactgctgg atggacattt ggtgctggcg ctgctcttca 3841 aataccttt gctatgcaaa tggcatatag gttcaatggc attggagtta cccaaaatgt 3901 tctctatgag aaccaaaaac aaatcgccaa ccaatttaac aaggcgatta gtcaaattca 3961 agaatcactt acaacaacat caactgcatt gggcaagctg caagacgttg ttaaccagaa 4021 tgctcaagca ttaaacacac ttgttaaaca acttagctct aattttggtg caatttcaag 4081 tgtgctaaat gatatccttt cgcgacttga taaagtcgag gcggaggtac aaattgacag 4141 gttaattaca ggcagacttc aaagccttca aacctatgta acacaacaac taatcagggc

	4201 tgctgaaatc agggcttctg ctaatcttgc tgctactaaa atgtctgagt gtgttcttgg 4261 acaatcaaaa agagttgact tttgtggaaa gggctaccac cttatgtcct tcccacaagc 4321 agccccgcat ggtgttgtct tcctacatgt cacgtatgtg ccatcccagg agaggaactt 4381 caccacagcg ccagcaattt gtcatgaagg caaagcatac ttccctcgtg aaggtgtttt 4441 cgtgtttaat ggcacttctt ggtttattac acagaggaac ttcttttctc cacaaataat 4501 tactacagac aatacatttg tctcaggaaa ttgtgatgtc gttattggca tcattaacaa 4561 cacagtttat gatcctctgc aacctgagct cgactcattc aaagaagagc tggacaagta 4621 cttcaaaaat catacatcac cagatgttga tcttggcgac atttcaggca ttaacgcttc 4681 tgtcgtcaac attcaaaaag aaattgaccg cctcaatgag gtcgctaaaa atttaaatga 4741 atcactcatt gaccttcaag aattgggaaa atatgagcaa tatattaaat ggccttggta 4801 tgtttggctc ggcttcattg ctggactaat tgccatcgtc atggttacaa tcttgctttg 4861 ttgcatgact agttgttgca gttgcctcaa gggtgcatgc tcttgtggtt cttgctgcaa 4921 gtttgatgag gatgactctg agccagttct caagggtgtc aaattacatt acacataata 4981 ttatattttt tatctaaaaa actaaaaata aacattgatt aaattttaat ataatactta 5041 aaaatggatg ttgtgtcgtt agataaaccg tttatgtatt ttgaggaaat tgataatgag 5101 ttagattacg aaccagaaag tgcaaatgag gtcgcaaaaa aactgccgta tcaaggacag 5161 ttaaaactat tactaggaga attatttttt cttagtaagt tacagcgaca cggtatatta 5221 gatggtgcca ccgtagtgta tataggatct gctcccggta cacatatacg ttatttgaga 5281 gatcatttct ataatttagg agtgatcatc aaatggatgc taattgacgg ccgccatcat 5341 gatcctattt taaatggatt gcgtgatgtg actctagtga ctcggttcgt tgatgaggaa 5401 tatctacgat ccatcaaaaa acaactgcat ccttctaaga ttattttaat ttctgatgtg 5461 agatccaaac gaggaggaaa tgaacctagt acggcggatt tactaagtaa ttacgctcta 5521 caaaatgtca tgattagtat tttaaacccc gtggcatcta gtcttaaatg gagatgcccg 5581 tttccagatc aatggatcaa ggacttttat atcccacacg gtaataaaat gttacaacct 5641 tttgctcctt catattcagc tgaaatgaga ttattaagta tttataccgg tgagaacatg 5701 agactgactc gagttaccaa attagacgct gtaaattatg aaaaaaagat gtactacctt 5761 aataagatcg tccgtaacaa agtagttgtt aactttgatt atcctaatca ggaatatgac 5821 tattttcaca tgtactttat gctgaggacc gtgtactgca ataaaacatt tcctactact 5881 aaagcaaagg tactatttct acaacaatct atatttcgtt tcttaaatat tccaacaaca 5941 tcaactgaaa aagttagtca tgaaccaata caacgtaa

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение синтетического вируса оспы лошадей

[0118] Синтетический вирус оспы лошадей (scHPXV) получают способами, описанными в патентной заявке США № 2018/0251736, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0119] Дизайн синтетического генома HPXV основан на ранее описанной последовательности генома HPXV (штамм MNR-76; регистрационный номер GenBank DQ792504) (Tulman ER, Delhon G, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, et al. Genome of horsepox virus. Journal of virology. 2006;80(18):9244-58). Геном размером 212633 п.н. разделяют на 10 перекрывающихся фрагментов. Эти фрагменты конструируют таким образом, что они обладают общей перекрывающейся последовательностью по меньшей мере 1,0 т.п.н. (т.е. гомологией) с каждым смежным фрагментом, для получения участков, где гомологичная рекомбинация будет запускать сборку полноразмерных геномов. Полученные фрагменты приведены в таблице 2. Эти перекрывающиеся последовательности будут обеспечивать достаточную гомологию для точного осуществления рекомбинации между котрансфицированными фрагментами.

Таблица 2: Фрагменты генома HPXV для использования для получения синтетического HPXV. Указаны размер каждого фрагмента и локализация в геноме HPXV.

Название фрагмента	Размер (п.н.)	Локализация в HPXV [DQ792504] (п.н.)
GA_левый ITR (SEQ ID NO: 15)	10095	41-10135
GA_фрагмент 1A (SEQ ID NO: 16)	16257	8505-24761
GA_фрагмент 1B (SEQ ID NO: 17)	16287	23764-40050
GA_фрагмент 2 (SEQ ID NO: 18)	31946	38705-70650
GA_фрагмент 3 (SEQ ID NO: 19)	25566	68608-94,173
GA_фрагмент 4 (SEQ ID NO: 20)	28662	92587-121248
GA_фрагмент 5 (SEQ ID NO: 21)	30252	119577-149828
GA_фрагмент 6 (SEQ ID NO: 22)	30000	147651-177650
GA_фрагмент 7 (SEQ ID NO: 23)	28754	176412-205165
GA_правый ITR (SEQ ID NO: 24)	8484	204110-212593

[0120] Полученный синтетический HPXV депонирован в GenBank под регистрационным номером KY349117.

[0121] Кассету yfp/gpt под контролем раннего/позднего промотора поксвируса встраивают в локус HPXV095/J2R в GA_фрагмент_3, таким образом, что реактивацию HPXV (scHPXV YFP-gpt::095) будет легко визуализировать под флуоресцентным микроскопом. Ранее описана SFV-катализируемая рекомбинация и реактивация ДНК поксвируса для сборки рекомбинантных поксвирусов (Yao XD et al. Journal of virology. 2003;77(13):7281-90; и Yao XD et al. Methods Mol Biol. 2004;269:51-64; содержание каждой из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Несколько биологических признаков делают это привлекательной модельной системой. Во-первых, SFV имеет узкий диапазон хозяев, продуктивно инфицируя клетки кролика и некоторые линии клеток обезьян, подобные BGMK. Он может инфицировать, но очень

плохо растет на клетках, подобных BSC-40. Во-вторых, он растет медленнее ортопоксвирусов, при этом образование трансформированных "фокусов" в монослоях клеток занимает приблизительно 4-5 дней, что представляет собой характеристику, очень отличающуюся от ортопоксвирусов, продуцирующих бляшки в течение 1-2 дней культивирования. Это различие в росте между лепоripоксвирусами и ортопоксвирусами делает возможной дифференциацию этих вирусов посредством осуществления анализов реактивации в клетках BGMK и высевания потомства на клетки BSC-40. В некоторых вариантах осуществления можно использовать другие вирусы-помощники (в качестве неограничивающих примеров, такие как вирус куриной оспы). В некоторых вариантах осуществления можно использовать другие комбинации клеток.

[0122] Клетки BGMK инфицируют SFV с MOI 0,5, а затем трансфицируют с использованием 5 мкг расщепленных фрагментов GA_HPXV через 2 ч. Через пять дней после трансфекции все инфекционные частицы выделяют посредством лизиса клеток и повторно высевают на клетки BSC-40, эффективно поддерживающие только рост HPXV. Полученные бляшки реактивированного scHPXV YFP-gpt::095 визуализируют с помощью флуоресцентного микроскопа. Визуализация возможна благодаря селективному маркеру yfp/gpt в локусе HPXV095/J2R во фрагменте_3. Бляшки вируса определяют в монослоях BSC-40 в течение 48 ч. после трансфекции. Эффективность выделения scHPXV YFP-gpt::095 зависит от ряда факторов, включая эффективность трансфекции ДНК, но находится в диапазоне до нескольких БОЕ/мкг трансфицированной ДНК.

[0123] Кассету yfp/gpt под контролем раннего/позднего промотора поксвируса также встраивают в локус HPXV200 в GA_фрагмент_7, таким образом, что реактивацию HPXV (scHPXV YFP-gpt::200) будет легко визуализировать с помощью флуоресцентного микроскопа. Ранее описана SFV-катализируемая рекомбинация и реактивация ДНК поксвируса для сборки рекомбинантных поксвирусов (Yao XD et al. Journal of virology. 2003;77(13):7281-90; и Yao XD et al. Methods Mol Biol. 2004;269:51-64; содержание каждой из которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Несколько биологических признаков делают это привлекательной модельной системой. Во-первых, SFV имеет узкий диапазон организмов-носителей, продуктивно инфицируя клетки кролика и некоторые линии клеток обезьян, подобные BGMK. Он может инфицировать, но очень плохо растет на клетках, подобных BSC-40. Во-вторых, он растет медленнее ортопоксвирусов, при этом образование трансформированных "фокусов" в монослоях клеток занимает приблизительно 4-5 дней, что представляет собой характеристику, очень отличающуюся от ортопоксвирусов, продуцирующих бляшки в течение 1-2 дней культивирования. Это различие в росте между лепоripоксвирусами и ортопоксвирусами делает возможной дифференциацию этих вирусов посредством осуществления анализов реактивации в клетках BGMK и высевания потомства на клетки BSC-40. В некоторых вариантах осуществления можно использовать другие вирусы-помощники (в качестве неограничивающих примеров, такие как вирус куриной оспы). В некоторых вариантах осуществления можно использовать другие комбинации клеток.

[0124] Клетки BGMK инфицируют SFV с MOI 0,5, а затем трансфицируют с использованием 5 мкг расщепленных фрагментов GA_HPXV через 2 часа. Через пять дней после трансфекции все инфекционные частицы выделяют посредством лизиса клеток и повторно высевают на клетки BSC-40, эффективно поддерживающие только рост HPXV. Полученные бляшки реактивированного scHPXV YFP-gpt::200 визуализируют с помощью флуоресцентного микроскопа. Визуализация возможна благодаря селективному маркеру yfp/gpt в локусе HPXV200 во фрагменте_7. Бляшки вируса определяют в монослоях BSC-40 в течение 48 часов после трансфекции. Эффективность выделения scHPXV YFP-gpt::200 зависит от ряда факторов, включая эффективность трансфекции ДНК, но находится в диапазоне до нескольких БОЕ/мкг трансфицированной ДНК.

Пример 2. Получение синтетического вируса осповакцины, штамма ACAM2000

[0125] Синтетический вирус осповакцины ACAM2000 получали способами, описанными в WO 2019/213452, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[0126] Дизайн генома синтетического VACV (synVACV) основан на ранее описанной последовательности генома VACV ACAM2000 (регистрационный номер GenBank AY313847) (Osborne JD et al. Vaccine. 2007; 25(52):8807-32). Геном разделяют на 9 перекрывающихся фрагментов (фиг. 1). Эти фрагменты конструируют таким образом, что они обладают общей перекрывающейся последовательностью по меньшей мере 1,0 т.п.н. (т.е. гомологией) с каждым смежным фрагментом, для получения участков, где гомологичная рекомбинация будет запускать сборку полноразмерных геномов (таблица 3). Эти перекрывающиеся последовательности будут обеспечивать достаточную гомологию для точного осуществления рекомбинации между котрансфицированными фрагментами (Yao XD, Evans DH. Journal of Virology. 2003;77(13):7281-90).

Таблица 3: Фрагменты генома VACV ACAM2000, используемые в этом исследовании. Указаны размер и последовательность в геноме VACV ACAM2000 [регистрационный номер GenBank AY313847].

Название фрагмента	**Размер (п.н.)**	**Последовательность**
GA_LITR ACAM2000	18525	SEQ ID NO: 25
GA_FRAG_1 ACAM2000	24931	SEQ ID NO: 26
GA_FRAG_2 ACAM2000	23333	SEQ ID NO: 27
GA_FRAG_3 ACAM2000	26445	SEQ ID NO: 28
GA_FRAG_4 ACAM2000	26077	SEQ ID NO: 29
GA_FRAG_5 ACAM2000	24671	SEQ ID NO: 30
GA_FRAG_6 ACAM2000	25970	SEQ ID NO: 31
GA_FRAG_7 ACAM2000	28837	SEQ ID NO: 32
GA_RITR ACAM2000	17641	SEQ ID NO: 33

[0127] Полученный синтетический VACV, ACAM 2000 депонирован в GenBank под регистрационным номером MN974381.

Пример 3. Получение сконструированного S-белка SARS-CoV-2

[0128] Выравнивание нуклеотидных последовательностей синтетического HPXV (регистрационный номер KY349117) и синтетический VACV (регистрационный номер MN974381) свидетельствует об идентичности нуклеотидных последовательностей 99% на всем протяжении локуса гена TK размером 4 т.п.н. и колинеарности (от начала до конца) последовательностей гена TK, что использовали для конструирования инсерционного локуса ΔTK или нокаута локуса TK. См. фигуру 3.

[0129] Ген TK не является необходимым для репликации вируса в культуре ткани. Он также обеспечивает стабильный участок инсерции для интересующих чужеродных генов и селективный маркер (TK-) в присутствии аналога нуклеотида 5-бромдезоксиуридина (5-BrdU).

[0130] Из-за высокого уровня идентичности последовательности между синтетическим HPXV и синтетическим VACV, манипуляции с последовательностями посредством ПЦР, используемые для получения экспрессирующей кассеты, содержащей последовательности промотора/гена, делают возможным использование одной и той же экспрессирующей кассеты с двумя разными спасаемыми вирусами. В случае спасения трансфицированного ПЦР-фрагмента, содержащего сконструированный S-белок SARS-CoV-2, вирус-специфические последовательности (рекомбинационные левое и правое фланкирующие плечи, соответствующие HPXV094 и HPXV096, соответственно) делают возможной рекомбинацию экспрессирующей кассеты в вирусный локус TK. См. фигуру 2 и фигуру 5.

[0131] Осуществляют выравнивание нуклеотидных последовательностей гена спайкового (S) белка разных изолятов SARS-CoV-2. Выровненные вирусные изоляты являются изолятами, опубликованными под следующими регистрационными номерами NC045512.2, LC521925.1, MN988668.1, MN985325.1, MN975262.1, MN938384.1, LR757998.1, LR757996.1, LR757995.1 и MN908947.3. Выравнивание генов S-белка демонстрирует 100% гомологии на уровне нуклеотидов между генами S-белка разных вирусных изолятов. Все последовательности вирусных изолятов представляют собой изоляты с записями полногеномных последовательностей из Китая, Японии и США. Ранние результаты анализа последовательности изолятов, по-видимому, указывают на небольшой дрейф вируса. Однако если в конечном итоге наблюдают дрейф, можно использовать те же способы с использованием модифицированного вируса и его S-белков и последовательностей нуклеиновой кислоты.

[0132] Нуклеотидная последовательность, кодирующая S-белок SARS-CoV-2, содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 47. SARS-CoV-2 плохо адаптирован для инфицирования мышей. Таким образом, встраивают геномные адаптационные мутации для адаптации вируса для инфицирования мышей. В частности, в нуклеотидную последовательность встраивают мутацию,

приводящую к S-белку, содержащему замену Y459H. В таблице 4 показаны геномные адаптационные мутации в вирусе SARS-CoV, которые можно адаптировать и встраивать в другие области вируса SARS-CoV-2. См. Roberts A et al. PLoS Pathog. 2007 Jan;3(1):e5. doi: 10.1371.

[0133] В таблице 4 приведены шесть мутаций, обнаруживаемых в вирусе SARS-CoV, являющиеся результатом пятнадцати пассажей (и полученный вирус назван MA15) и являющиеся летальными для мышей после интраназальной инокуляции. Обозначения в таблице 4 являются следующими: ORF[a]: открытая рамка считывания; CDS[b:] кодирующая последовательность, последовательность нуклеотидов, соответствующая последовательности аминокислот в белке (локализация включает инициаторный и стоп-кодон); nsp[c]:, неструктурный белок, продукт расщепления ORF 1ab; Main[pro]: основная 3C-подобная протеаза; Hel: хеликаза; RBM[d]: рецептор-связывающий мотив (аминокислоты 424-494).

Таблица 4. Геномные адаптационные мутации в вирусе SARS-CoV

ORF[a]	CDS[b]	Мутации, обнаруживаемые в MA15 по сравнению с SARS-CoV (Urbani)	
		Замена нуклеотида	Замена аминокислоты в белке SARS-CoV
1a	265-13413	10384 C→T 10793 A→C 12814 A→G	H133Y nsp5 (Main[pro])[c] E269A nsp5 (Main[pro])[c] T67A nsp9[c]
1b	13398-21485	16177 C→T	A4V nsp13 (Hel)[c]
S	21492-25259	22797 T→C	Y436H спайковый белок-RBM[d]
M	26398-27063	26428 G→A	E11K M-белок

[0134] Для эффективной экспрессии трансгенов с поксвирусных векторов, гетерологичный ген, кодирующий последовательности содержащие ранний сигнал терминации транскрипции (ETTS) вируса осповакцины, необходимо удалить, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, посредством мутагенеза с внесением молчащих мутаций для получения полноразмерных транскриптов в раннюю фазу инфекции. Эти последовательности имеют следующую последовательность: TTTTTNT (T5NT); SEQ ID NO: 14. Удаление ETTS в кодирующей последовательности S-белка может положительно влиять на генерирование устойчивых иммунных ответов. См. Earl PL et al. J Virol. May 1990;64(5):2448-51.

[0135] Примерами других мутаций, встраиваемых в S-белок (SEQ ID NO: 47) в других вариантах осуществления настоящего изобретения, являются следующие: D614G, S943P, K986P и V987P. В этих вариантах осуществления в S-белок можно встраивать одну или более из этих мутаций.

[0136] Репликация поксвируса происходит в цитоплазме инфицированной клетке. Вирусы не проникают в ядро инфицированной клетки во время цикла репликации и, таким образом, не используют транскрипционный аппарат клетки-хозяина. Из-за цитоплазматической локализации репликации поксвирусы кодируют свой собственный транскрипционный аппарат, включая вирусную РНК-полимеразу и свои собственные регуляторные сигналы распознавания промотора. Таким образом, для эффективной высокоактивной экспрессии с эукариотического трансгена, ее должны запускать поксвирусные промоторы. Экспрессия генов поксвируса контролируется ранним, промежуточным и поздним промотором, и ее можно определять как раннюю (за 8 часов до инфекции) и позднюю (через 8 часов после инфекции). Синтез ДНК происходит через 8 часов после инфекции, и его считают временной границей для инициации поздней экспрессии генов. Наибольших уровней антигенной нагрузки трансгеном, как правило, достигают с использованием комбинации сигналов раннего и позднего промоторов. Промотором, используемым для контроля транскрипции S-белка, является перекрывающийся синтетический ранний/поздний промотор, содержащий последовательность (TTTTATTTTTTTTTTTGGAATATAAATATCCGGTAAAATTGAAAAAATA, SEQ ID NO: 8), включающую спейсер длиной 160 нуклеотидов в 3’-направлении от раннего промотора и между инициаторным участком РНК и ATG (SEQ ID NO: 42). См. фигуру 9. См. Di Pilato et al. Journal of General Virology (2015), 96, 2360-2371; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. По-видимому, спейсеры из более чем 50 нуклеотидов будут обеспечивать большее пространство для транскрипционного аппарата, возможно, ускоряя экспрессию генов, и спейсеры из более чем 99 нуклеотидов обеспечивают преимущества ранней экспрессии генов.

[0137] Полученная экспрессирующая кассета содержит сконструированный S-белок SARS-CoV-2, адаптированный для инфицирования мышей, и где последовательности ETTS удалены, и транскрипция находится под контролем перекрывающегося тандемного раннего/позднего промотора.

Пример 4. Получение рекомбинантного поксвируса, содержащего сконструированный S-белок SARS-CoV-2

[0138] Пример способа получения рекомбинантного вируса оспы лошадей, содержащего S-белок вируса SARS-CoV-2, приведен на фигурах 6 и 7 и включает:

(a) инфицирование клеток (например, клеток Vero или клеток BSC-40) спасаемым синтетическим вирусом оспы лошадей и спасаемым синтетическим VACV, как описано выше.

(b) трансфекцию инфицированных клеток (например, клеток Vero или клеток BSC-40) с использованием полученного посредством ПЦР нуклеотидного фрагмента, содержащего "сконструированную экспрессирующую кассету гена S-белка SARS-CoV-2", осуществляют через 24 часа после инфекции. Рекомбинация экспрессирующей кассеты происходит с помощью левого и правого фланкирующих плеч, и экспрессирующая

кассета встраивается в локус гена TK. Таким образом, локус TK HPXV-095 подвергается нокауту, и экспрессирующая кассета встраивается в локус гена TK. Через 30 мин при 25°C добавляли 7,2 мл среды Игла, содержащей 8% эмбриональной телячьей сыворотки, и инкубировали монослой в течение 3,5 ч. при 37°C. Затем среду для культивирования удаляли и заменяли 8 мл свежей среды Игла, содержащей 8% эмбриональной телячьей сыворотки, и продолжали инкубацию при 37°C в течение двух дней. Клетки соскребали с бутылей, осаждали посредством центрифугирования (2000×g, 5 мин) и ресуспендировали в 0,5 мл среды Игла, содержащей 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки.

(c) трансфицированные клетки собирают через 48 часов после инфекции, и потомство рекомбинантного синтетического вируса оспы лошадей, содержащее сконструированный ген S-белка SARS-CoV-2, и синтетического VACV высвобождается при повторяющихся циклах замораживания/размораживания.

(d) селекцию рекомбинантных вирусов. Тимидинкиназа-отрицательные рекомбинанты поксвируса подвергают селекции посредством анализа бляшкообразования в TK^- клетках (например, TK^- клетках Vero или TK^- клетках BSC-40) с использованием слоя 1% низкоплавкой агарозы, содержащего 25 мкг/мл BrdU. Через три дня при 37°C монослои клеток окрашивают с помощью 0,005% нейтрального красного, бляшки отбирают с использованием стерильной пастеровской пипетки и помещают в 0,5 мл среды Игла, содержащей 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки. Рекомбинантное вирусное потомство идентифицируют по росту в TK^- клетках. Если ген S-белка SARS-CoV-2 встроен в ген тимидинкиназы (TK) вируса, вирусы, содержащие встроенную ДНК, будут TK^-, и их можно подвергать селекции по этому признаку (Mackett et al., (1982)). Подтверждение гена S-белка осуществляют посредство анализа последовательности с помощью ПЦР.

[0139] После идентификации рекомбинантного поксвируса можно использовать различные способы анализа экспрессии полипептида, кодируемого встроенным геном. Эти способы включают, в качестве неограничивающих примеров, анализ черных бляшек (ферментативный иммунологический анализ in situ, проводимый на вирусных бляшках), анализ вестерн-блоттинга, радиоиммунопреципитацию (RIPA) и иммуноферментный анализ (EIA). Можно использовать антитела, распознающие S-белок SARS-CoV-2.

[0140] Последовательность одного из вариантов осуществления синтетического вируса оспы лошадей, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую S-белок вируса SARS-CoV-2, представляет собой SEQ ID NO: 43. Последовательность одного из вариантов осуществления синтетического вируса осповакцины, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую S-белок вируса SARS-CoV-2, представляет собой SEQ ID NO: 44.

Пример 5. Иммунизация мышей рекомбинантным поксвирусом, содержащим сконструированный S-белок SARS-CoV-2

[0141] Первичные эмбриональные фибробласты курицы (CEF), полученные из 10-дневных эмбрионов, выращивают в минимальной поддерживающей среде, дополненной 10% FBS, и используют для размножения и титрования рекомбинантного поксвируса.

[0142] Мышей BALB/c иммунизируют посредством однократной и "прайм-буст" вакцинации с помощью 10^5, 10^6, 10^7 или 10^8 БОЕ рекомбинантного синтетического вируса оспы лошадей, экспрессирующего белок SARS-CoV-2, посредством скарификации, интраназально, посредством внутримышечной или подкожной инокуляции. Животных, инокулированных нерекомбинантным вирусом (WT) или фосфатно-солевым буфером (имитация), используют в качестве контролей.

[0143] Через четыре недели после иммунизации животных подвергали провокационной пробе интраназально с помощью дозы для заражения 50% культуры ткани ($TCID_{50}$) 10^4 SARS-CoV-2, как описано (Subbarao, K et al. (2004) J. Virol. 78, 3572-3577). Через два дня удаляют легкие и носовые раковины четырех животных в каждой группе и определяют титры SARS-CoV-2.

Пример 6. Иммунизация людей рекомбинантным, сконструированным с помощью поксвируса S-белком SARS-CoV-2

[0144] Индивидуумов с риском инфекции SARS-CoV-2 вакцинируют с использованием рекомбинантного, сконструированного с помощью поксвируса S-белка SARS-CoV-2 по изобретению посредством скарификации иглой-вилкой (стандартная доза, от $2{,}5\times10^5$ до $12{,}5\times10^5$ бляшкообразующих единиц), как правило, в плечо. Рекомбинантный, сконструированный с помощью поксвируса S-белок SARS-CoV-2 также можно вводить в виде однократной вакцинации однократной дозой (например, 1×10^6 БОЕ TNX-1800), при этом производят флаконы, содержащие 100 доз на флакон. Вакцинация защищает людей от инфекции. Однако для усиления иммунитета можно использовать последующие вакцинации.

[0145] Способы, касающиеся тестирования вакцины при клиническом испытании, описаны ранее (Sadoff, J. et al. (2020) Safety and immunogenicity of the Ad26.COV2.S COVID-19 vaccine candidate: interim results of a phase 1/2a, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial, MedRxiv, стр. 1-28; включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Проводят многоцентровое рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое исследование фазы 1/2a, предназначенное для оценки безопасности, реактогенности и иммуногенности рекомбинантного, сконструированного с помощью поксвируса S-белка SARS-CoV-2. Сконструированный S-белок SARS-CoV-2 вводят в дозе, например, приблизительно от 5×10^{10} до 1×10^{11} вирусных частиц (vp) на вакцинацию, в виде однократной дозы или двух доз с интервалом, например, 56 дней у здоровых индивидуумов (18-55 лет) и здоровых пожилых индивидуумов (≥65 лет). Измеряют уровни вызванного вакциной S-специфического антитела, например, посредством ELISA, и измеряют титры нейтрализующих антител, например, в анализе микронейтрализации (см., например, способы из примера 11). Оценивают иммунные ответы $CD4^+$ Т-хелперов (Th)1 и Th2 и $CD8^+$ Т-клеток, например, посредством внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS).

Пример 7. Получение кодон-оптимизированного спайкового белка SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2-Spike-co)

[0146] Спайковый белок SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 45) подвергали оптимизации кодонов (SARS-CoV-2-Spike-co; SEQ ID NO: 50) для экспрессии во время инфекции поксвируса и синтезировали с помощью GenScript. Синтезированная ДНК также содержит синтетический ранний/поздний промотор поксвируса в положении нуклеотидов 10-48. Синтезированную ДНК субклонировали в плазмиду, имеющую гомологию в отношении локуса гена HPXV095 (SEQ ID NO: 51) или локуса гена HPXV200 (SEQ ID NO: 52). Гомологичную рекомбинацию использовали для инсерции синтезированной ДНК посредством замены селективных маркеров, ранее встроенных в синтетический VACV (synVACV) или синтетический HPXV (scHPXV). Селективные маркеры встраивали в виде слияния между желтым флуоресцентным белком (YFP) и гуанин-фосфорибозилтрансфераой (GPT) в гены HPXV095 или A2K105, соответственно (см. способы, описанные в патентной заявке США № 2018/0251736, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

Пример 8: Получение синтетического вируса осповакцины TNX-2200

[0147] Селективный маркер YFP-GPT в локусе тимидинкиназы (TK) (также обозначаемом как локус гена A2K105) synVACV (см. пример 2) заменяют с использованием, например, гомологичной рекомбинации с кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью спайкового белка SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2-co) для получения синтетического вируса осповакцины TNX-2200. Один из примеров способов приведен далее.

[0148] Приблизительно 20 мкг плазмиды, содержащей нуклеотидную последовательность SARS-CoV-2-Spike-co, фланкированную приблизительно 400 нуклеотидами, гомологичными гену A2K105, линеаризовали с использованием фермента рестрикции SacI. После расщепления рестрикционными ферментами линеаризованную плазмиду дополнительно очищали для удаления остаточного фермента. Клетки BSC-40 инфицировали synVACV, экспрессирующим YFP-GPT в локусе гена A2K105 (synVACVΔA2K105$^{yfp\text{-}gpt}$), с MOI 0,1 в течение 1 часа. После инфицирования вирусный инокулят заменяют средой OptiMEM и инкубируют еще в течение 30 минут при 37°C. Приблизительно 5 мкг очищенной линеаризованной плазмиды смешивали с липофектамином 2000 (ThermoFisher Scientific) в соотношении 1 мкг ДНК и 3 мкл липофектамина 2000 в общем объеме 2 мл OptiMEM. Комплекс ДНК-липид образовывался в течение приблизительно 10 минут инкубации. Затем его добавляли к инфицированным вирусом клеткам BSC-40.

[0149] Клетки BSC-40 инкубировали в течение 48 часов, чтобы сделать возможной гомологичную рекомбинацию. Через 48 часов чашки соскребали для получения инфицированных вирусом клеток и переносили смесь в коническую пробирку. Клетки лизировали после трех раундов замораживания при -80°C и размораживания. Подходящее разведение, которое может находиться в диапазоне от 1×10^{-2} до 1×10^{-5}, смеси для инфекции/трансфекции высевали на клетки BSC-40, затем покрывая слоем агара. Чашки с инфицированными клетками инкубировали до визуализации нефлуоресцентных

"рекомбинантных" бляшек. Эти нефлуоресцентные бляшки маркировали, и агаровые пробки отбирали и добавляли в 10 мМ раствор Трис, pH 8,0. Затем бляшки использовали для инфицирования клеток BSC-40 во втором раунде инфекции. Это отбирание бляшек и инфицирование клеток BSC-40 повторяли до тех пор, пока не YFP не становился недетектируемым в инфицированных клетках (4-6 раундов очистки). Осуществляли анализ ПЦР с использованием праймеров (фланкирующий прямой праймер sA2K J2R 5'-3': ATGCGATTCAAAAAAGAATCAGC (SEQ ID NO: 56) и фланкирующий обратный праймер sA2K J2R 5'-3': CAATTTCCTCAAAATACATAAACGG (SEQ ID NO: 57)), с помощью которых амплифицировали локус гена A2K105, для подтверждения того, что ген спайкового белка SARS-CoV-2 встраивался в локус A2K105.

[0150] Осуществляли анализ вестерн-блоттинга для тестирования на экспрессию белка SARS-Spike-co в клетках BSC-40, инфицированных synVACVΔA2K105$^{yfp\text{-}gpt}$ или synVACVΔA2K105$^{SARSCoV2\text{-}SPIKE\text{-}co::nm}$ (TNX-2200) клонами 1.1.1.1.1 или 2.1.1.1.1 (фигура 11). Клетки BSC-40 инфицировали с MOI 1,0 указанными вирусами или инокулятом без вируса (имитацией) и собирали белковые лизаты с использованием лизирующего буфера RIPA в указанные моменты времени. Электрофорез в ПААГ с SDS использовали для разделения белковых лизатов, а затем белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану подвергали блоттингу с использованием антител против спайкового белка SARS-CoV2 (ProSci) или против VACV 13. Связывание первичного антитела определяли посредством блоттинга мембраны с использованием вторичных антител IRDye, определяемых по каналам 800 нм или 680 нм (LI-COR). С помощью антитела против спайкового белка SARS-CoV2 определяют разные формы спайкового белка SARS-CoV-2, включая полноразмерную, гликозилированную полноразмерную, расщепленную и мультимерную формы.

[0151] Выделяли вирусную геномную ДНК synVACVΔA2K105$^{SARSCoV2\text{-}SPIKE\text{-}co::nm}$ (TNX-2200) клонов 1.1.1.1.1 и 2.1.1.1.1 и секвенировали с использованием секвенирования нового поколения (NGS) с помощью платформы Illumina MiSeq. Данные секвенирования анализировали с помощью сборки de novo и картировали по референсу с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench (Qiagen).

Пример 9. Получение синтетического вируса оспы лошадей TNX-1800a

[0152] Селективный маркер YFP-GPT в локусе тимидинкиназы (TK) (также обозначаемом как локус гена HPXV095) scHPXV (см. пример 7) заменяют с использованием, например, гомологичной рекомбинации с кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью спайкового белка SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2-co) для получения синтетического вируса осповакцины TNX-1800a. Один из примеров способов приведен далее.

[0153] Приблизительно 20 мкг плазмиды, содержащей нуклеотидную последовательность SARS-CoV-2-Spike-co, фланкированную приблизительно 400 нуклеотидами, гомологичными гену HPXV095, линеаризовали с использованием фермента рестрикции SacI. После расщепления рестрикционными ферментами

линеаризованную плазмиду дополнительно очищали для удаления остаточного фермента. Клетки BSC-40 инфицировали scHPXV, экспрессирующим YFP-GPT в локусе гена HPXV095, с MOI 0,1 в течение 1 часа. После инфицирования вирусный инокулят заменяют средой OptiMEM и инкубируют еще в течение 30 минут при 37°C. Приблизительно 5 мкг очищенной линеаризованной плазмиды смешивали с липофектамином 2000 (ThermoFisher Scientific) в соотношении 1 мкг ДНК и 3 мкл липофектамина 2000 в общем объеме 2 мл OptiMEM. Комплекс ДНК-липид образовывался в течение приблизительно 10 минут инкубации. Затем его добавляли к инфицированным вирусом клеткам BSC-40.

[0154] Клетки BSC-40 инкубировали в течение от 48 часов до 72 часов, чтобы сделать возможной гомологичную рекомбинацию. Затем чашки соскребали для получения инфицированных вирусом клеток и переносили смесь в коническую пробирку. Клетки лизировали после 3 раундов замораживания при -80°C и размораживания. Подходящее разведение, которое может находиться в диапазоне от 1×10^{-2} до 1×10^{-5}, смеси для инфекции/трансфекции высевали на клетки BSC-40, затем покрывая слоем агара. Чашки с инфицированными клетками инкубировали до визуализации нефлуоресцентных "рекомбинантных" бляшек. Эти нефлуоресцентные бляшки маркировали, и агаровые пробки отбирали и добавляли в 10 мМ раствор Трис, pH 8,0. Затем бляшки использовали для инфицирования клеток BSC-40 во втором раунде инфекции. Это отбирание бляшек и инфицирование клеток BSC-40 повторяли до тех пор, пока не YFP не становился недетектируемым в инфицированных клетках (4-6 раундов очистки бляшек). Одну нефлуоресцентную бляшку выделяли из-за низкой эффективности гомологичной рекомбинации в HPXV-инфицированных клетках.

[0155] Осуществляли анализ ПЦР с использованием праймеров (фланкирующий прямой праймер sA2K/HPXV J2R 5’-3’: TATCGCATTTTCTAACGTGATGG (SEQ ID NO: 58) и фланкирующий обратный праймер sA2K/HPXV J2R 5’-3’: CCTCATTTGCACTTTCTGGTTC (SEQ ID NO: 59)), с помощью которых амплифицировали локус гена HPXV095, для подтверждения того, что ген SARS-Spike-co встраивался в локус HPXV095. Затем вирусную геномную ДНК выделяли из препарата очищенных сахарозой вирусных частиц и использовали в секвенировании нового поколения с помощью платформы Illumina MiSeq. Данные секвенирования анализировали с помощью сборки de novo и картировали по референсу с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench (Qiagen).

Пример 10. Получение синтетического вируса оспы лошадей TNX-1800b

[0156] Селективный маркер YFP-GPT в локусе гена HPXV200 scHPXV (см. пример 7) (также обозначаемый как локус гомолога B22R вируса натуральной оспы) заменяют с использованием, например, гомологичной рекомбинации с кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью спайкового белка SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2-co) для получения синтетического вируса осповакцины TNX-1800b. Один из примеров способов приведен далее.

[0157] Приблизительно 20 мкг плазмиды, содержащей SARS-CoV-2-Spike-co, фланкированную приблизительно 400 нуклеотидами, гомологичными гену HPXV200, линеаризовали с использованием фермента рестрикции SacI. После расщепления рестрикционными ферментами линеаризованную плазмиду дополнительно очищали для удаления остаточного фермента. Клетки BSC-40 инфицировали scHPXV, экспрессирующим YFP-GPT в локусе гена HPXV200, с MOI 0,1 в течение 1 часа. После инфицирования вирусный инокулят заменяют средой OptiMEM и инкубируют еще в течение 30 минут при 37°C. Приблизительно 5 мкг очищенной линеаризованной плазмиды смешивали с липофектамином 2000 (ThermoFisher Scientific) в соотношении 1 мкг ДНК и 3 мкл липофектамина 2000 в общем объеме 2 мл OptiMEM. Комплекс ДНК-липид образовывался в течение приблизительно 10 минут инкубации. Затем его добавляли к инфицированным вирусом клеткам BSC-40.

[0158] Клетки BSC-40 инкубировали в течение от 48 часов до 72 часов, чтобы сделать возможной гомологичную рекомбинацию. Затем чашки соскребали для получения инфицированных вирусом клеток и переносили смесь в коническую пробирку. Клетки лизировали после трех раундов замораживания при -80°C и размораживания. Подходящее разведение, которое может находиться в диапазоне от 1×10^{-2} до 1×10^{-5}, смеси для инфекции/трансфекции высевали на клетки BSC-40, затем покрывая слоем агара. Чашки с инфицированными клетками инкубировали до визуализации нефлуоресцентных "рекомбинантных" бляшек. Эти нефлуоресцентные бляшки маркировали, и агаровые пробки отбирали и добавляли в 10 мМ раствор Трис, pH 8,0. Затем бляшки использовали для инфицирования клеток BSC-40 во втором раунде инфекции. Одну нефлуоресцентную бляшку выделяли из-за низкой эффективности гомологичной рекомбинации в HPXV-инфицированных клетках по сравнению с VACV-инфицированными клетками. Это отбирание бляшек повторяли посредством инфицирования клеток BSC-40, пока не YFP не становился недетектируемым (приблизительно 4-6 раундов очистки бляшек).

[0159] Осуществляли анализ ПЦР с использованием праймеров (фланкирующий прямой праймер sHPXV 200 5'-3': ATAGCCACAATTATTGACGGGC (SEQ ID NO: 60) и фланкирующий обратный праймер sHPXV 200 5'-3': ggatgatatggtaatgtaactaccgatac(SEQ ID NO: 61)), с помощью которых амплифицировали локус гена HPXV200, для подтверждения того, что ген SARS-Spike-co встраивался в локус HPXV200. Затем вирусную геномную ДНК выделяли из препарата очищенных сахарозой вирусных частиц и использовали в секвенировании нового поколения с помощью платформы Illumina MiSeq. Последовательность анализировали с помощью сборки de novo и картировали по референсу с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench (Qiagen).

Пример 11. Анализ спайкового белка SARS-CoV-2 в TNX-1800a и TNX-1800b

[0160] Осуществляли анализ вестерн-блоттинга для оценки экспрессии белка SARS-Spike-co в клетках BSC-40, инфицированных TNX-801, TNX-1800a (клоном TNX-1800a-1) и TNX-1800b (клоном TNX-1800b-2) (фигура 12). Клетки BSC-40 инфицировали

с MOI 1,0 указанными вирусами и собирали белковые лизаты с использованием буфера RIPA в указанные моменты времени. Электрофорез в ПААГ с SDS использовали для разделения белковых лизатов, а затем белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану подвергали блоттингу с использованием антитела против спайкового белка SARS-CoV2 (ProSci), против VACV 13 или против тубулина. Флуоресцентно меченые вторичные антитела использовали для детекции связывания первичных антител. С помощью антитела против спайкового белка SARS-CoV2 определяют разные формы спайкового белка SARS-CoV-2, включая полноразмерную, гликозилированную полноразмерную, расщепленную и мультимерную формы.

Пример 12. Иммунизация африканских зеленых мартышек рекомбинантным, сконструированным с помощью поксвируса S-белком SARS-CoV-2

[0161] Способы иммунизации и тестирования вакцин-кандидатов на африканских зеленых мартышках описаны ранее (Hartman, A. et al. (2020) SARS-CoV-2 infection of African green monkeys result in mild respiratory disease discernible by PET/CT imaging and shedding of infectious virus from both respiratory and gastrointestinal tracts. PLOS Pathogens 16(9):e1008903; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Африканских зеленых мартышек (AGM) случайным образом разделяли на 6 групп (n=4) и вакцинировали разными штаммами синтетического вируса оспы лошадей (HPXV). Штамм и дозу см. в таблице 5. В день 0 AGM подкожно вакцинировали посредством скарификации с использованием иглы-вилки.

Таблица 5. Дозы штаммов HPXV, используемые для вакцинации африканских зеленых мартышек

Группа	**Количество животных**	**Номер животного**	**Штамм HPXV**	**Доза (БОЕ)**
1	4	1F 16986 1F 16994 1M 16975 1M 16977	TNX-801	$2,9\times10^6$
2	4	2F 16985 2F 16991 2M 16980 2M 16983	TNX-801	$1,06\times10^6$
3	4	3F 16988 3F 16995 3M 16976 3M 16982	TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$
4	4	4F 16989 4F 16990	TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$

		4M 16972 4M 16973		
5	4	5F 16992 5F 16993 5M 16979 5M 16981	TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$
6	4	6M 16978 6M 16974 6F16987 6F16984	Контрольный носитель	Не применимо

[0162] Место инокуляции AGM подвергали мониторингу и через 7 дней наблюдали кожную реакцию, также известную как "физическая реакция", при вакцинации TNX-801, TNX-1800b-2 или TNX-1800a-1, независимо от дозы, вызывая иммунный ответ, включая Т-клеточный иммунный ответ (фигуры 13-17). "Физическую реакцию" ранее описывали как биомаркер положительного ответа на вакцину, свидетельствующего о протективном иммунитете (например, Т-клеточном иммунитете) против вируса осповакцины, такую как натуральная оспа (Jenner, E.,1800, 2nd Ed. "An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of The Cow Pox"). "Физическая реакция" является мерой функционального Т-клеточного иммунитета, валидированной посредством эрадикации натуральной оспы, передающегося респираторным путем заболевания, вызванного вирусом натуральной оспы, в 1960-х гг. Наличие "физической реакции" на AGM после вакцинации TNX-1800b-2 или TNX-1800a-1 является прогностическим в отношении того, что Т-клеточный иммунный ответ будет активироваться благодаря введению S-белка SARS-CoV, антигена COVID-19. Т-клеточный иммунный ответ активируется, когда наивным Т-клеткам презентируют антигены (например, S-белок SARS-CoV-2), что приводит к дифференцировке и пролиферации наивных Т-клеток. Этот ответ также приводит к иммунологической памяти посредством генерирования Т-клеток памяти, обеспечивающих защиту и ускоренный иммунный ответ при последующей стимуляции тем же антигеном. В день 60 вакцинированные AGM подвергали провокационной пробе SARS-CoV-2 интратрахеальным путем, и пробы показали, что вакцинация обеспечивает протективный иммунитет против вируса. Выживших животных умерщвляют в день 88.

[0163] Анализ микронейтрализации осуществляли через 14 дней после вакцинации AGM указанными штаммами HPXV для анализа титров нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 в сыворотке. Анализ исходно проводили в двух параллелях и использовали третью параллель, если первые две параллели не находились в пределах 2-кратного разведения друг относительно друга. Образцы сыворотки сначала термически

инактивировали при 56°C в течение 30-60 минут после аликвотирования на основной планшет. Основные планшеты можно хранить при 4-8°C в течение семи дней или при -20°C в течение трех месяцев.

[0164] Клетки Vero E6 (ATCC) высевали на 96-луночные планшеты в концентрации 2×10^4 клеток на лунку за 18-24 часов до добавления тестовых образцов сыворотки. В день анализа основные планшеты размораживали и девять тестовых образцов сыворотки 2-кратно серийно разводили от 1:5 до 1:640 на отдельном 96-луночном планшете/блоке для разведения (столбцы 1-9). Кроме того, каждый 96-луночный планшет/блок для разведения содержал сыворотку положительного контроля (столбец 10), вирусные контроли (столбец 11) и клеточные контроли (столбец 12). После разведения в столбцы 1-11 добавляют равный объем стока вируса (1000 $TCID_{50}$/мл). Кроме того, одновременно делали планшеты контроля качества (QC), состоящие из сыворотки положительного контроля (столбцы 1-2), отрицательного контроля (столбцы 3-4), обратного титра входного вируса (столбцы 5-6), вирусного контроля (VC; столбцы 7-9) и клеточных контролей (CC; столбцы 10-12). Использовали по меньшей мере два планшета QC на анализ. Тестовые планшеты и планшеты QC инкубировали при 37°C в течение 2-2,5 часов в инкубаторе при 5% CO_2. После инкубации аликвоты смесей (сывороток и вируса) для тестовых планшетов и планшетов QC (включая контроли) переносили на 96-луночные планшеты с предварительно высеянными клетками Vero E6 и инкубировали в течение 72±4 часов. После инкубации планшеты вынимали из инкубатора и позволяли им отстояться при комнатной температуре в течение 20-40 минут. Во все лунки планшетов добавляли 100 мкл Cell Titer-Glo (Promega), осторожно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10-30 минут. Люминесценцию считывали с использованием подходящего фотометра. Пороговые значения для планшетов вычисляли по следующей формуле:

(среднее значение для лунок VC+среднее значение для лунок CC)/2

Образцы с люминесценцией выше или ниже порогового значения для планшета являются положительными и отрицательными по нейтрализующему антителу, соответственно. Отдельным параллелям приписывают титр, являющийся обратной величиной разведения последнего положительного разведения (т.е. 1:80 регистрируют как титр 80). Титры регистрируют как медиану и геометрическое среднее титров принятых параллельных титров.

[0165] В таблице 6 приведен уровень титров нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, измеренных у вакцинированных AGM через 14 дней после однократной вакцинации. AGM, вакцинированные TNX-1800b-2 и TNX1800a-1, генерировали титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 (титр ≥1:40). Вакцинированные TNX-801 (scHPXV, не несущим экспрессирующую кассету S-белка) контрольные животные и группа плацебо не генерировали титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 (титр ≤1:10). Дозы $2,9\times10^6$ БОЕ и $1,06\times10^6$ БОЕ TNX-801 и TNX-1800 хорошо переносились.

Таблица 6. Титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у вакцинированных африканских зеленых мартышек

Номер животного	**Штамм HPXV**	**Доза**	**Титр 1**	**Титр 2**	**Медиана**	**Геометрическое среднее титра (GMT)**
3M 16982 D15	TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$	640	20	NQ	NQ
3M 16976 D15	TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$	640	320	480	452,55
3F 16988 D15	TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$	320	160	240	226,27
3F 16995 D15	TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$	640	640	640	640,00
4M 16973 D14	TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$	160	160	160	160,00
4M 16972 D14	TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$	640	640	640	640,00
4F 16989 D14	TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$	80	80	80	80,00
4F 16990 D14	TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$	320	320	320	320,00
5M 16979 D14	TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$	320	320	320	320,00
5M 16981 D14	TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$	640	320	480	452,55
5F 16993 D14	TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$	320	320	320	320,00
5F 16992 D14	TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$	320	640	480	452,55

Пример 13. Кривые роста вируса, измеренного в клетках, инфицированных рекомбинантным, сконструированным с помощью поксвируса S-белком SARS-CoV-2

[0166] Клетки BSC-40, HeLa и HEK 293 высевали в 6-луночный планшет, а затем инфицировали TNX-801, TNX-1800, TNX-1200 или TNX-2200 с MOI 0,01. Через 48 часов после инфицирования клетки фиксировали и окрашивали 5% формальдегидом, содержащим кристалл-виолет. Клетки BSC-40, инфицированные TNX-801 и TNX-1800,

имели значимый цитопатический эффект, в то время как клетки HeLa и HEK 293 демонстрировали незначительный цитопатический эффект и его отсутствие, соответственно (фигура 18). Клетки BSC-40, HeLa и HEK293, инфицированные TNX-1200 и TNX-2200 имели значимый цитопатический эффект во всех инфицированных линиях клеток (фигура 18). Титр вируса (БОЕ/мл) в клетках BSC-40, HeLa и HEK 293 с течением времени измеряли через 24, 48 и 72 часа после инфицирования TNX-801, TNX-1800, TNX-1200 или TNX-2200 (фигуры 19A-D), что соответствует цитопатическому эффекту вирусов, как показано на фигуре 18.

[0167] Клетки BSC-40 инфицировали клонами HPXV (например, TNX-801, scHPXVΔ095$^{yfp\text{-}gpt}$, TNX-1800a-1, scHPXVΔ200$^{yfp\text{-}gpt}$, или TNX-1800b-2; (фигуры 20A-B)) или клонами VACV (например, TNX-1200, TNX-2200 или synVACVΔA2K105$^{yfp\text{-}gpt}$; (фигуры 21A-B)) с MOI 0,01. Титр вируса (БОЕ/мл) измеряли через 0, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа для определения роста вируса в инфицированных клетках. Наличие спайкового белка SARS-CoV-2 замедляет рост клона вируса HPXV на приблизительно 0,5 log, в то время как он замедляет рост клона вируса VACV на приблизительно 1 log.

[0168] Цитопатический эффект, наблюдаемый в клетках Vero и клетках BSC-40, инфицированных различными клонами HPXV и VACV, свидетельствует о том, что эти линии клеток можно использовать для производства вирусов (например, TNX-1800 и TNX-801).

Пример 14. Получение экспрессирующей кассеты синтетической ДНК спайкового белка SARS-CoV-2 и рекомбинантного scHPXV, трансфицированного с использованием кассеты

[0169] Как показано на фигуре 22, нуклеотидную последовательность спайкового (S) белка SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 45) модифицируют посредством удаления раннего сигнала терминации транскрипции (T_5NT) (SEQ ID NO: 14) с использованием мутагенеза с внесением молчащих мутаций, таким образом, сохраняя кодирующие последовательности спайкового (S) белка SARS-CoV-2.

[0170] Выбирают локализацию участка инсерции гетерологичного трансгена спайкового (S) белка SARS-CoV-2 в нуклеотидной последовательности ДНК синтетического химерного (sc) генома вируса оспы лошадей (например, локус гена TK HPXV095; положения 992077-92610; SEQ ID NO:1). Идентифицируют нуклеотидные последовательности ДНК, проксимальные к левой и правой стороне выбранного участка инсерции HPXV, определяющим левое и правое фланкирующие плечи (см. фигуру 22). Эти плечи используют для запуска сайт-специфической рекомбинации гомологичных нуклеотидов между спасаемым вирусом и гетерологичным трансгеном. Также выбирают нуклеотидную последовательность ДНК, кодирующую промотор на основе поксвируса для регуляции высоких уровней экспрессии гена спайкового (S) белка SARS-CoV-2, такой как ранний/поздний промотор вируса осповакцины.

[0171] Затем синтезируют один из примеров нуклеотидной последовательности ДНК размером приблизительно 6 т.п.н. для синтетической экспрессирующей кассеты

спайкового (S) белка SARS-CoV-2, содержащей нуклеотидные последовательности ДНК левого фланкирующего плеча, ранний/поздний промотор вируса осповакцины, функционально связанный с модифицированной последовательностью нуклеиновой кислоты спайкового (S) белка CoVID-SARS-2, и правое фланкирующее плечо (например, с помощью коммерческого поставщика услуг (например, Genewiz)). См. фигуру 22.

[0172] Затем ДНК синтетической экспрессирующей кассеты спайкового (S) белка SARS-CoV-2 трансфицируют в клетки (например, клетки BSC-40), инфицированные scHPXV. Рекомбинантное потомство вируса оспы лошадей, содержащее синтетическую экспрессирующую кассету спайкового (S) белка SARS-CoV-2, подвергают селекции с использованием среды, содержащей BrdU, для предотвращения амплификации родительского вируса, сохраняющего исходные последовательности вирусной геномной ДНК в участке инсерции. Рекомбинантный вирус очищают с использованием последовательных раундов очистки бляшек. Нуклеотидную последовательность из очищенного вируса по всей кассете гетерологичного трансгена спайкового (S) белка SARS-CoV-2 подтверждают посредством анализа последовательности (например, анализа последовательности посредством ПЦР). См. SEQ ID NO: 63.

[0173] Схожие конструкции и стадии можно осуществлять с использованием вируса оспы лошадей для получения рекомбинантного scHPXV, содержащего адаптированную для мышей экспрессирующую кассету спайкового белка (см. SEQ ID NO: 64), и вируса осповакцины, с использованием, например, локуса гена TK вируса осповакцины synVACV 105; положения 83823-84344 (см. SEQ ID NO: 2), для получения рекомбинантного вируса осповакцины, содержащего адаптированную для мышей экспрессирующую кассету спайкового белка (см. SEQ ID NO: 65).

Пример 15. Эффективность рекомбинантного поксвируса, несущего экспрессирующую кассету, кодирующую S-белок SARS-CoV-2, у иммунизированных африканских зеленых мартышек, стимулированных SARS-CoV-2

[0174] В день 0 африканских зеленых мартышек (AGM) подкожно вакцинировали посредством скарификации с использованием иглы-вилки, как описано в примере 12. В таблице 7 показан уровень титров нейтрализующих антител против SARS-CoV-2, измеренный у вакцинированных AGM через 0, 7, 15, 21, 29, 41 и 47 дней после однократной вакцинации. AGM, вакцинированные TNX-1800b-2 и TNX1800a-1, генерировали титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 (титр ≥1:40). Вакцинированные TNX-801 (scHPXV, не несущим экспрессирующую кассету S-белка) контрольные животные и группа плацебо не генерировали титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 (титр ≤1:10). Дозы $2{,}9\times10^6$ БОЕ и $1{,}06\times10^6$ БОЕ TNX-801 и TNX-1800 хорошо переносились.

Таблица 7. Титры нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у вакцинированных африканских зеленых мартышек

Штамм HPXV	**Доза (БОЕ)**	**Номер животн**	**Тит р**	**Тит р**	**Титр День**	**Титр День**	**Титр День**	**Титр День**	**Титр День**

		ого	**День 0**	**День 7**	**15**	**21**	**29**	**41**	**47**
TNX-801	$2,9\times10^6$	1M 16977 1M 16975 1F 16994 1F 16986	NQ 7,07 5,00 5,00	5,00 7,07 5,00 7,07	7,07 2,50 2,50 7,07	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00
TNX-801	$1,06\times10^6$	2M 16980 2M 16983 2F 16985 2F 16991	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	2,50 2,50 3,54 2,50	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00
TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$	3M 16982 3M 16976 3F 16988 3F 16995	5,00 7,07 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	113,14 80,00 113,14 320,00	113,14 113,14 160,00 226,27	40,00 40,00 80,00 40,00	56,57 80,00 160,00 56,57	1280,00 640,00 320,00 1280,00
TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$	4M 16973 4M 16972 4F 16989 4F 16990	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	113,14 452,55 56,57 320,00	226,27 452,55 28,28 226,27	113,14 320,00 14,14 80,00	80,00 320,00 40,00 160,00	905,10 NQ 1280,00 905,10
TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$	5M 16979 5M 16981 5F 16993 5F 16992	5,00 5,00 7,07 7,07	5,00 5,00 5,00 5,00	160,00 226,27 113,14	113,14 160,00 NQ 640,0	113,14 80,00 56,57 NQ	NQ 80,00 56,57 226,27	226,27 452,55 160,00 452,55

					226,27	0			
Контрольный носитель	Не применимо	6M 16978 6M 16974 6F 16987 6F 16984	5,00 5,00 7,07 7,07	5,00 5,00 5,00 5,00	2,50 3,54 3,54 3,54	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00	5,00 5,00 5,00 5,00

[0175] В день 41 вакцинированных AGM анестезировали и стимулировали (инокулировали) с помощью приблизительно 2×10^6 $TCID_{50}$/животное SARS-CoV-2 дикого типа 1. интраназальным и 2. интратрахеальным путем. Объем вируса разделяли поровну между двумя путями (1 мл на путь при 1×10^6 $TCID_{50}$/мл стока вируса). В случае интраназального пути AGM анестезировали и инокулировали посредством медленного пипетирования 500 мкл в каждую ноздрю с последующей ингаляцией. В случае интратрахеального пути AGM анестезировали и вставляли им трубку в трахею. После того, как конец трубки оказывался приблизительно на середине трахеи, к трубке присоединяли шприц, содержащий инокулят с вирусом, и инокулят медленно подвергали инстилляции в трахею с последующим равным объемом PBS для промывки трубки. После инокуляции AGM животное возвращали в его жилую клетку и подвергали мониторингу на восстановление после анестезии.

[0176] Образец мазка из ротоглотки и образец трахеального лаважа подвергнутых инокуляции AGM собирали в день 41 и день 47. Образцы обрабатывали способами RT-qPCR для измерения количества копий SARS-CoV-2. В таблице 8 приведено количество копий SARS-CoV-2 из образцов мазков из ротоглотки. В таблице 9 приведено количество копий SARS-CoV-2 из образцов трахеального лаважа. В день 47 у AGM, вакцинированных TNX-1800b-2 и TNX-1800a-1, развивался протективный иммунитет против SARS-CoV-2.

Таблица 8. RT-qPCR количества копий SARS-CoV-2 на мазок из ротоглотки

Штамм HPXV	**Доза (БОЕ)**	**Номер животного**	**День 41 (количество копий на мазок)**	**День 47 (количество копий на мазок)**
TNX-801	$2,9\times10^6$	1M 16977 1M 16975 1F 16994 1F 16986	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00	2,59E+06 1,75E+05 2,61E+03 2,22E+04
TNX-801	$1,06\times10^6$	2M 16980 2M 16983	0,00E+00 0,00E+00	6,69E+03 6,33E+04

		2F 16985 2F 16991	0,00E+00 2,47E+02	5,56E+04 3,75E+03
TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$	3M 16982 3M 16976 3F 16988 3F 16995	0,00E+00 1,98E+02 4,29E+02 0,00E+00	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00
TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$	4M 16973 4M 16972 4F 16989 4F 16990	7,59E+03 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00
TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$	5M 16979 5M 16981 5F 16993 5F 16992	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00	0,00E+00 0,00E+00 4,68E+02 0,00E+00
Контрольный носитель	Не применимо	6M 16978 6M 16974 6F 16987 6F 16984	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00	9,26E+03 3,66E+04 0,00E+00 1,53E+06

Таблица 9. RT-qPCR количества копий SARS-CoV-2 на мл трахеального лаважа

Штамм HPXV	**Доза (БОЕ)**	**Номер животного**	**День 41 (количество копий на мл)**	**День 47 (количество копий на мл)**
TNX-801	$2,9\times10^6$	1M 16977 1M 16975 1F 16994 1F 16986	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00	2,11E+06 0,00E+00 5,31E+02 3,61E+02
TNX-801	$1,06\times10^6$	2M 16980 2M 16983 2F 16985 2F 16991	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00	4,50E+04 0,00E+00 3,95E+05 1,72E+04
TNX-1800b-2	$2,9\times10^6$	3M 16982 3M 16976 3F 16988 3F 16995	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00	0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00 0,00E+00

TNX-1800b-2	$1,06\times10^6$	4M 16973	0,00E+00	8,42E+02
		4M 16972	0,00E+00	0,00E+00
		4F 16989	0,00E+00	0,00E+00
		4F 16990	0,00E+00	0,00E+00
TNX-1800a-1	$0,6\times10^6$	5M 16979	0,00E+00	0,00E+00
		5M 16981	0,00E+00	9,34E+03
		5F 16993	0,00E+00	0,00E+00
		5F 16992	0,00E+00	6,82E+02
Контрольный носитель	Не применимо	6M 16978	0,00E+00	1,91E+03
		6M 16974	0,00E+00	8,13E+03
		6F 16987	0,00E+00	1,43E+04
		6F 16984	0,00E+00	1,17E+03

ПРИМЕРЫ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ:

1. Рекомбинантный поксвирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, где белок SARS-CoV-2 выбран из группы, состоящей из спайкового белка (S), мембранного белка (M) и нуклеокапсидного белка (N) или комбинаций двух или более указанных белков.

2. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 1, где поксвирус является ортопоксвирусом.

3. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 2, где ортопоксвирус выбран из группы, состоящей из вируса оспы верблюдов (CMLV), вируса коровьей оспы (CPXV), вируса эктромелии (ECTV), вируса оспы лошадей (HPXV), вируса оспы обезьян (MPXV), вируса осповакцины (VACV), вируса натуральной оспы (VARV), вируса оспы кроликов (RPXV), вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин Гишу и вируса оспы полевок.

4. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 2, где ортопоксвирус является вирусом оспы лошадей.

5. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 4, где вирус оспы лошадей представляет собой штамм MNR-76.

6. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 2, где ортопоксвирус является вирусом осповакцины.

7. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 6, где вирус осповакцины выбран из группы штаммов, состоящей из: Western Reserve, Western Reserve клона 3, Tian Tian, Tian Tian клона TP5, Tian Tian клона TP3, NYCBH, NYCBH клона Acambis 2000 (ACAM 2000), Wyeth, Copenhagen, Lister, Lister 107, Lister-LO, Lister GL-ONC1, Lister GL-ONC2, Lister GL-ONC3, Lister GL-ONC4, Lister CTC1, Lister IMG2 (Turbo FP635), IHD-W, LC16m18, Lederle, Tashkent клона TKT3, Tashkent клона TKT4, USSR,

Evans, Praha, L-IVP, V-VET1 или LIVP 6.1.1, Ikeda, EM-63, Malbran, Duke, 3737, CV-1, Connaught Laboratories, Serro 2, CM-01, NYCBH Dryvax клона DPP13, NYCBH Dryvax клона DPP15, NYCBH Dryvax клона DPP20, NYCBH Dryvax клона DPP17, NYCBH Dryvax клона DPP21, VACV-IOC, Mulford 1902, хориоаллантоисного вируса осповакцины Анкара (CVA), модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и MVA-BN.

8. Рекомбинантный поксвирус по любому из вариантов осуществления 1-7, где белок SARS-CoV-2 является S-белком.

9. Рекомбинантный поксвирус по любому из вариантов осуществления 1-8, где аминокислотная последовательность белка вируса SARS-CoV-2 модифицирована относительно белка дикого типа.

10. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 8, где S-белок вируса SARS-CoV-2 модифицирован для инфицирования мышей.

11. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 8, где аминокислотная последовательность S-белка вируса SARS-CoV-2 содержит одну или более замен, выбранных из Y459H, D614G, S943P, K986P и V987P, относительно S-белка дикого типа (SEQ ID NO: 47).

12. Рекомбинантный поксвирус по любому из вариантов осуществления 1-11, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в области поксвируса, неявляющейся необходимой для репликации поксвируса.

13. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 12, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена тимидинкиназы (TK) поксвируса.

14. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 12, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена гомолога B22R поксвируса.

15. Рекомбинантный поксвирус по любому из вариантов осуществления 1-14, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, функционально связана с промотором.

16. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 15, где промотор является поксвирус-специфическим промотором.

17. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 16, где поксвирус-специфический промотор является ранним промотором вируса осповакцины.

18. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 16, где поксвирус-специфический промотор является поздним промотором вируса осповакцины.

19. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 16, где поксвирус-специфический промотор представляет собой тандем раннего и позднего промотора вируса осповакцины.

20. Рекомбинантный поксвирус по любому из вариантов осуществления 1-19, где поксвирус является синтетическим поксвирусом.

21. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 20, где рекомбинантный поксвирус выбран из группы, состоящей из TNX-2200 (synVACVΔA2K105$^{SARS\text{-}CoV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-2200 клона 1.1.1,1.1, TNX-2200 клона 2.1.1.1.1, TNX-1800 (scHPXVΔ200$^{SARS\text{-}COV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-1800a, TNX-1800a-1, TNX-1800b и TNX-1800b-2.

22. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 21, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800b-2.

23. Рекомбинантный вирус по варианту осуществления 21, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800a-1.

24. Рекомбинантный поксвирус по варианту осуществления 20, где рекомбинантный поксвирус содержит любую из SEQ ID NO: 63, 64 или 65.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный поксвирус по любому из вариантов осуществления 1-24 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 25, где рекомбинантный поксвирус выбран из группы, состоящей из TNX-2200 (synVACVΔA2K105$^{SARS\text{-}CoV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-2200 клона 1.1.1.1.1, TNX-2200 клона 2.1.1.1.1, TNX-1800 (scHPXVΔ200$^{SARS\text{-}COV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-1800a, TNX-1800a-1, TNX-1800b и TNX-1800b-2.

27. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 25, где рекомбинантный поксвирус содержит любую из SEQ ID NO: 63, 64 или 65.

28. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 26, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800b-2.

29. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 26, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800a-1.

30. Клетка, инфицированная рекомбинантным поксвирусом по любому из вариантов осуществления 1-29.

31. Клетка по варианту осуществления 30, где клетка является клеткой млекопитающего.

32. Клетка по варианту осуществления 31, где клетка млекопитающего является клеткой Vero, клеткой Vero E6 или клеткой BSC-40.

33. Клетка по варианту осуществления 31, где клетка млекопитающего является адгезивной клеткой Vero, суспензионной клеткой Vero, клеткой BHK-21, клеткой Vero с нокаутом ACE2 или клеткой MRC-5.

34. Клетка MRC-5 по варианту осуществления 33, выращенная в присутствии 5% эмбриональной телячьей сыворотки.

35. Клетка по варианту осуществления 30, где клетка является клеткой птицы.

36. Клетка по варианту осуществления 35, где клетка птицы является эмбриональным фибробластом курицы, эмбриональной клеткой утки, клеткой EB66®, клеткой AGE1.CRpIX® или клеткой DF-1.

37. Клетка по варианту осуществления 30, где клетка является адгезивной клеткой.

38. Клетка по варианту осуществления 30, где клетка является суспензионной клеткой.

39. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2, включающий инфицирование указанной клетки рекомбинантным поксвирусом по любому из вариантов осуществления 1-24 и селекцию инфицированной клетки, экспрессирующей указанный белок вируса SARS-CoV-2.

40. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по варианту осуществления 39, где рекомбинантный поксвирус выбран из группы, состоящей из TNX-2200 (synVACVΔA2K105$^{SARS\text{-}CoV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-2200 клона 1.1.1.1.1, TNX-2200 клона 2.1.1.1.1, TNX-1800 (scHPXVΔ200$^{SARS\text{-}COV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-1800a, TNX-1800a-1, TNX-1800b и TNX-1800b-2.

41. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по варианту осуществления 39, где рекомбинантный поксвирус содержит любую из SEQ ID NO: 63, 64 или 65.

42. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по варианту осуществления 40, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800b-2.

43. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по варианту осуществления 40, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800a-1.

44. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из вариантов осуществления 1-24 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 25-29.

45. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по варианту осуществления 44, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

46. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по варианту осуществления 44, где указанный иммунный ответ включает антитела, способные нейтрализовать вирус SARS-CoV-2.

47. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по варианту осуществления 44, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2.

48. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по варианту осуществления 44, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование вируса после инфицирования индивидуума SARS-CoV-2.

49. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по варианту осуществления 44, где иммунный ответ является Т-клеточным иммунным ответом.

50. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из вариантов осуществления 1-24 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 25-29.

51. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 50, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

52. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 50, где указанный иммунный ответ включает антитела, способные нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 и поксвирус.

53. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 50, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2 и поксвируса.

54. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 50, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование инфекции вируса SARS-CoV-2 и/или инфекции поксвируса у индивидуума.

55. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 50, где иммунный ответ является Т-клеточным иммунным ответом.

56. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по любому из вариантов осуществления 50-55, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

57. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из вариантов осуществления 1-24 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 25-29.

58. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 по варианту осуществления 57, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

59. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 по варианту осуществления 57, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2.

60. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 по варианту осуществления 57, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование инфекции SARS-CoV-2 у индивидуума.

61. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из вариантов осуществления 1-24 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 25-29.

62. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 61, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

63. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 61, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2 и поксвируса.

64. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по варианту осуществления 61, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование инфекции SARS-CoV-2 и/или инфекции поксвируса у индивидуума.

65. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по любому из вариантов осуществления 61-64, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

66. Способ получения рекомбинантного поксвируса по любому из вариантов осуществления 1-65, включающий:

(a) инфицирование клетки-хозяина поксвирусом;

(b) трансфекцию инфицированной клетки со стадии (a) с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей белок вируса SARS-CoV-2, для получения рекомбинантного поксвируса; и

(c) селекцию рекомбинантного поксвируса, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, после трансфекции локализована в области поксвируса, неявляющейся необходимой для репликации поксвируса.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 39-66, где белок SARS-CoV-2 выбран из группы, состоящей из спайкового S-белка, M-белка и N-белка или комбинаций двух или более указанных белков.

68. Способ по любому из вариантов осуществления 39-67, где поксвирус является ортопоксвирусом.

69. Способ по варианту осуществления 68, где ортопоксвирус выбран из группы, состоящей из вируса оспы верблюдов (CMLV), вируса коровьей оспы (CPXV), вируса эктромелии (ECTV), вируса оспы лошадей (HPXV), вируса оспы обезьян (MPXV), вируса осповакцины (VACV), вируса натуральной оспы (VARV), вируса оспы кроликов (RPXV), вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин Гишу и вируса оспы полевок.

70. Способ по варианту осуществления 68, где ортопоксвирус является вирусом оспы лошадей.

71. Способ по варианту осуществления 70, где вирус оспы лошадей представляет собой штамм MNR-76.

72. Способ по варианту осуществления 68, где ортопоксвирус является вирусом осповакцины.

73. Способ по варианту осуществления 72, где вирус осповакцины выбран из группы штаммов, состоящей из: Western Reserve, Western Reserve клона 3, Tian Tian, Tian Tian клона TP5, Tian Tian клона TP3, NYCBH, NYCBH клона Acambis 2000, Wyeth, Copenhagen, Lister, Lister 107, Lister-LO, Lister GL-ONC1, Lister GL-ONC2, Lister GL-ONC3, Lister GL-ONC4, Lister CTC1, Lister IMG2 (Turbo FP635), IHD-W, LC16m18, Lederle, Tashkent клона TKT3, Tashkent клона TKT4, USSR, Evans, Praha, L-IVP, V-VET1 или LIVP 6.1.1, Ikeda, EM-63, Malbran, Duke, 3737, CV-1, Connaught Laboratories, Serro 2, CM-01, NYCBH Dryvax клона DPP13, NYCBH Dryvax клона DPP15, NYCBH Dryvax клона DPP20, NYCBH Dryvax клона DPP17, NYCBH Dryvax клона DPP21, VACV-IOC, хориоаллантоисного вируса осповакцины Анкара (CVA), модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и MVA-BN.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 39-73, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в области поксвируса, неявляющейся необходимой для репликации поксвируса.

75. Способ по варианту осуществления 74, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена тимидинкиназы (TK) поксвируса.

76. Способ по варианту осуществления 74, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена гомолога B22R поксвируса.

77. Способ по любому из вариантов осуществления 39-76, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, функционально связана с промотором.

78. Способ по варианту осуществления 77, где промотор является поксвирус-специфическим промотором.

79. Способ по варианту осуществления 78, где поксвирус-специфический промотор является ранним промотором вируса осповакцины.

80. Способ по варианту осуществления 78, где поксвирус-специфический промотор является поздним промотором вируса осповакцины.

81. Способ по варианту осуществления 78, где поксвирус-специфический промотор представляет собой тандем раннего и позднего промотора вируса осповакцины.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 39-81, где поксвирус является синтетическим поксвирусом.

83. Способ снижения или профилактики прогрессирования инфекции вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, нуждающегося в этом или находящегося в группе риска, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного

количества рекомбинантного поксвируса по любому из вариантов осуществления 1-24 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 25-29.

84. Способ снижения или профилактики прогрессирования инфекции вируса SARS-CoV-2 и поксвируса у индивидуума, нуждающегося в этом или находящегося в группе риска, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из вариантов осуществления 1-24 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 25-29.

85. Способ снижения или профилактики прогрессирование вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

86. Вакцина против вируса SARS-CoV-2, содержащая рекомбинантный вирус по вариантам осуществления 1-24 или фармацевтическую композицию по вариантам осуществления 25-29.

87. Бивалентная вакцина против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, содержащая рекомбинантный вирус по вариантам осуществления 1-24 или фармацевтическую композицию по вариантам осуществления 25-29.

88. Бивалентная вакцина против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный поксвирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок вируса SARS-CoV-2, где белок SARS-CoV-2 выбран из группы, состоящей из спайкового белка (S), мембранного белка (M) и нуклеокапсидного белка (N) или комбинаций двух или более указанных белков.

2. Рекомбинантный поксвирус по п.1, где поксвирус является ортопоксвирусом.

3. Рекомбинантный поксвирус по п.2, где ортопоксвирус выбран из группы, состоящей из вируса оспы верблюдов (CMLV), вируса коровьей оспы (CPXV), вируса эктромелии (ECTV), вируса оспы лошадей (HPXV), вируса оспы обезьян (MPXV), вируса осповакцины (VACV), вируса натуральной оспы (VARV), вируса оспы кроликов (RPXV), вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин Гишу и вируса оспы полевок.

4. Рекомбинантный поксвирус по п.2, где ортопоксвирус является вирусом оспы лошадей.

5. Рекомбинантный поксвирус по п.4, где вирус оспы лошадей представляет собой штамм MNR-76.

6. Рекомбинантный поксвирус по п.2, где ортопоксвирус является вирусом осповакцины.

7. Рекомбинантный поксвирус по п.6, где вирус осповакцины выбран из группы штаммов, состоящей из: Western Reserve, Western Reserve клона 3, Tian Tian, Tian Tian клона TP5, Tian Tian клона TP3, NYCBH, NYCBH клона Acambis 2000 (ACAM 2000), Wyeth, Copenhagen, Lister, Lister 107, Lister-LO, Lister GL-ONC1, Lister GL-ONC2, Lister GL-ONC3, Lister GL-ONC4, Lister CTC1, Lister IMG2 (Turbo FP635), IHD-W, LC16m18, Lederle, Tashkent клона TKT3, Tashkent клона TKT4, USSR, Evans, Praha, L-IVP, V-VET1 или LIVP 6.1.1, Ikeda, EM-63, Malbran, Duke, 3737, CV-1, Connaught Laboratories, Serro 2, CM-01, NYCBH Dryvax клона DPP13, NYCBH Dryvax клона DPP15, NYCBH Dryvax клона DPP20, NYCBH Dryvax клона DPP17, NYCBH Dryvax клона DPP21, VACV-IOC, Mulford 1902, хориоаллантоисного вируса осповакцины Анкара (CVA), модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и MVA-BN.

8. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп. 1-7, где белок SARS-CoV-2 является S-белком.

9. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп. 1-8, где аминокислотная последовательность белка вируса SARS-CoV-2 модифицирована относительно белка дикого типа.

10. Рекомбинантный поксвирус по п.8, где S-белок вируса SARS-CoV-2 модифицирован для инфицирования мышей.

11. Рекомбинантный поксвирус по п.8, где аминокислотная последовательность S-белка вируса SARS-CoV-2 содержит одну или более замен, выбранных из Y459H, D614G, S943P, K986P и V987P, относительно S-белка дикого типа (SEQ ID NO: 47).

12. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп. 1-11, где нуклеиновая кислота,

кодирующая белок вируса SARS-CoV-2 локализована в области поксвируса, неявляющейся необходимой для репликации поксвируса.

13. Рекомбинантный поксвирус по п.12, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена тимидинкиназы (TK) поксвируса.

14. Рекомбинантный поксвирус по п.12, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена гомолога B22R поксвируса.

15. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп. 1-14, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, функционально связана с промотором.

16. Рекомбинантный поксвирус по п.15, где промотор является поксвирус-специфическим промотором.

17. Рекомбинантный поксвирус по п.16, где поксвирус-специфический промотор является ранним промотором вируса осповакцины.

18. Рекомбинантный поксвирус по п.16, где поксвирус-специфический промотор является поздним промотором вируса осповакцины.

19. Рекомбинантный поксвирус по п.16, где поксвирус-специфический промотор представляет собой тандем раннего и позднего промотора вируса осповакцины.

20. Рекомбинантный поксвирус по любому из пп. 1-19, где поксвирус является синтетическим поксвирусом.

21. Рекомбинантный поксвирус по п.20, где рекомбинантный поксвирус выбран из группы, состоящей из TNX-2200 (synVACVΔA2K105$^{SARS\text{-}CoV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-2200 клона 1.1.1.1.1, TNX-2200 клона 2.1.1.1.1, TNX-1800 (scHPXVΔ200$^{SARS\text{-}COV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-1800a, TNX-1800a-1, TNX-1800b и TNX-1800b-2.

22. Рекомбинантный поксвирус по п.21, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800b-2.

23. Рекомбинантный вирус по п.21, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800a-1.

24. Рекомбинантный поксвирус по п.20, где рекомбинантный поксвирус содержит любую из SEQ ID NO: 63, 64 или 65.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный поксвирус по любому из пп. 1-24 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, где рекомбинантный поксвирус выбран из группы, состоящей из TNX-2200 (synVACVΔA2K105$^{SARS\text{-}CoV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-2200 клона 1.1.1.1.1, TNX-2200 клона 2.1.1.1.1, TNX-1800 (scHPXVΔ200$^{SARS\text{-}COV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-1800a, TNX-1800a-1, TNX-1800b и TNX-1800b-2.

27. Фармацевтическая композиция по п.25, где рекомбинантный поксвирус содержит любую из SEQ ID NO: 63, 64 или 65.

28. Фармацевтическая композиция по п.26, где рекомбинантный поксвирус представляет собой TNX-1800b-2.

29. Фармацевтическая композиция по п.26, где рекомбинантный поксвирус представляет собой TNX-1800a-1.

30. Клетка, инфицированная рекомбинантным поксвирусом по любому из пп. 1-29.

31. Клетка по п.30, где клетка является клеткой млекопитающего.

32. Клетка по п.31, где клетка млекопитающего является клеткой Vero, клеткой Vero E6 или клеткой BSC-40.

33. Клетка по п.31, где клетка млекопитающего является адгезивной клеткой Vero, суспензионной клеткой Vero, клеткой BHK-21, клеткой Vero с нокаутом ACE2 или клеткой MRC-5.

34. Клетка MRC-5 по п.33, выращенная в присутствии 5% эмбриональной телячьей сыворотки.

35. Клетка по п.30, где клетка является клеткой птицы.

36. Клетка по п.35, где клетка птицы является эмбриональным фибробластом курицы, эмбриональной клеткой утки, клеткой EB66®, клеткой AGE1.CRpIX® или клеткой DF-1.

37. Клетка по п.30, где клетка является адгезивной клеткой.

38. Клетка по п.30, где клетка является суспензионной клеткой.

39. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2, включающий инфицирование указанной клетки рекомбинантным поксвирусом по любому из пп. 1-24 и селекцию инфицированной клетки, экспрессирующей указанный белок вируса SARS-CoV-2.

40. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по п.39, где рекомбинантный поксвирус выбран из группы, состоящей из TNX-2200 (synVACVΔA2K105$^{SARS\text{-}CoV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-2200 клона 1.1.1.1.1, TNX-2200 клона 2.1.1.1.1, TNX-1800 (scHPXVΔ200$^{SARS\text{-}COV2\text{-}Spike\text{-}co}$), TNX-1800a, TNX-1800a-1, TNX-1800b и TNX-1800b-2.

41. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по п.39, где рекомбинантный поксвирус содержит любую из SEQ ID NO: 63, 64 или 65.

42. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по п.40, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800b-2.

43. Способ селекции клетки, экспрессирующей белок вируса SARS-CoV-2 по п.40, где рекомбинантный поксвирус является TNX-1800a-1.

44. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по любому из пп. 25-29.

45. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по п.44, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

46. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по п.44, где указанный иммунный ответ включает антитела, способные нейтрализовать вирус SARS-CoV-2.

47. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по п.44, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2.

48. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по п.44, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование вируса после инфицирования индивидуума SARS-CoV-2.

49. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 у индивидуума по п.44, где иммунный ответ является Т-клеточным иммунным ответом.

50. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по любому из пп. 25-29.

51. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.50, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

52. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.50, где указанный иммунный ответ включает антитела, способные нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 и поксвирус.

53. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.50, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2 и поксвируса.

54. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.50,где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование инфекции вируса SARS-CoV-2 и/или инфекции поксвируса у индивидуума.

55. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.50, где иммунный ответ является Т-клеточным иммунным ответом.

56. Способ индукции иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по любому из пп. 50-55, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

57. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по любому из пп. 25-29.

58. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 по п.57, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

59. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 по п.57, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может

защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2.

60. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 по п.57, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование инфекции SARS-CoV-2 у индивидуума.

61. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по любому из пп. 25-29.

62. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.61, где указанное иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса вводят посредством скарификации.

63. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.61, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса может защищать индивидуума от вируса SARS-CoV-2 и поксвируса.

64. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по п.61, где иммунологически эффективное количество рекомбинантного поксвируса снижает или предотвращает прогрессирование инфекции SARS-CoV-2 и/или инфекции поксвируса у индивидуума.

65. Способ индукции Т-клеточного иммунитета против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса по любому из пп. 61-64, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

66. Способ получения рекомбинантного поксвируса по любому из пп. 1-65, включающий:

(d) инфицирование клетки-хозяина поксвирусом;

(e) трансфекцию инфицированной клетки со стадии (a) с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей белок вируса SARS-CoV-2, для получения рекомбинантного поксвируса; и

(f) селекцию рекомбинантного поксвируса, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, после трансфекции локализована в области поксвируса, неявляющейся необходимой для репликации поксвируса.

67. Способ по любому из пп. 39-66, где белок SARS-CoV-2 выбран из группы, состоящей из спайкового S-белка, M-белка и N-белка или комбинаций двух или более указанных белков.

68. Способ по любому из пп. 39-67, где поксвирус является ортопоксвирусом.

69. Способ по п.68, где ортопоксвирус выбран из группы, состоящей из вируса оспы верблюдов (CMLV), вируса коровьей оспы (CPXV), вируса эктромелии (ECTV), вируса оспы лошадей (HPXV), вируса оспы обезьян (MPXV), вируса осповакцины (VACV), вируса натуральной оспы (VARV), вируса оспы кроликов (RPXV), вируса оспы североамериканских енотов, вируса оспы североамериканских скунсов, вируса оспы гололапых песчанок, вируса болезни Уасин Гишу и вируса оспы полевок.

70. Способ по п.68, где ортопоксвирус является вирусом оспы лошадей.

71. Способ по п.70, где вирус оспы лошадей представляет собой штамм MNR-76.

72. Способ по п.68, где ортопоксвирус является вирусом осповакцины.

73. Способ по п.72, где вирус осповакцины выбран из группы штаммов, состоящей из: Western Reserve, Western Reserve клона 3, Tian Tian, Tian Tian клона TP5, Tian Tian клона TP3, NYCBH, NYCBH клона Acambis 2000, Wyeth, Copenhagen, Lister, Lister 107, Lister-LO, Lister GL-ONC1, Lister GL-ONC2, Lister GL-ONC3, Lister GL-ONC4, Lister CTC1, Lister IMG2 (Turbo FP635), IHD-W, LC16m18, Lederle, Tashkent клона TKT3, Tashkent клона TKT4, USSR, Evans, Praha, L-IVP, V-VET1 или LIVP 6.1.1, Ikeda, EM-63, Malbran, Duke, 3737, CV-1, Connaught Laboratories, Serro 2, CM-01, NYCBH Dryvax клона DPP13, NYCBH Dryvax клона DPP15, NYCBH Dryvax клона DPP20, NYCBH Dryvax клона DPP17, NYCBH Dryvax клона DPP21, VACV-IOC, хориоаллантоисного вируса осповакцины Анкара (CVA), модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) и MVA-BN.

74. Способ по любому из пп. 39-73, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в области поксвируса, неявляющейся необходимой для репликации поксвируса.

75. Способ по п.74, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена тимидинкиназы (TK) поксвируса.

76. Способ по п.74, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, локализована в локусе гена гомолога B22R поксвируса.

77. Способ по любому из пп. 39-76, где нуклеиновая кислота, кодирующая белок вируса SARS-CoV-2, функционально связана с промотором.

78. Способ по п.77, где промотор является поксвирус-специфическим промотором.

79. Способ по п.78, где поксвирус-специфический промотор является ранним промотором вируса осповакцины.

80. Способ по п.78, где поксвирус-специфический промотор является поздним промотором вируса осповакцины.

81. Способ по п.78, где поксвирус-специфический промотор представляет собой тандем раннего и позднего промотора вируса осповакцины.

82. Способ по любому из пп. 39-81, где поксвирус является синтетическим поксвирусом.

83. Способ снижения или профилактики прогрессирования инфекции вируса SARS-CoV-2 у индивидуума, нуждающегося в этом или находящегося в группе риска, включающий введение указанному индивидууму иммунологически эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по любому из пп. 25-29.

84. Способ снижения или профилактики прогрессирования инфекции вируса SARS-CoV-2 и поксвируса у индивидуума, нуждающегося в этом или находящегося в группе риска, включающий введение указанному индивидууму иммунологически

эффективного количества рекомбинантного поксвируса по любому из пп. 1-24 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 25-29.

85. Способ снижения или профилактики прогрессирования вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

86. Вакцина против вируса SARS-CoV-2, содержащая рекомбинантный вирус по пп. 1-24 или фармацевтическую композицию по пп. 25-29.

87. Бивалентная вакцина против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, содержащая рекомбинантный вирус по пп. 1-24 или фармацевтическую композицию по пп. 25-29.

88. Бивалентная вакцина против вируса SARS-CoV-2 и поксвируса, где поксвирус является вирусом осповакцины, вирусом натуральной оспы, вирусом оспы лошадей или вирусом оспы обезьян.

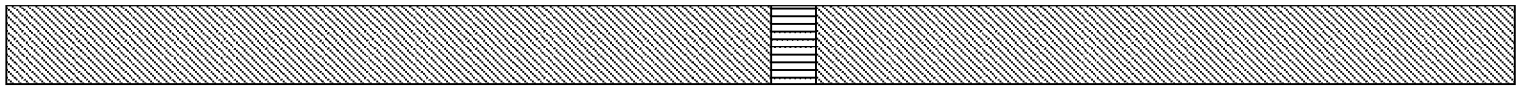
По доверенности

ФИГ. 1

Геномное представление HPXV
Регистрационный номер KY349117
(также см. патентную заявку США № 2018/0251736)

Ген тимидинкиназы (TK)
ID гена: HPXV095.
Положения в геноме: 92077-92610

212811 п.н.

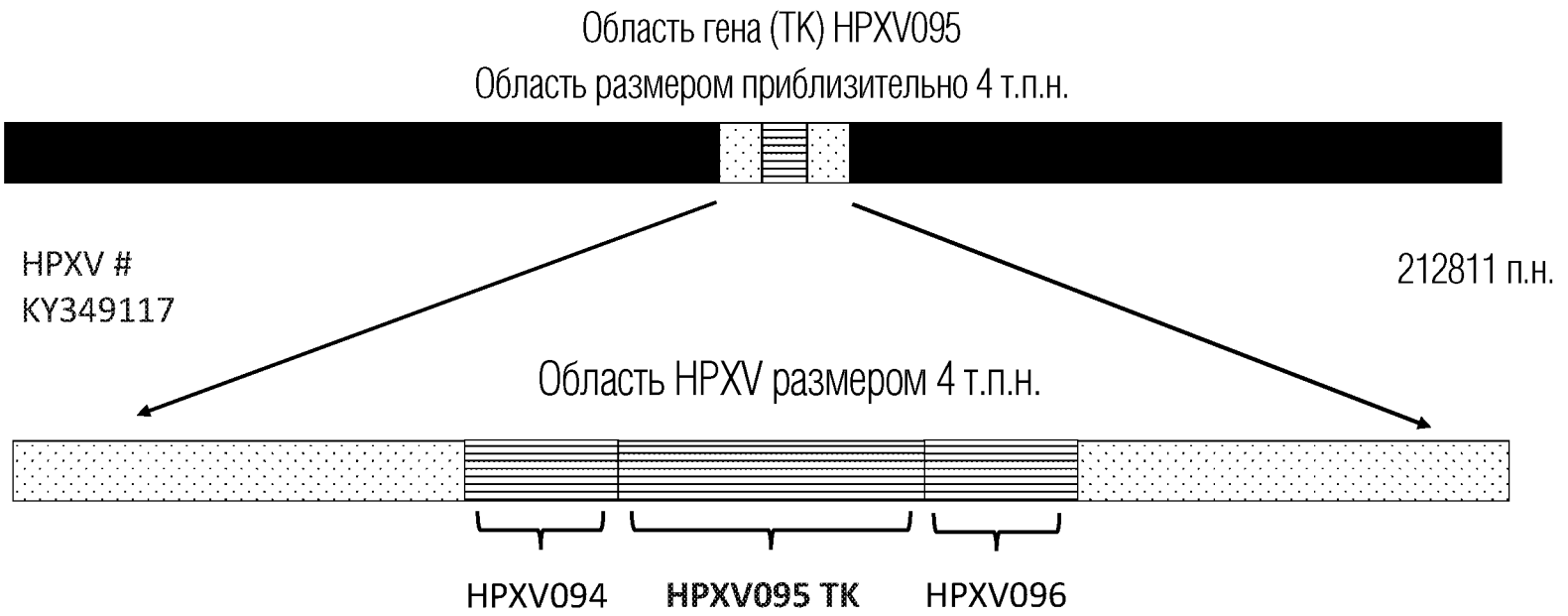


Геномное представление VACV
Регистрационный номер MN974381
(также см. WO 2010/213452)

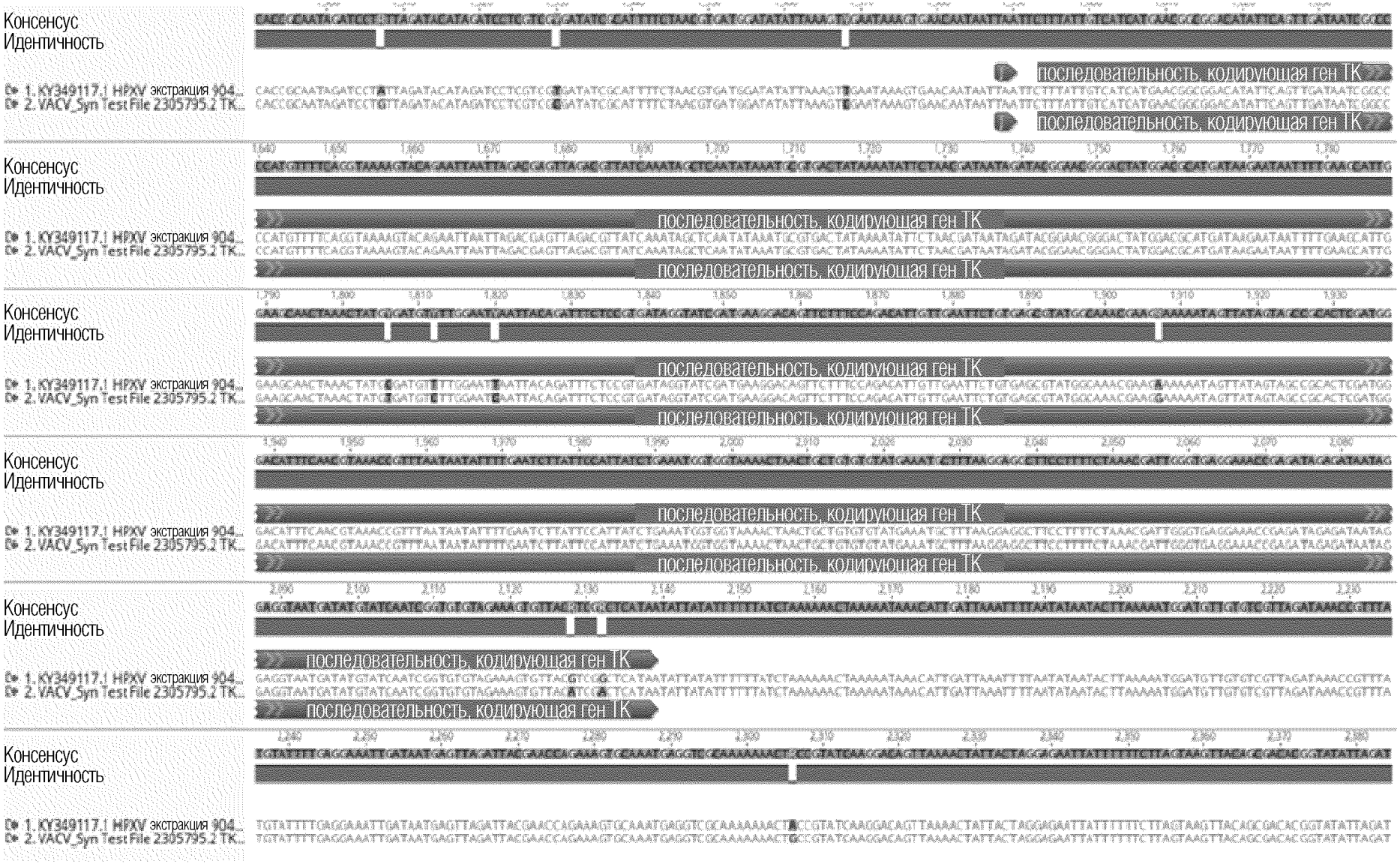
Ген тимидинкиназы (TK)
ID гена: synVACV_105
Положения в геноме: 83823-84344

199617 п.н.

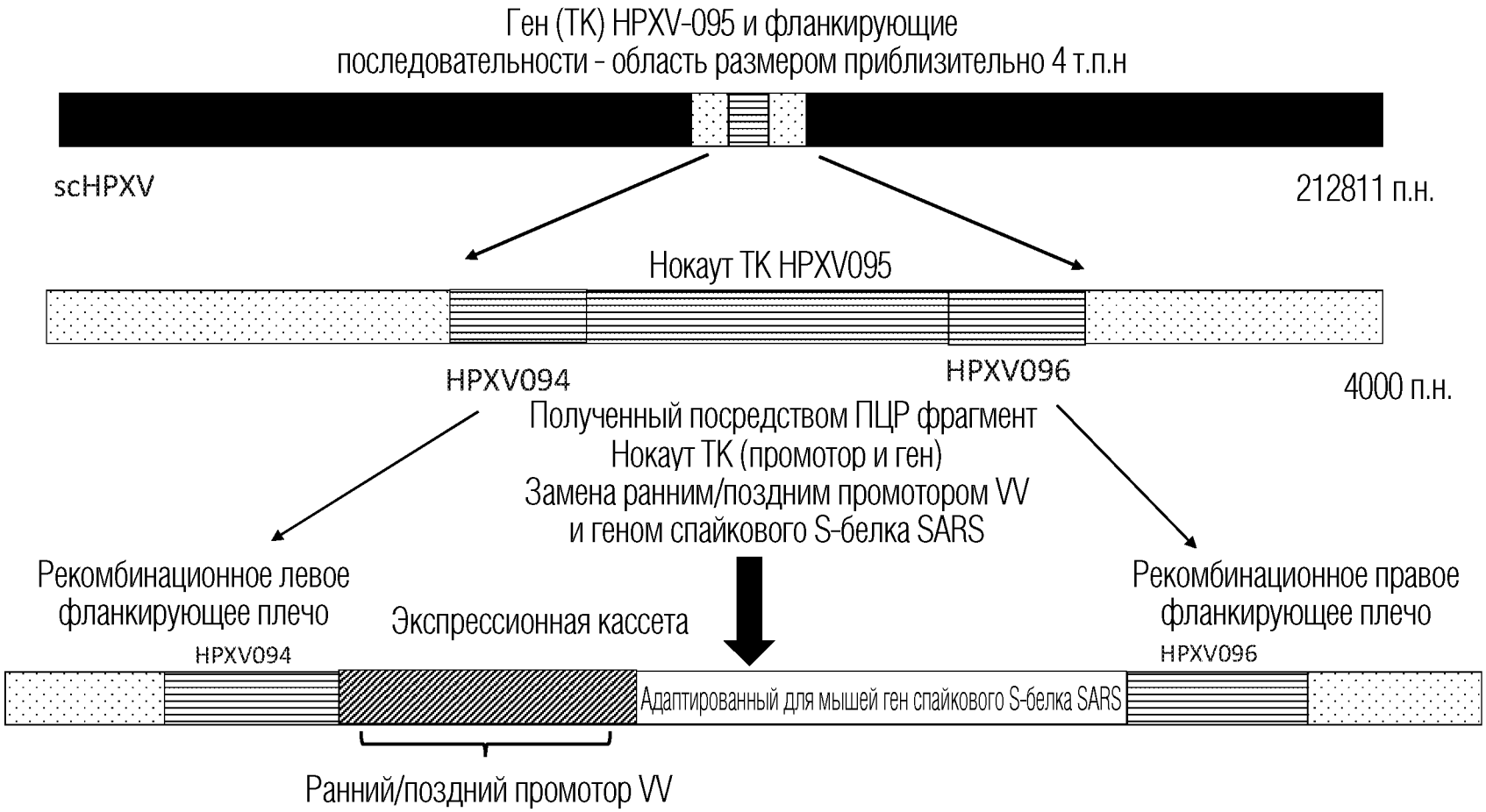
ФИГ. 2


Область гена (TK) HPXV095
Область размером приблизительно 4 т.п.н.
HPXV #
KY349117
212811 п.н.
Область HPXV размером 4 т.п.н.
HPXV094
HPXV095 TK
HPXV096

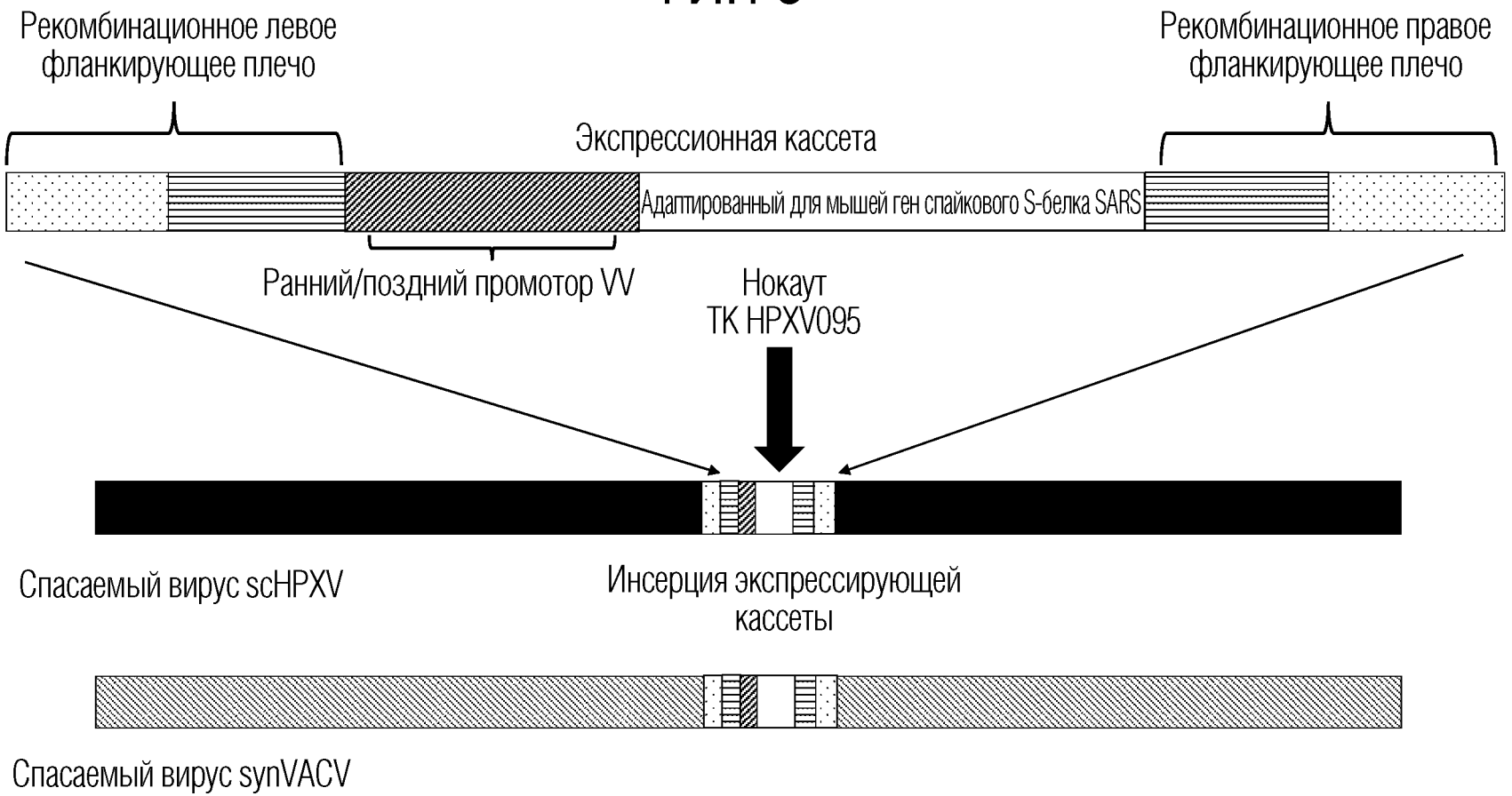
ФИГ. 3


Консенсус
Идентичность
последовательность, кодирующая ген TK
1. KY349117.1 HPXV экстракция 904...
2. VACV_Syn Test File 2305795.2 TK...

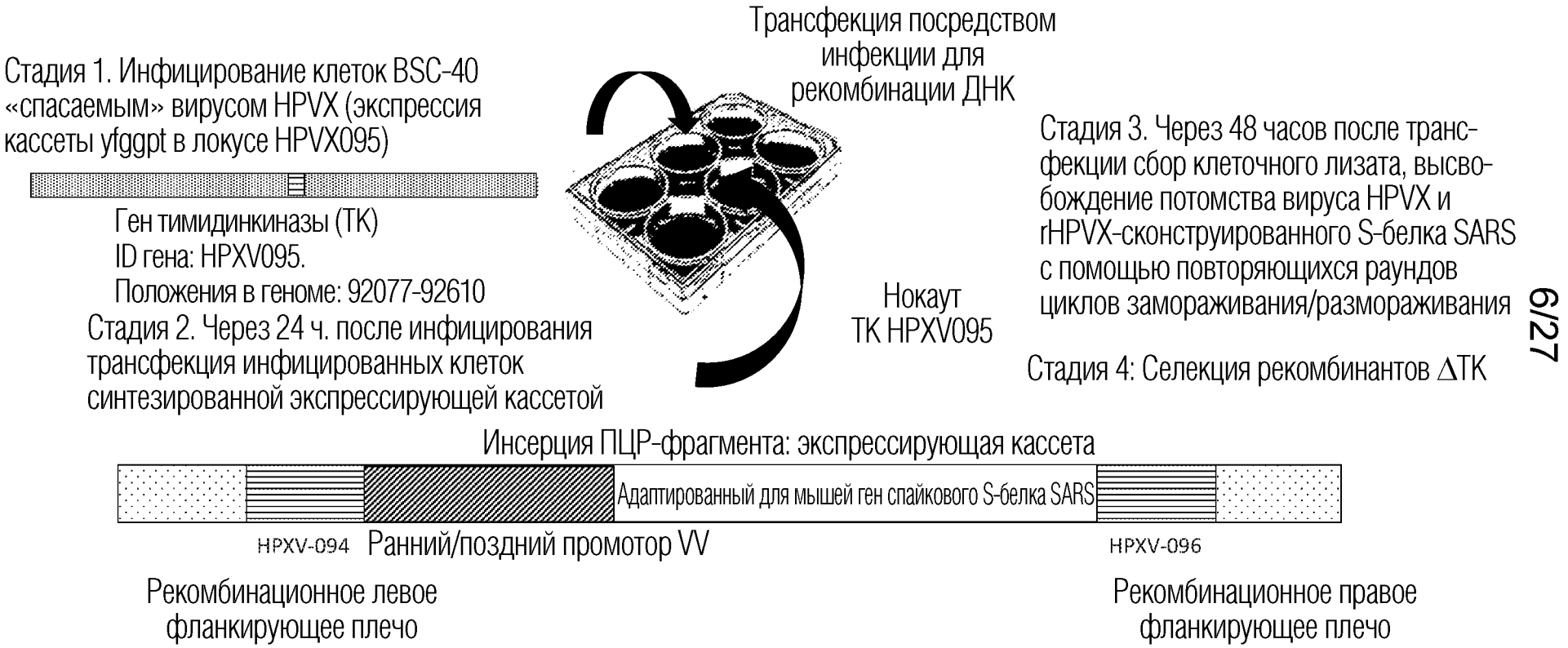
ФИГ. 4


Ген (TK) HPXV-095 и фланкирующие
последовательности - область размером приблизительно 4 т.п.н
scHPXV
212811 п.н.
Нокаут TK HPXV095
HPXV094
HPXV096
4000 п.н.
Полученный посредством ПЦР фрагмент
Нокаут TK (промотор и ген)
Замена ранним/поздним промотором VV
и геном спайкового S-белка SARS
Рекомбинационное левое
фланкирующее плечо
Экспрессионная кассета
Рекомбинационное правое
фланкирующее плечо
HPXV094
HPXV096
Адаптированный для мышей ген спайкового S-белка SARS
Ранний/поздний промотор VV

ФИГ. 5

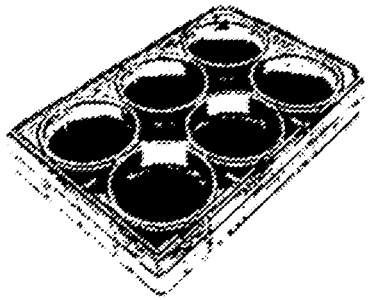

Рекомбинационное левое фланкирующее плечо
Рекомбинационное правое фланкирующее плечо
Экспрессионная кассета
Адаптированный для мышей ген спайкового S-белка SARS
Ранний/поздний промотор VV
Нокаут TK HPXV095
Спасаемый вирус scHPXV
Инсерция экспрессирующей кассеты
Спасаемый вирус synVACV

ФИГ. 6


Стадия 1. Инфицирование клеток BSC-40 «спасаемым» вирусом HPVX (экспрессия кассеты yfggpt в локусе HPVX095)
Ген тимидинкиназы (TK)
ID гена: HPXV095.
Положения в геноме: 92077-92610
Стадия 2. Через 24 ч. после инфицирования трансфекция инфицированных клеток синтезированной экспрессирующей кассетой
Трансфекция посредством инфекции для рекомбинации ДНК
Нокаут TK HPXV095
Стадия 3. Через 48 часов после трансфекции сбор клеточного лизата, высвобождение потомства вируса HPVX и rHPVX-сконструированного S-белка SARS с помощью повторяющихся раундов циклов замораживания/размораживания
Стадия 4: Селекция рекомбинантов ΔTK
Инсерция ПЦР-фрагмента: экспрессирующая кассета
Адаптированный для мышей ген спайкового S-белка SARS
HPXV-094
Ранний/поздний промотор VV
HPXV-096
Рекомбинационное левое фланкирующее плечо
Рекомбинационное правое фланкирующее плечо

ФИГ. 7

Стадия 1.
Инфекция/
трансфекция

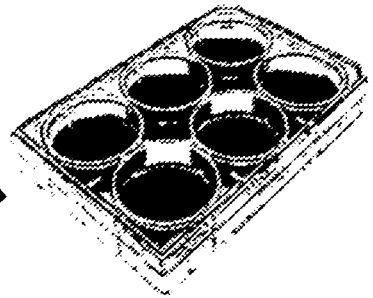


Стадия 2.

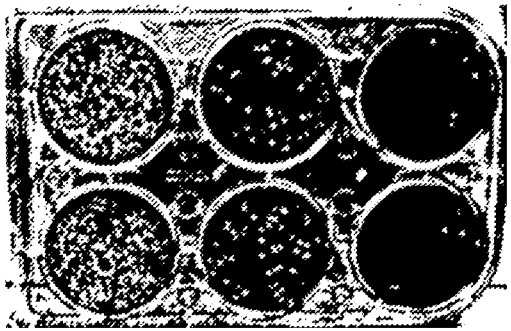
- Сбор после инфекции/трансфекции
- Лизис клеток для высвобождения потомства HPVX и rHPVX-сконструированного S-белка SARS

Стадия 3. Титрование вируса

- Титрование на планшете потомства вируса на клетках BSC-40



Стадия 4. Селекция по фенотипу rHPVX (TK-) (вирусное потомство представляет собой нефлуоресцентные бляшки)



ФИГ. 8

A. Оптимизированные элементы раннего промотора

кор спейсер инициатор

SEQ ID NO: 3: AAAATTGAAANNNTANNNNNNNNNNNNNNNNN

B. Синтетические элементы позднего промотора

Т-фрагмент спейсер инициатор

SEQ ID NO: 4: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNNNNNNTAAATG

C. Перекрывающийся ранний/поздний промотор

кор спейсер инициатор

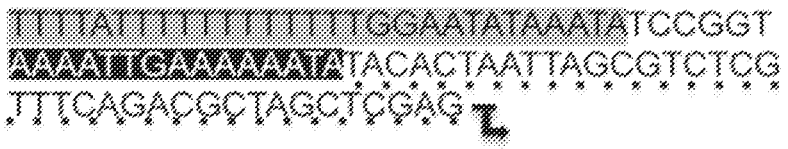
SEQ ID NO: 5: AAAAATTGAAATTTTATTTTTTTTTTTTGGAATATAAATA

Т-фрагмент спейсер инициатор

ФИГ. 9

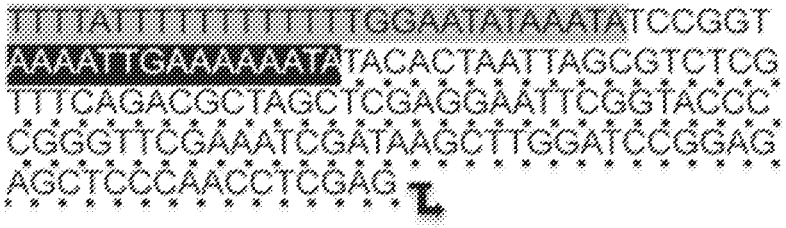
(A)

SEQ ID NO: 37:



(B)

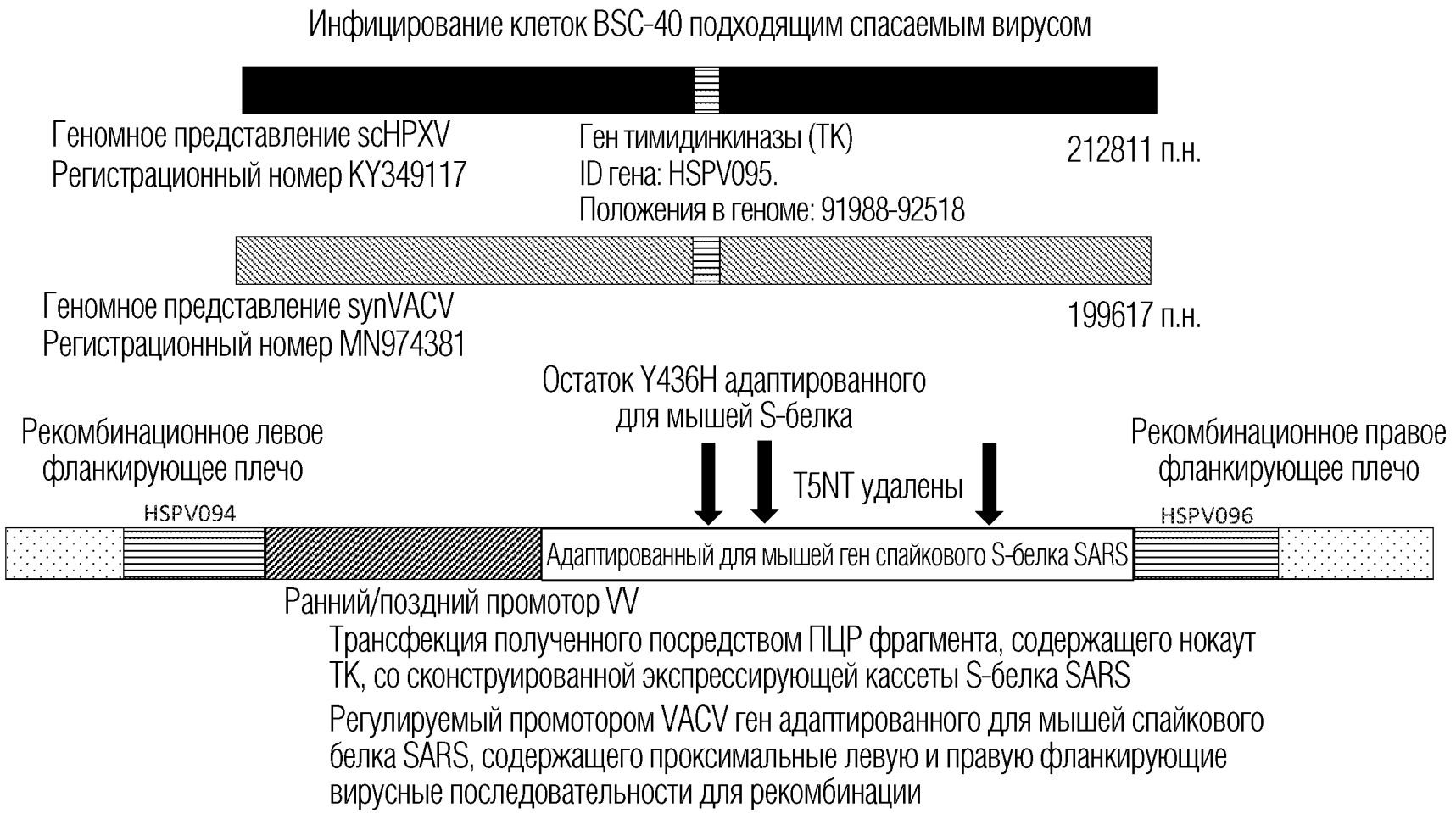
SEQ ID NO: 38:



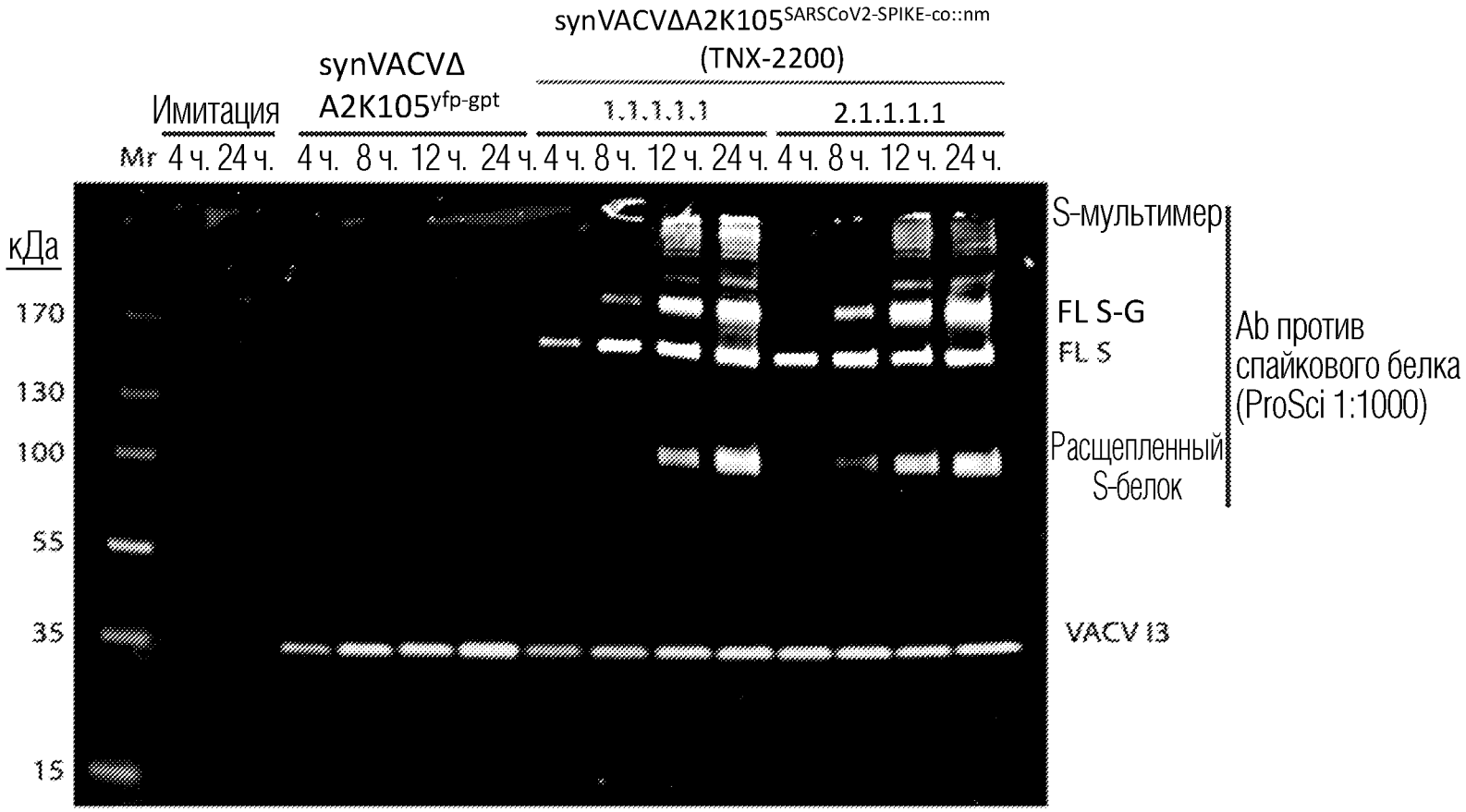
(C)

SEQ ID NO: 39:

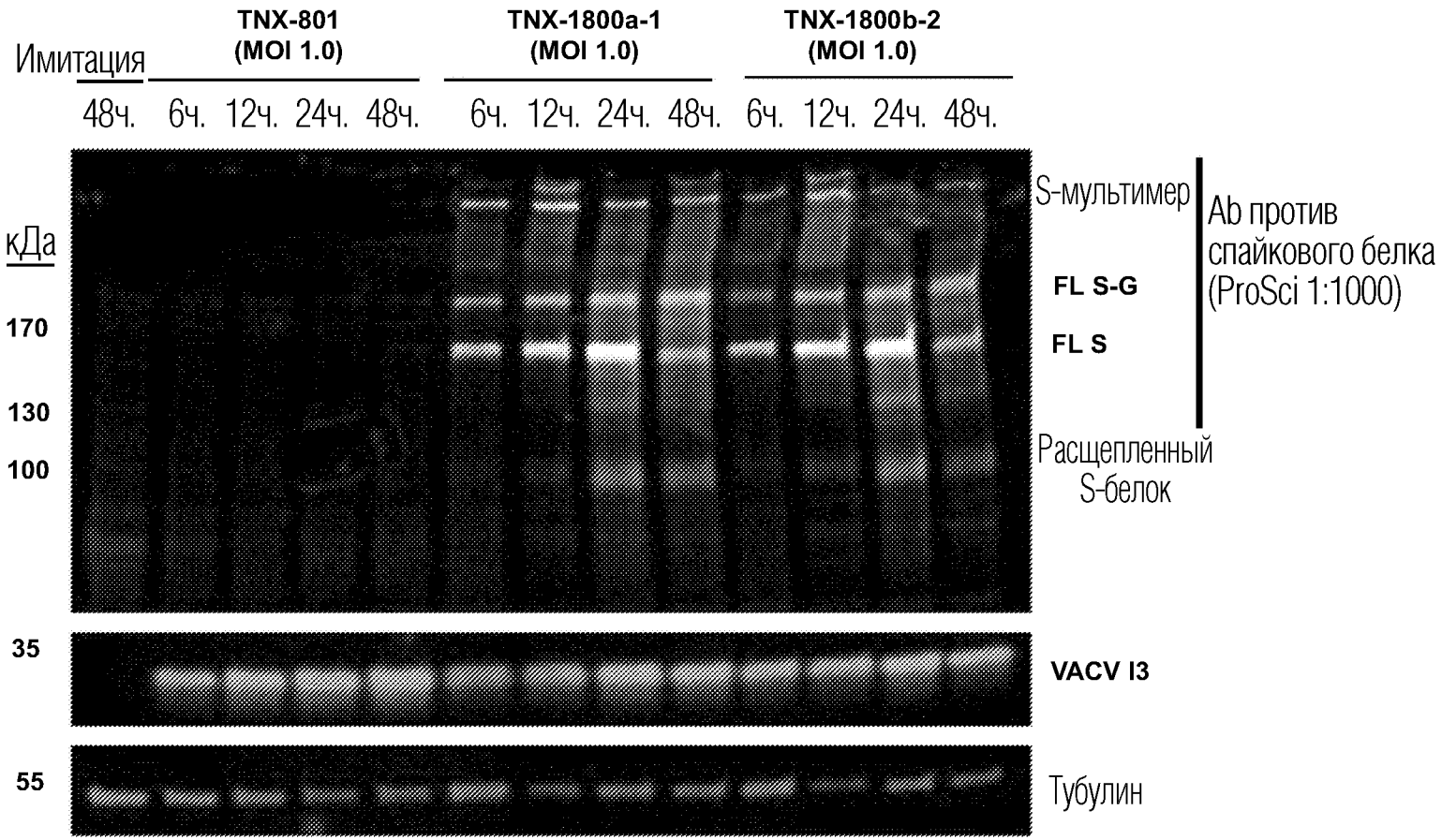
ФИГ. 10


Инфицирование клеток BSC-40 подходящим спасаемым вирусом
Геномное представление scHPXV
Регистрационный номер KY349117
Ген тимидинкиназы (TK)
ID гена: HSPV095.
Положения в геноме: 91988-92518
212811 п.н.
Геномное представление synVACV
Регистрационный номер MN974381
199617 п.н.
Остаток Y436H адаптированного для мышей S-белка
Рекомбинационное левое фланкирующее плечо
T5NT удалены
Рекомбинационное правое фланкирующее плечо
HSPV094
HSPV096
Адаптированный для мышей ген спайкового S-белка SARS
Ранний/поздний промотор VV
Трансфекция полученного посредством ПЦР фрагмента, содержащего нокаут TK, со сконструированной экспрессирующей кассеты S-белка SARS
Регулируемый промотором VACV ген адаптированного для мышей спайкового белка SARS, содержащего проксимальные левую и правую фланкирующие вирусные последовательности для рекомбинации

ФИГ. 11


synVACVΔA2K105SARSCoV2-SPIKE-co::nm
(TNX-2200)
synVACVΔ
A2K105yfp-gpt
Имитация
1.1.1.1.1
2.1.1.1.1
Mr 4 ч. 24 ч. 4 ч. 8 ч. 12 ч. 24 ч. 4 ч. 8 ч. 12 ч. 24 ч. 4 ч. 8 ч. 12 ч. 24 ч.
кДа
170
130
100
55
35
15
S-мультимер
FL S-G
FL S
Расщепленный
S-белок
Ab против
спайкового белка
(ProSci 1:1000)
VACV I3

ФИГ. 12

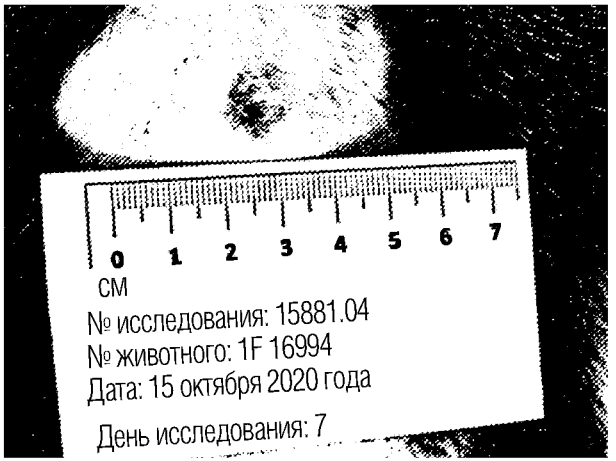

Имитация
TNX-801 (MOI 1.0)
TNX-1800a-1 (MOI 1.0)
TNX-1800b-2 (MOI 1.0)
48ч.
6ч. 12ч. 24ч. 48ч.
6ч. 12ч. 24ч. 48ч.
6ч. 12ч. 24ч. 48ч.
кДа
170
130
100
35
55
S-мультимер
FL S-G
FL S
Расщепленный S-белок
Ab против спайкового белка (ProSci 1:1000)
VACV I3
Тубулин

ФИГ. 13

A.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 1F 16986
Дата:
День исследования: 7

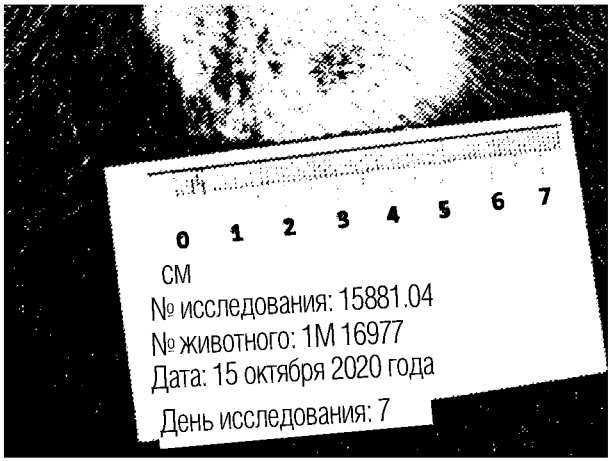
B.


0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 1F 16994
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

C.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 1M 16975
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

D.


0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 1M 16977
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

ФИГ. 14

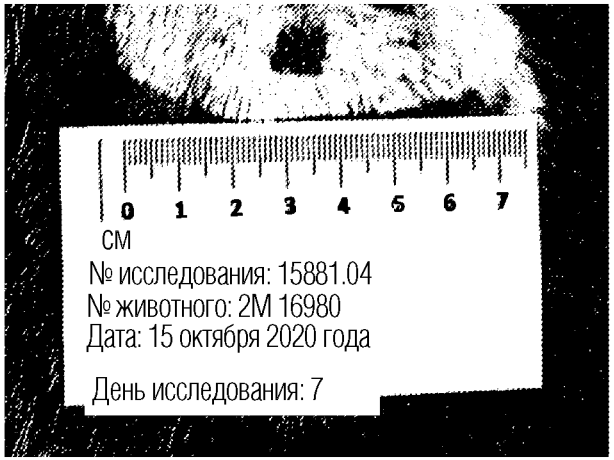
A.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 2F 16985
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

B.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 2F 16991
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

C.

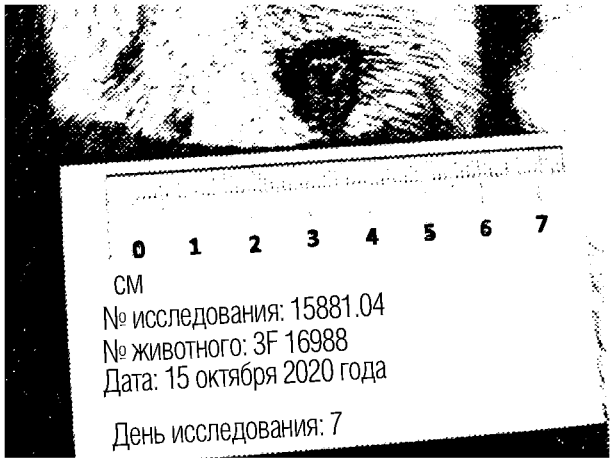

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 2M 16980
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

D.

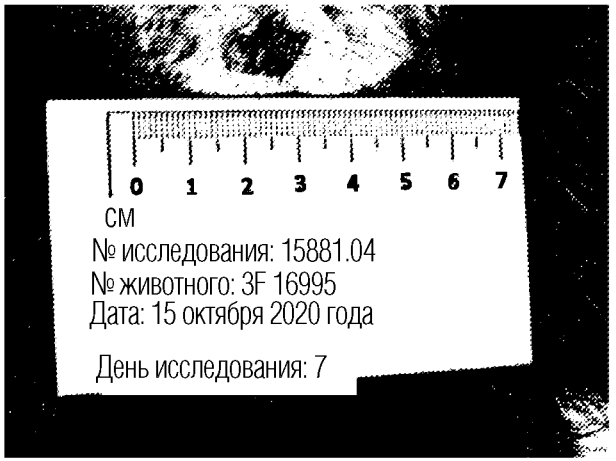
0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 2M 16983
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

ФИГ. 15

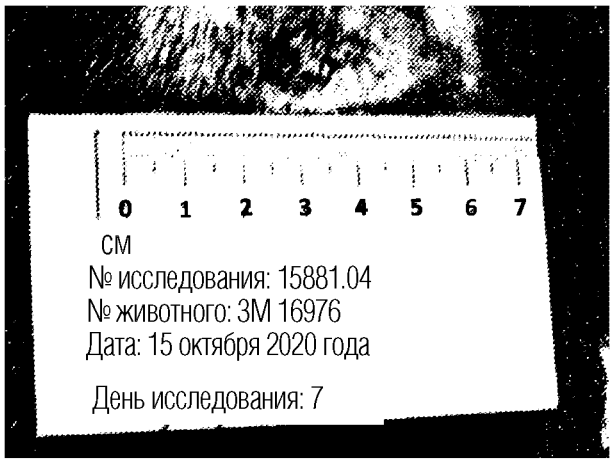
A.


0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 3F 16988
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

B.


0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 3F 16995
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

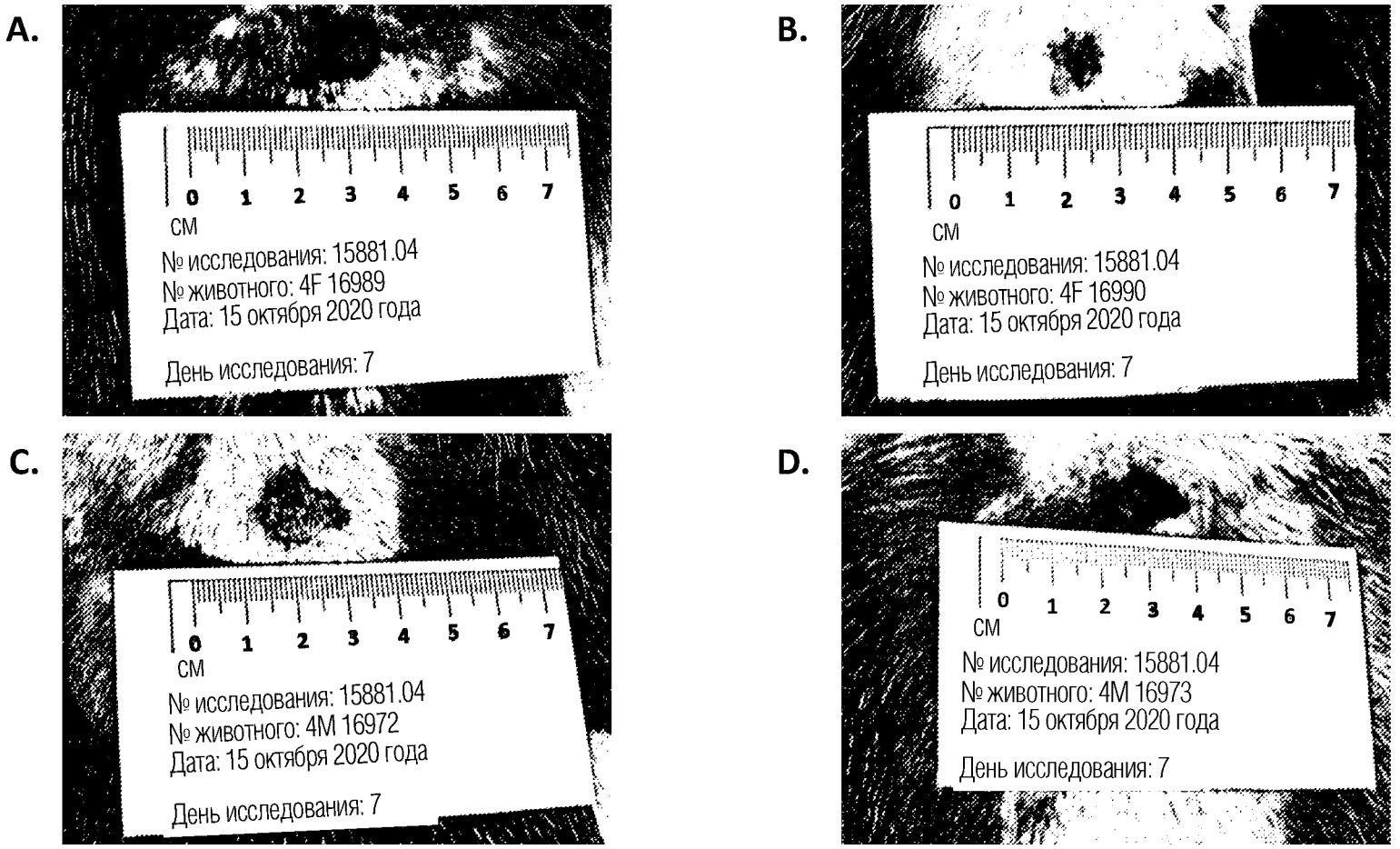
C.


0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 3M 16976
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

D.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 3M 16982
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

ФИГ. 16


A.
0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 4F 16989
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7
B.
0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 4F 16990
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7
C.
0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 4M 16972
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7
D.
0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 4M 16973
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

ФИГ. 17

A.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 5F 16992
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

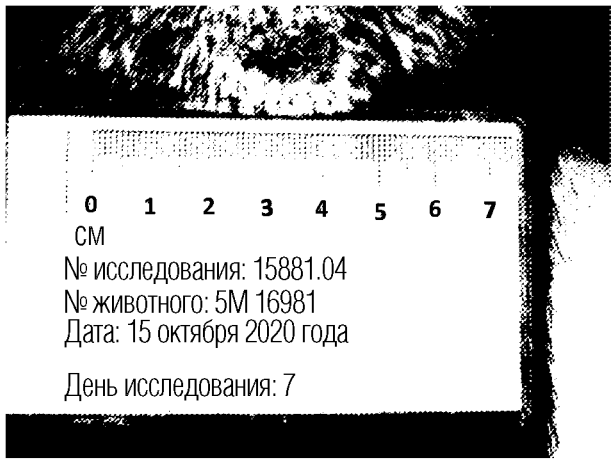
B.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 5F 16993
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

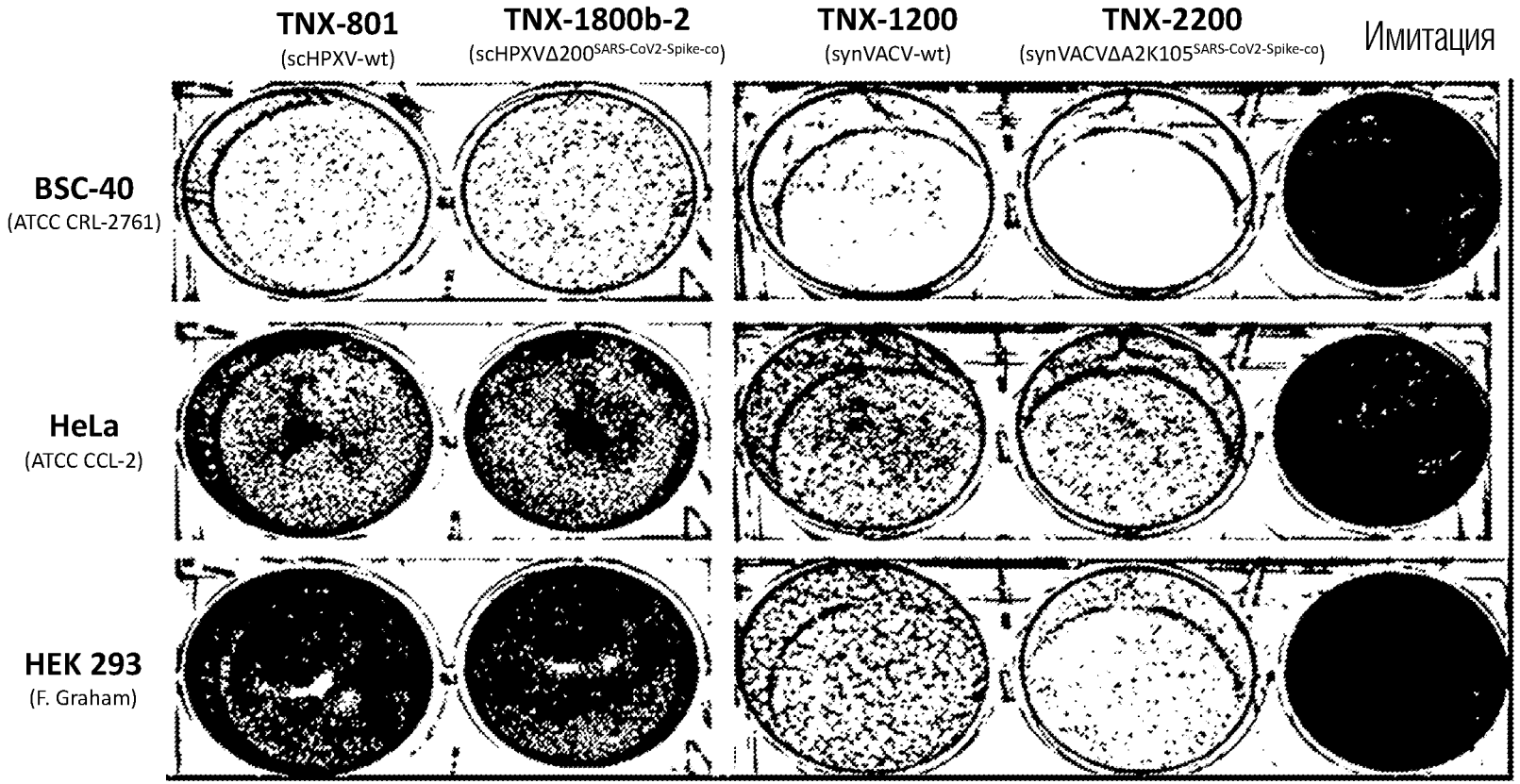
C.

0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 5M 16979
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

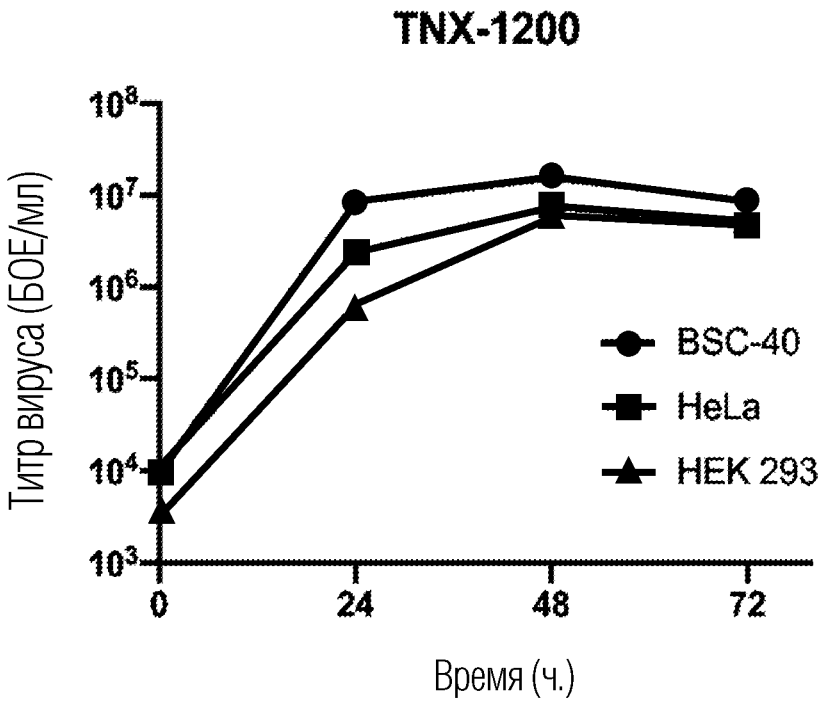
D.


0 1 2 3 4 5 6 7
см
№ исследования: 15881.04
№ животного: 5M 16981
Дата: 15 октября 2020 года
День исследования: 7

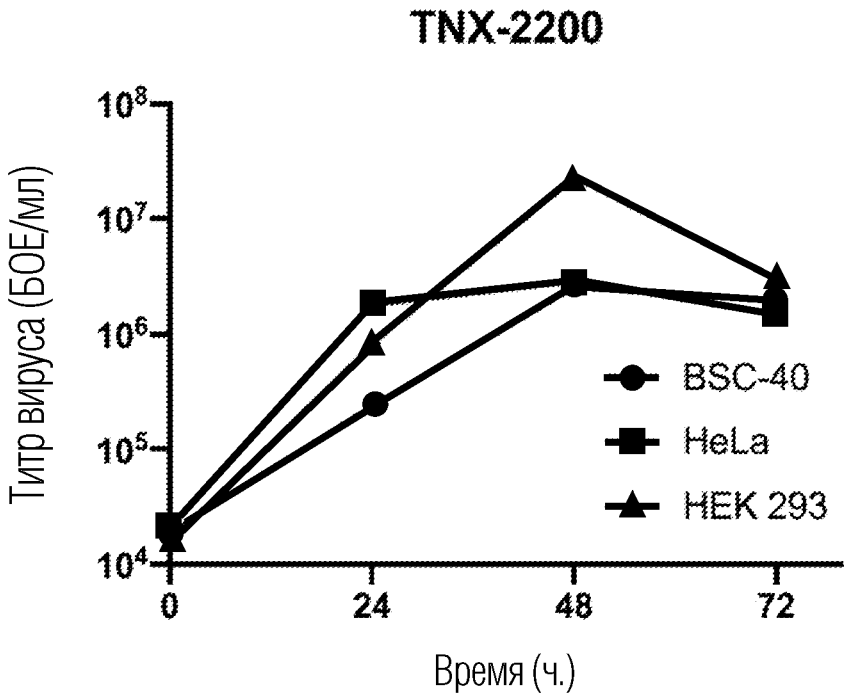
ФИГ. 18


TNX-801
(scHPXV-wt)
TNX-1800b-2
(scHPXVΔ200SARS-CoV2-Spike-co)
TNX-1200
(synVACV-wt)
TNX-2200
(synVACVΔA2K105SARS-CoV2-Spike-co)
Имитация
BSC-40
(ATCC CRL-2761)
HeLa
(ATCC CCL-2)
HEK 293
(F. Graham)

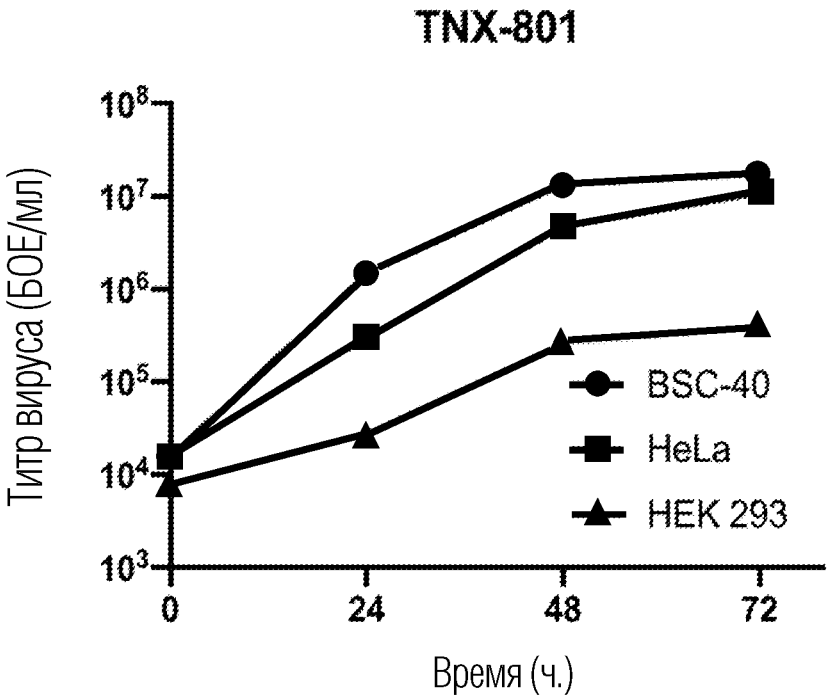
ФИГ. 19А


TNX-1200
Титр вируса (БОЕ/мл)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
24
48
72
Время (ч.)
BSC-40
HeLa
HEK 293

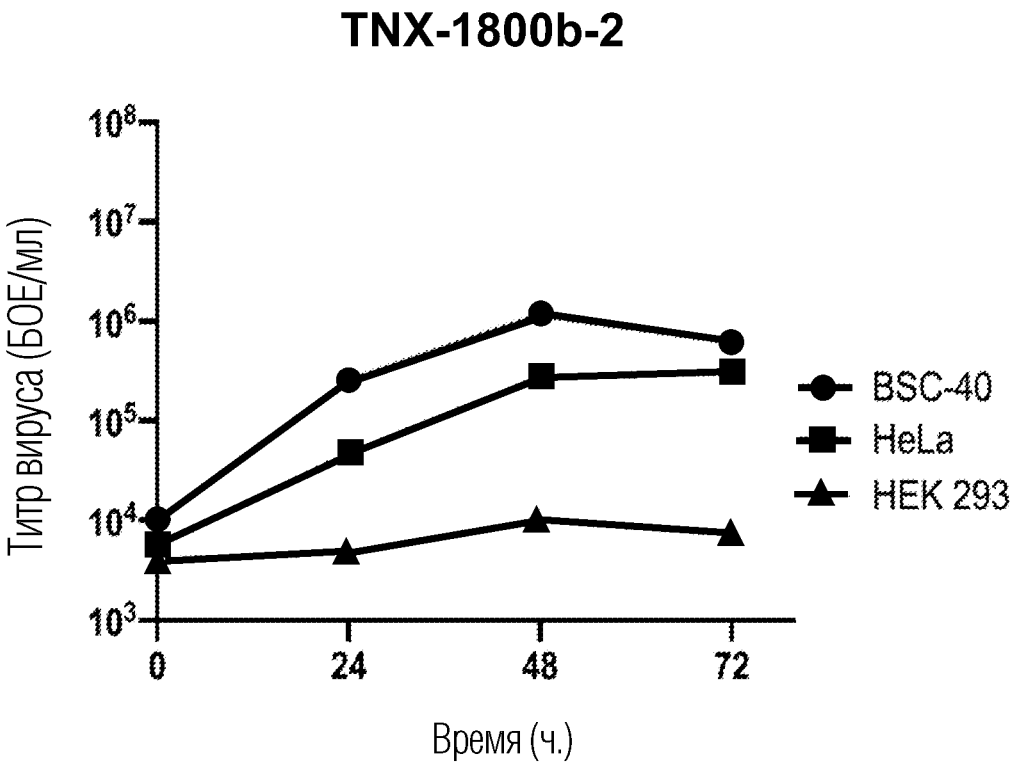
ФИГ. 19B


TNX-2200
Титр вируса (БОЕ/мл)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
0
24
48
72
Время (ч.)
BSC-40
HeLa
HEK 293

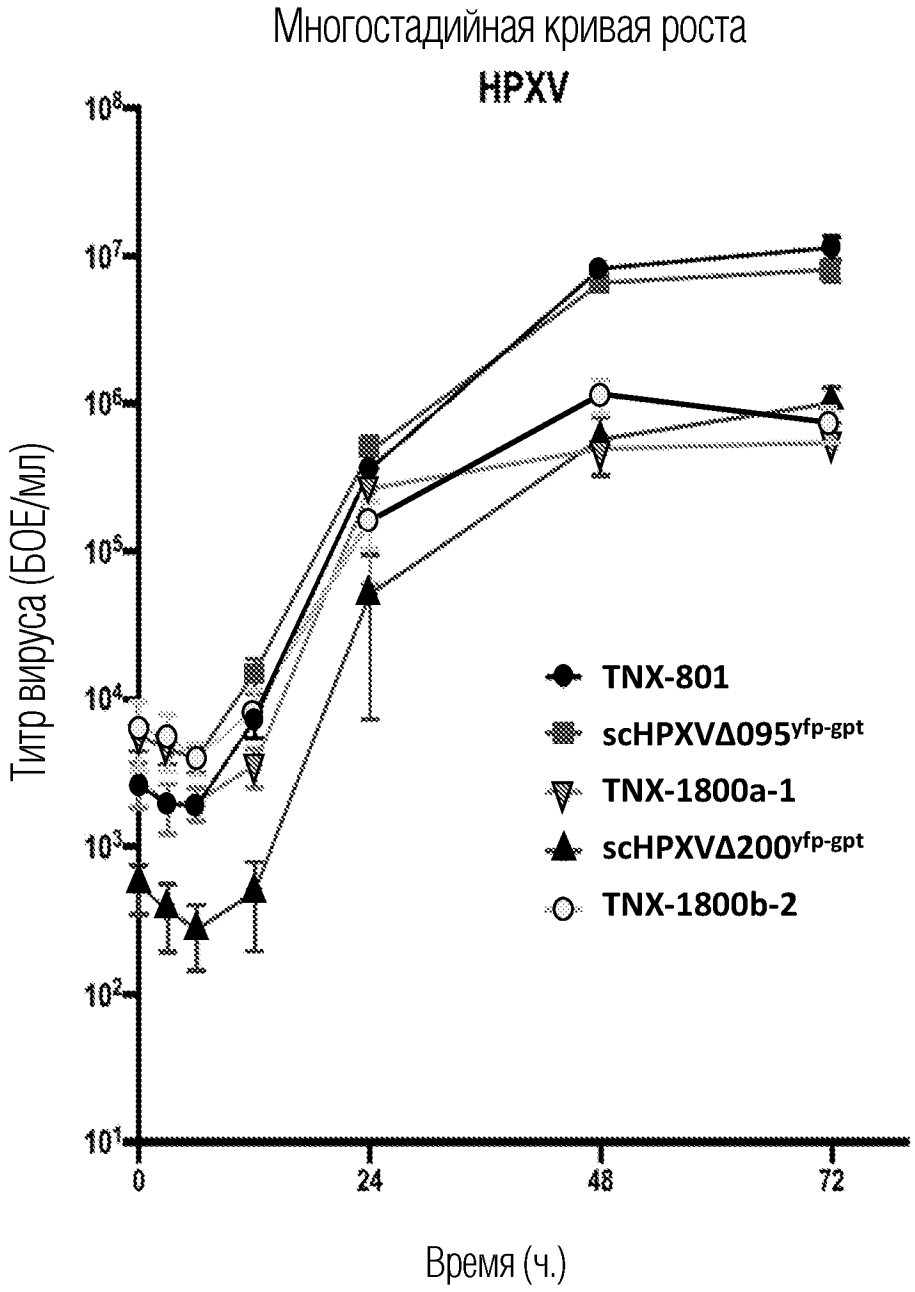
ФИГ. 19C


TNX-801
Титр вируса (БОЕ/мл)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
24
48
72
Время (ч.)
BSC-40
HeLa
HEK 293

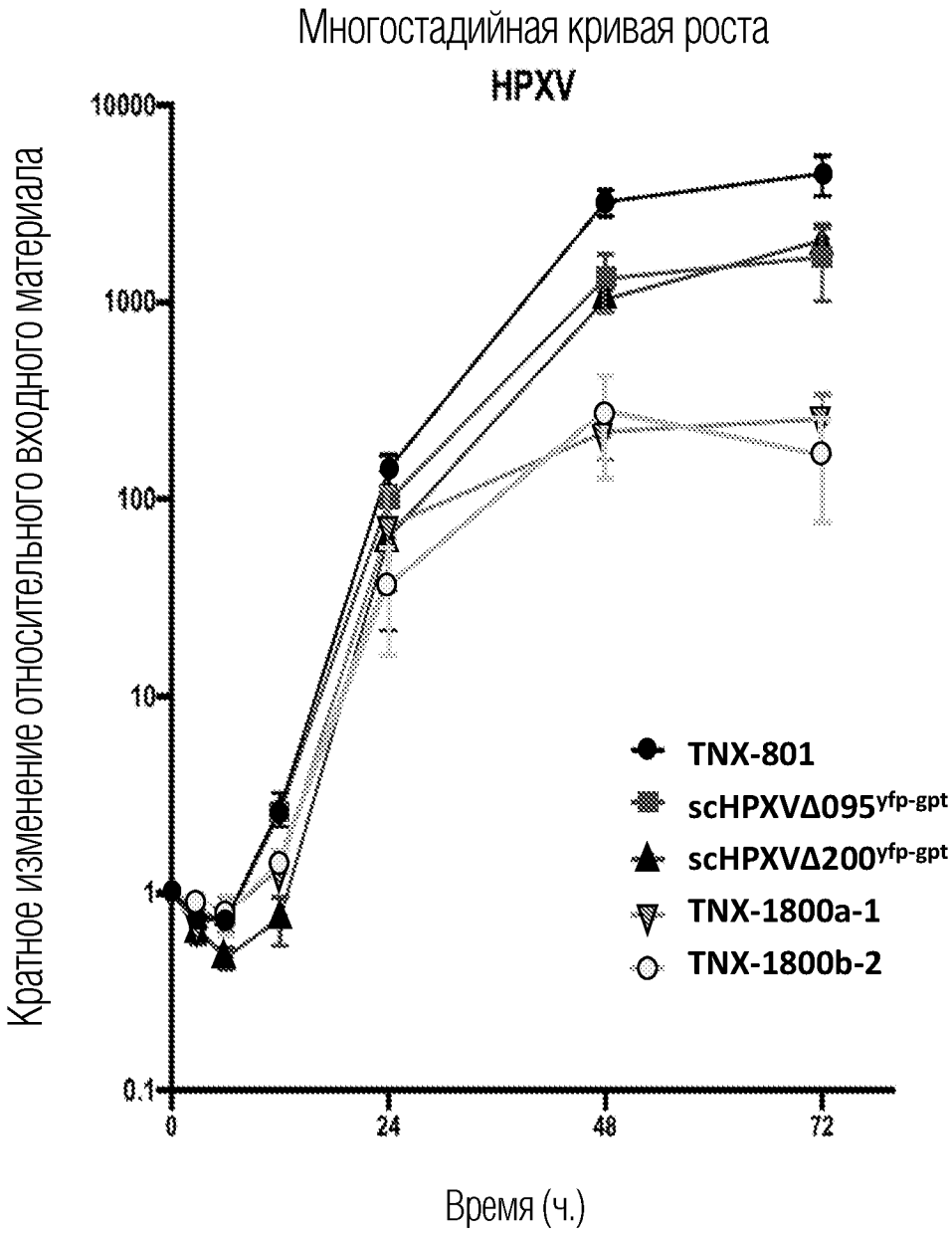
ФИГ. 19D


TNX-1800b-2
Титр вируса (БОЕ/мл)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
24
48
72
Время (ч.)
BSC-40
HeLa
HEK 293

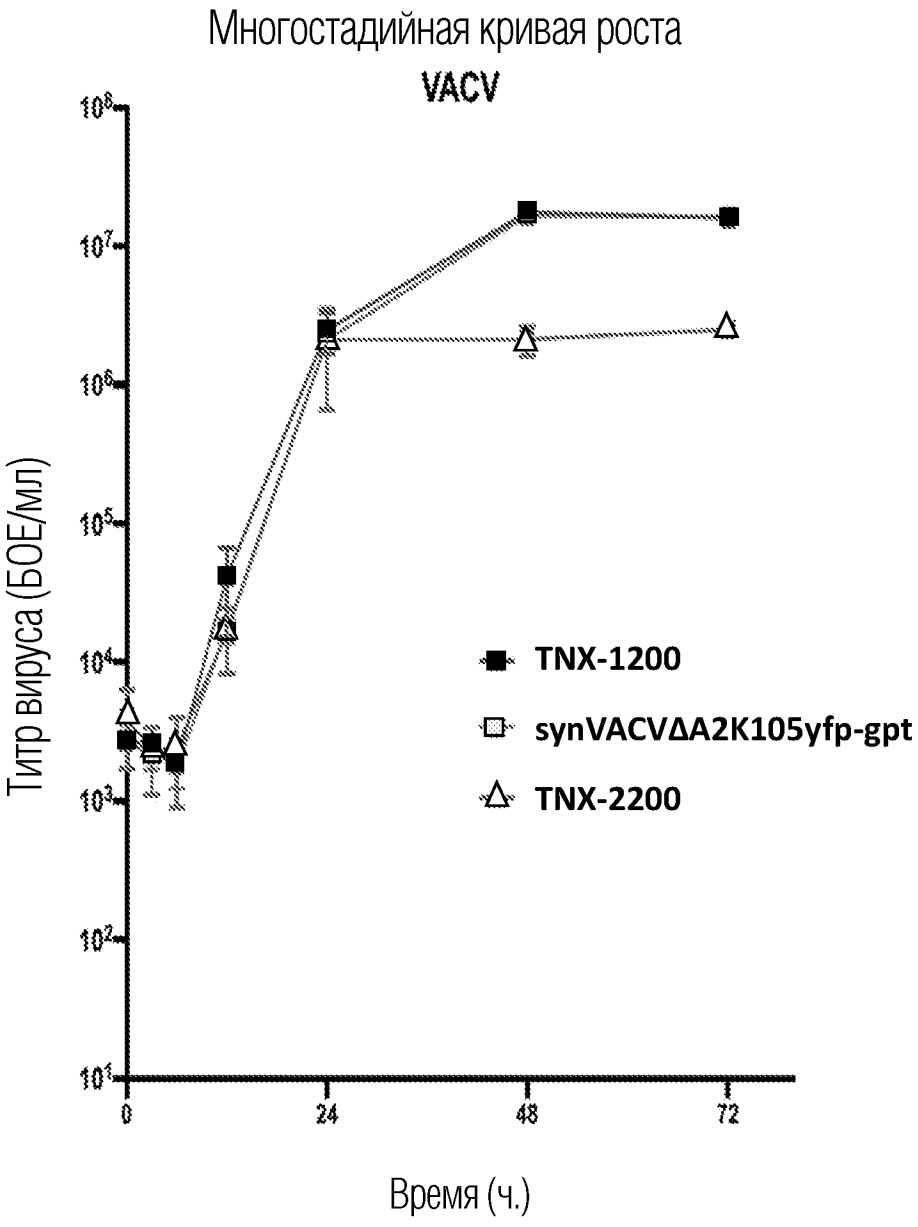
ФИГ. 20А


Многостадийная кривая роста
HPXV
Титр вируса (БОЕ/мл)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
24
48
72
Время (ч.)
TNX-801
scHPXVΔ095yfp-gpt
TNX-1800a-1
scHPXVΔ200yfp-gpt
TNX-1800b-2

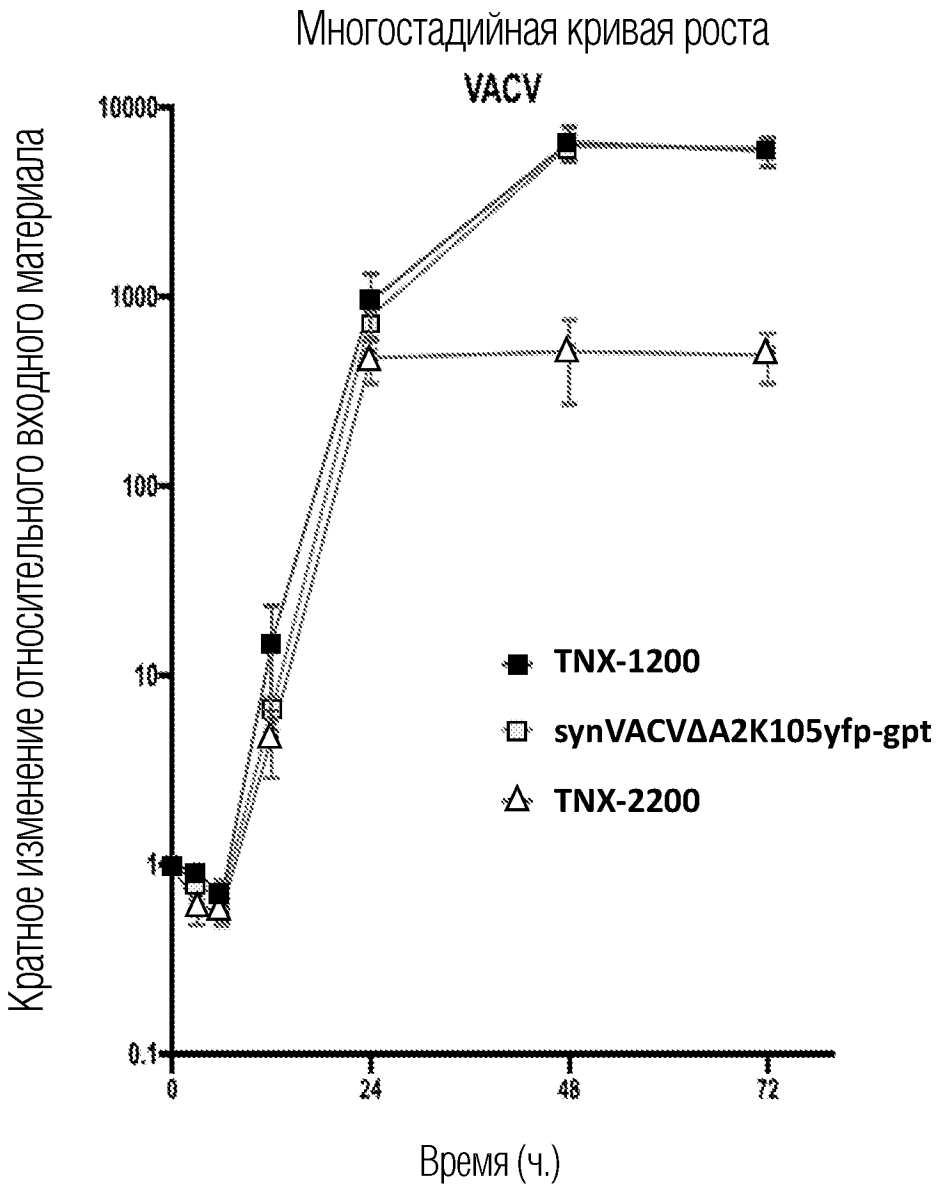
ФИГ. 20B


Многостадийная кривая роста
HPXV
Кратное изменение относительного входного материала
10000
1000
100
10
1
0.1
0
24
48
72
Время (ч.)
TNX-801
scHPXVΔ095yfp-gpt
scHPXVΔ200yfp-gpt
TNX-1800a-1
TNX-1800b-2

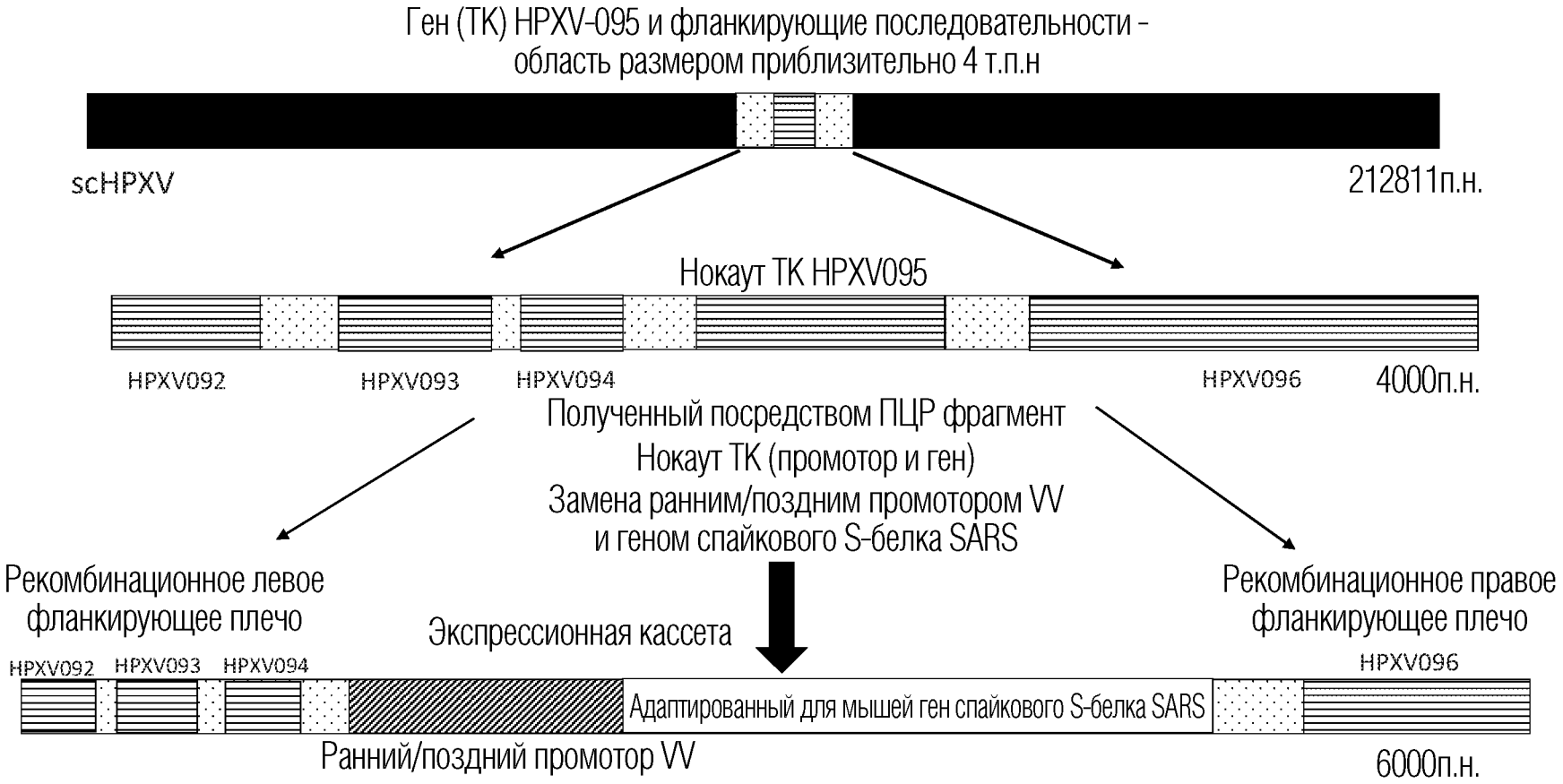
ФИГ. 21А


Многостадийная кривая роста
VACV
Титр вируса (БОЕ/мл)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
0
24
48
72
Время (ч.)
TNX-1200
synVACVΔA2K105yfp-gpt
TNX-2200

ФИГ. 21B


Многостадийная кривая роста
VACV
Кратное изменение относительного входного материала
10000
1000
100
10
1
0.1
0
24
48
72
Время (ч.)
TNX-1200
synVACVΔA2K105yfp-gpt
TNX-2200

ФИГ. 22


Ген (TK) HPXV-095 и фланкирующие последовательности -
область размером приблизительно 4 т.п.н
scHPXV
212811п.н.
Нокаут TK HPXV095
HPXV092
HPXV093
HPXV094
HPXV096
4000п.н.
Полученный посредством ПЦР фрагмент
Нокаут TK (промотор и ген)
Замена ранним/поздним промотором VV
и геном спайкового S-белка SARS
Рекомбинационное левое
фланкирующее плечо
Экспрессионная кассета
Рекомбинационное правое
фланкирующее плечо
HPXV092
HPXV093
HPXV094
HPXV096
Адаптированный для мышей ген спайкового S-белка SARS
Ранний/поздний промотор VV
6000п.н.