

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046179**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.14

(21) Номер заявки
202292428

(22) Дата подачи заявки
2021.02.25

(51) Int. Cl. *A61P 31/14* (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(54) ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/981,451; 62/981,168; 63/004,380; 63/022,032;
63/028,404; 63/033,349; 63/040,865; 63/046,415;
63/056,996; 63/062,762; 63/063,157; 63/114,858;
63/130,593; 63/136,973

(32) 2020.02.25; 2020.02.25; 2020.04.02; 2020.05.08;
2020.05.21; 2020.06.02; 2020.06.18; 2020.06.30;
2020.07.27; 2020.08.07; 2020.08.07; 2020.11.17;
2020.12.24; 2021.01.13

(33) US

(43) 2022.11.25

(86) PCT/US2021/019662

(87) WO 2021/173829 2021.09.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНОВИО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК.; ДЗЕ УИСТАР ИНСТИТЮТ
ОФ ЭНЭТОМИ ЭНД БАЙОЛОДЖИ
(US)**

(72) Изобретатель:
**Янь Цзянь, Бродерик Кейт, Уэйнер
Дэвид, Мутхумани Кар, Пател Ами
(US)**

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

(56) MODJARRAD KAYVON ET AL.: "Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial", THE LANCET INFECTIOUS DISEASES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 19, no. 9, 24 July 2019 (2019-07-24), pages 1013-1022, XP085799269, ISSN: 1473-3099, DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30266-X [retrieved on 2019-07-24], The whole document, in particular, the GLS-5300 vaccine based in pGX0001 vector described in "Procedures"

K. MUTHUMANI ET AL.: "A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 7, no. 301, 19 August 2015 (2015-08-19), pages 301ra132-301ra132, XP055271204, US, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aac7462, The whole document, in particular, fig.1A and results, first section

AIPING WU ET AL.: "Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China", CELL HOST & MICROBE, vol. 27, no. 3, 7 February 2020 (2020-02-07), pages 325-328, XP055724019, NL, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2020.02.001, The whole document, in particular, Figure 2 (SARS nCoV); table S1E

TREVOR R. F. SMITH ET AL.: "Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 11, no. 1, 20 May 2020 (2020-05-20), XP055767550, DOI: 10.1038/S41467-020-16505-0, the whole document

(57) В изобретении раскрыты молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие спайковый антиген коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), спайковые антигены SARS-CoV-2, иммуногенные композиции и вакцины, и их применение для индуцирования иммунных ответов и защиты от инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или ее лечения у субъекта.

046179 B1

046179 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущества по предварительной заявке США № 62/981451, поданной 25 февраля 2020 г.; предварительной заявке США № 63/004380, поданной 2 апреля 2020 г.; предварительной заявке США № 63/028404, поданной 21 мая 2020 г.; предварительной заявке США № 63/033349, поданной 2 июня 2020 г.; предварительной заявке США № 63/040865, поданной 18 июня 2020 г.; предварительной заявке США № 63/046415, поданной 30 июня 2020 г.; предварительной заявке США № 63/062762, поданной 7 августа 2020 г.; предварительной заявке США № 63/114858, поданной 17 ноября 2020 г.; предварительной заявке США № 63/130593 поданной 24 декабря 2020 г.; предварительной заявке США № 63/136973, поданной 13 января 2021 г.; предварительной заявке США № 62/981168, поданной 25 февраля 2020 г.; предварительной заявке США № 63/022032, поданной 8 мая 2020 г.; предварительной заявке США № 63/056996, поданной 27 июля 2020 г.; и предварительной заявке США № 63/063157, поданной 7 августа 2020 г. Содержание каждой из этих заявок включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, представленный в электронном виде в виде текстового файла под названием "104409_000596_SL.txt", созданного 24 февраля 2021 г., размер которого составляет 58410 байт. Перечень последовательностей включен в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к вакцине против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) и способам введения вакцины.

Уровень техники

COVID-19, ранее известный как пневмония или заболевание 2019-nCoV, быстро превратился в глобальную угрозу для общественного здравоохранения, присоединившись к тяжелому острому респираторному синдрому (SARS) и ближневосточному респираторному синдрому (MERS) с растущим числом сопутствующих коронавирусу заболеваний, которые перешли от животных к человеку. Существует насущная потребность в медицинских мерах противодействия, таких как вакцины, для борьбы с распространением таких новых коронавирусов. Существует по меньшей мере семь идентифицированных коронавирусов, которые инфицируют человека, включая MERS-CoV и SARS-CoV.

В декабре 2019 г. город Ухань в Китае стал эпицентром глобальной вспышки нового коронавируса. Этот коронавирус, SARS-CoV-2, был выделен и секвенирован из эпителиальных клеток дыхательных путей инфицированных пациентов (Zhu et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020; Wu, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature. 2020). Симптомы заболевания могут варьироваться от легких гриппоподобных до тяжелых случаев с опасной для жизни пневмонией (Huang et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020). Ситуация в мире динамично развивается, и 30 января 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила COVID-19 чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение (PHEIC).

Краткая суть изобретения

В данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие спайковый антиген SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодируемый спайковый антиген SARS-CoV-2 представляет собой консенсусный антиген. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в нуклеотидах 55-3837 SEQ ID NO: 2; последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 2; последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 2; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2; последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 3; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3; последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 6; или последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6. В данном документе также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие спайковый антиген SARS-CoV-2, при этом спайковый антиген SARS-CoV-2 содержит: аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность,

на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательности, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген SARS-CoV-2, встроена в вирусную частицу.

Кроме того, представлены векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. Молекула нуклеиновой кислоты может быть функционально связана с регуляторным элементом, выбранным из промотора и сигнала полиаденилирования. Вектор экспрессии может представлять собой плазмидный или вирусный вектор.

Раскрыты иммуногенные композиции, содержащие эффективное количество вектора или вирусной частицы. Иммуногенная композиция может содержать фармацевтически приемлемый наполнитель, такой как без ограничения буфер. Буфер может необязательно представлять собой солевой буфер на основе цитрата натрия. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции содержат адъювант.

Также в данном документе представлены спайковые антигены SARS-CoV-2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления спайковый антиген SARS-CoV-2 представляет собой консенсусный антиген. В некоторых вариантах осуществления спайковый антиген SARS-CoV-2 содержит: аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательности, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательности, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4; или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Кроме того, в данном документе представлены вакцины для предупреждения или лечения инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). Вакцины содержат эффективное количество любой одной или комбинации вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот, векторов или антигенов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель. Фармацевтически приемлемый наполнитель может представлять собой буфер, необязательно солевой буфер на основе цитрата натрия. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вакцина дополнительно содержит адъювант.

Кроме того, представлены способы индукции иммунного ответа против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления способы индукции иммунного ответа включают введение субъекту эффективного количества любой одной или комбинации вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот, векторов, иммуногенных композиций, антигенов или вакцин. В данном документе также представлены способы защиты субъекта, нуждающегося в этом, от инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, включающие введение субъекту эффективного количества любой одной или комбинации вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот, векторов, иммуногенных композиций, антигенов или вакцин. Кроме того, представлены способы лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества любой одной или комбинации вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот, векторов, иммуногенных композиций, антигенов или вакцин. В любом из этих способов введение может включать по меньшей мере электропорацию и инъекцию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение включает парентеральное введение, например, внутривенную, внутримышечную или подкожную инъекцию, необязательно с последующей электропорацией. В некоторых вариантах осуществления раскрытых способов субъекту вводят начальную дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты, необязательно начальная доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты. Способы могут дополнительно включать введение субъекту последующей дозы от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты через приблизительно четыре недели после введения начальной дозы, необязательно при этом последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты. В еще одних дополнительных вариантах осуществления способы включают введение субъекту одной или нескольких дополнительных последующих доз от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты через по меньшей мере двенадцать недель после введения начальной дозы, необязательно при этом дополнительная последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты. В любом из этих вариантов осуществления вводят INO-4800 или его биосимиляр.

Также в данном документе представлено применение любой одной или комбинации раскрытых молекул нуклеиновых кислот, векторов, иммуногенных композиций, антигенов или вакцин в способе индукции иммунного ответа против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того представлено применение любой одной или ком-

бинации раскрытых молекул нуклеиновых кислот, векторов, иммуногенных композиций, антигенов или вакцин в способе защиты субъекта от инфекции коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). Также в данном документе представлено применение любой одной или комбинации раскрытых молекул нуклеиновых кислот, векторов, иммуногенных композиций, антигенов или вакцин в способе лечения субъекта, нуждающегося в этом, от инфекции, вызываемой SARS-CoV-2. В соответствии с любым из этих вариантов применения молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, иммуногенную композицию, антиген или вакцину можно вводить субъекту с помощью по меньшей мере одного из электропорации и инъекции. В некоторых вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, иммуногенную композицию, антиген или вакцину вводят субъекту парентерально с последующей электропорацией. В некоторых вариантах осуществления раскрытых вариантов применения субъекту вводят начальную дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты, необязательно начальная доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты. Варианты применения могут дополнительно включать введение субъекту последующей дозы от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты через приблизительно четыре недели после введения начальной дозы, необязательно при этом последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты. В еще одних дополнительных вариантах осуществления варианты применения включают введение субъекту одной или нескольких дополнительных последующих доз от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты через по меньшей мере двенадцать недель после введения начальной дозы, необязательно при этом дополнительная последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты. В любом из этих вариантов осуществления вводят INO-4800 или его биосимиляр.

Кроме того, в данном документе представлены варианты применения любой одной или комбинации раскрытых молекул нуклеиновых кислот, векторов, иммуногенных композиций, антигенов или вакцин в получении лекарственного препарата. В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат предназначен для лечения или защиты от инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат предназначен для лечения или защиты от заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления лекарственный препарат предназначен для лечения или защиты от коронавирусного заболевания 2019 (COVID-19), мультисистемного воспалительного синдрома у взрослых (MIS-A) или мультисистемного воспалительного синдрома у детей (MIS-C).

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу обнаружения устойчивого клеточного иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает стадии: введения иммуногенной композиции для индукции иммунного ответа против антигена SARS-CoV-2 субъекту, нуждающемуся в этом; выделения у субъекта периферических мононуклеарных клеток (PBMC); стимуляцию выделенных PBMC спайковым антигеном, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, указанной в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательность, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4; или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; или их фрагмента, содержащего по меньшей мере 20 аминокислот; обнаружения по меньшей мере одного из числа клеток, экспрессирующих цитокин, и уровня экспрессии цитокина. В одном варианте осуществления стадию обнаружения по меньшей мере одного из числа клеток, экспрессирующих цитокины, и уровня экспрессии цитокинов выполняют с использованием метода иммуноферментных пятен (ELISpot) и анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием проточной цитометрии.

В одном варианте осуществления субъекту вводят иммуногенную композицию, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид, содержащий: аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичный по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 1; аминокислотную последовательности, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательности, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4; или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A, 1B, 1C и 1D иллюстрируются конструкция и экспрессия конструкций синтетической ДНК-вакцины против SARS-CoV-2. На фиг. 1A представлена схематическая диаграмма конструкций синтетической ДНК-вакцины против SARS-CoV-2, rGX9501 (сопоставимой) и rGX9503 (посторонней (OL)), содержащих лидерную последовательность IgE и вставку спайкового белка SARS-CoV-2 ("спайковый антиген Covid-19 или "спайковый OL антиген Covid-19"). На фиг. 1B показаны результаты анализа RT-PCR экстракта РНК из клеток COS-7, трансфицированных в двух повторностях rGX9501 или

pGX9503.

Экстрагированную РНК анализировали с помощью RT-PCR с использованием ПЦР-анализов, разработанных для каждой мишени, и для мРНК β -актина COS-7, используемой в качестве внутреннего гена для нормализации экспрессии. Дельта CT (ACT) рассчитывали как CT мишени за вычетом CT β -актина для каждой концентрации трансфекции и наносили на график в зависимости от логарифма массы трансфицированной pDNA (график представляет собой среднее значение \pm SD). На фиг. 1C показан анализ экспрессии спайкового белка *in vitro* после трансфекции клеток 293T плазмидой pGX9501, pGX9503 или МОСК с помощью вестерн-блоттинга. Лизаты клеток 293T разделяли на геле и зондировали поликлональным антителом к спайковому белку SARS. Блоты удаляли, а затем исследовали с помощью контроля загрузки антитела к β -актину. На фиг. 1D показано иммуофлуоресцентное окрашивание *in vitro* клеток 293T, трансфицированных 3 мкг/лунка pGX9501, pGX9503 или pVax (пустой контрольный вектор). Экспрессию спайкового белка измеряли с помощью поликлонального антитела на основе IgG к спайковому белку SARS и вторичного антитела к IgG. Ядра клеток контрастировали с помощью DAPI. Изображения получали с использованием автоматизированной системы визуализации клеток ImageXpress™ Pico.

На фиг. 2 иллюстрируется скрининг связывания IgG панели антигенов SARS-CoV-2 и SARS-CoV с использованием сыворотки крови мышей, обработанных INO-4800. Мышей BALB/c иммунизировали в день 0 25 мкг INO-4800 или пустым вектором pVAX (контроль), как описано в способах. Белково-антигенное связывание IgG в разведениях сыворотки крови 1:50 и 1:250 у мышей в день 14. Показанные данные представляют собой средние значения OD450 нм (среднее значение+SD) для каждой группы из 4 мышей.

На фиг. 3A, 3B, 3C и 3D продемонстрированы гуморальные ответы на белковый антиген S 1+2 и белок S-рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2 у мышей BALB/c после введения однократной дозы INO-4800. Мышей BALB/c иммунизировали в день 0 указанными дозами INO-4800 или пустого вектора pVAX, как описано в примере 1. Показаны антигенные связывания IgG белка S1+2 SARS-CoV-2 (фиг. 3A) или RBD SARS-CoV-2 (фиг. 3B) в серийных разведениях сыворотки крови у мышей в день 14. Показанные данные представляют собой средние значения OD450 нм (среднее +SD) для каждой группы из 8 мышей (фиг. 3A и 3B) и 5 мышей (фиг. 3C и 3D). Конечные титры связывания IgG сыворотки крови с белком S1+2 SARS-CoV-2 (фиг. 3B) и RBD SARS-CoV-2 (фиг. 3D). Данные представлены на основе 2 независимых экспериментов.

На фиг. 4A и 4B иллюстрируются ответы нейтрализующих антител после иммунизации INO-4800. Мышей BALB/c (n из 5 на группу) дважды иммунизировали в дни 0 и 14 10 мкг INO-4800. Сыворотку крови собирали в день 7 после 2-й иммунизации, и серийные разведения инкубировали с псевдовиром, демонстрирующим спайковый белок SARS-CoV-2, и коинкубировали с клетками ACE2-293T. На фиг. 4A показан ID50 нейтрализации (среднее значение \pm SD) у наивных и иммунизированных INO-4800 мышей. На фиг. 4B показаны относительные единицы люминесценции (RLU) для сыворотки крови наивных мышей и мышей, вакцинированных INO-4800, как описано в способах.

На фиг. 5A и 5B показаны гуморальные ответы на SARS-CoV-2 у морских свинок Hartley после однократного введения INO-4800. Морских свинок Hartley иммунизировали в день 0 100 мкг INO-4800 или пустого вектора pVAX, как описано в примере 1. На фиг. 5A показано связывание IgG с антигеном белка S SARS-CoV-2 в серийных разведениях сыворотки крови в день 0 и 14. Показанные данные представляют собой средние значения OD450 нм (среднее +SD) для 5 морских свинок. На фиг. 5B показаны титры связывания IgG сыворотки крови (среднее значение \pm SD) с белком S SARS-CoV-2 в день 14. P-значения определяли с помощью критерия Манна-Уитни.

На фиг. 6A-6F показано, что сыворотки крови иммунизированных INO-4800 мышей и морских свинок конкурируют с рецептором ACE2 за связывание спайкового белка SARS-CoV-2. На фиг. 6A показано, что растворимый рецептор ACE2 связывается с полноразмерным спайковым белком CoV-2 с EC50, составляющей 0,025 мкг/мл. На фиг. 6B показано, что очищенный IgG сыворотки крови мышей BALB/c (n из 5 на группу) после второй иммунизации INO-4800 приводит к значительной конкуренции за рецептор ACE2. Образцы сыворотки крови IgG от животных анализировали в трех повторностях. На фиг. 6C показано, что IgG, очищенные от n=5 мышей в день 7 после второй иммунизации INO-4800, демонстрируют значительную конкуренцию за рецептор ACE2, связывающийся с белком S1+2 SARS-CoV-2. Концентрация растворимого ACE2 для анализа конкуренции составляет ~0,1 мкг/мл. Столбцы представляют среднее значение и стандартное отклонение AUC. На фиг. 6D показаны морские свинки Hartley, иммунизированные в дни 0 и 14 100 мкг INO-4800 или пустого вектора pVAX, как описано в способах. Сыворотку крови, собранную в день 28 (разведенную 1:20), добавляли в лунки, покрытые SARS-CoV-2, перед добавлением серийных разведений белка ACE2. Измеряли обнаружение связывания ACE2 с белком S SARS-CoV-2. В этом эксперименте использовали сыворотки крови, собранные у 5 животных, обработанных INO-4800, и 3 животных, обработанных pVAX. На фиг. 6E показаны серийные разведения сыворотки крови морских свинок, собранные в день 21, которые добавляли в лунки, покрытые SARS-CoV-2, до добавления белка ACE2. Измеряли обнаружение связывания ACE2 с белком S SARS-CoV-2. В этом эксперименте использовали сыворотку крови, полученную от 4 морских свинок, обработанных INO-4800, и

5 морских свинок, обработанных pVAX. На фиг. 6F показаны IgG, очищенные от n=5 мышей в день 14 после второй иммунизации INO-4800, демонстрирующие конкуренцию за связывание с рецептором ACE2 со спайковым белком SARS-CoV-2 по сравнению с объединенными IgG интактных мышей. Наивных мышей исследовали в одной колонке. Вакцинированных мышей исследовали в двух повторностях. Если планки погрешностей не видны, то погрешность меньше, чем точка данных.

На фиг. 7A-7D показано обнаружение антител, реагирующих с белком S SARS-CoV-2, в BAL иммунизированных INO-4800 животных. Мышей BALB/c (n из 5 на группу) иммунизировали в дни 0 и 14 INO-4800 или pVAX, а BAL собирали в день 21 (фиг. 7A и 7B). Морских свинок Hartley (n из 5 на группу) иммунизировали в дни 0, 14 и 21 с помощью INO-4800 или pVAX и BAL, собранных в день 42 (фиг. 7C и 7D). Жидкость бронхоальвеолярного лаважа анализировали в двух повторностях в отношении наличия антител на основе IgG, специфических к спайковому белку SARS-CoV-2, с помощью ELISA. Данные представлены в виде конечных титров (фиг. 7A и 7C) и кривых разбавления BAL с первичными значениями OD 450 нм (фиг. 7B и 7D). На фиг. 7A и 7C столбцы представляют среднее значение для каждой группы, а столбцы погрешностей представляют собой стандартное отклонение. $**p < 0,01$ по U-критерию Манна-Уитни.

На фиг. 8A-8C показана индукция Т-клеточных ответов у мышей BALB/c после введения INO-4800. Мышей BALB/c (n=5/группа) иммунизировали 2,5 или 10 мкг INO-4800. Т-клеточные ответы анализировали у животных в дни 4, 7, 10 (фиг. 8A и 8B) и в день 14 (фиг. 8C). Т-клеточные ответы измеряли с помощью ELISpot IFN- γ в спленоцитах, стимулированных в течение 20 часов перекрывающимися пулами пептидов, охватывающими спайковые белки SARS-CoV-2 (фиг. 8A), SARS-CoV (фиг. 8B) или MERS-CoV (фиг. 8C). Столбцы представляют среднее значение +SD.

На фиг. 9 и 10 иллюстрируются клеточные и гуморальные иммунные ответы, измеренные у новозеландских белых (NZW) кроликов, обработанных INO-4800. Внутрикожная доставка pDNA в день 0 и 28. PBMC в ELISpot IFN- γ (фиг. 9); ELISA связывания IgG сыворотки кожи (фиг. 10).

На фиг. 11A-11E показаны гуморальные иммунные ответы на спайковый белок SARS-CoV-2, измеренные у макак-резус, обработанных INO-4800. Внутрикожная доставка pDNA в день 0 и 28. ELISA связывания IgG сыворотки крови.

На фиг. 12A-12G показаны гуморальные иммунные ответы на спайковый белок SARS и MERS, измеренные у макак-резус, обработанных INO-4800. Внутрикожная доставка pDNA в день 0 и 28. ELISA связывания IgG сыворотки крови. (фиг. 12A-12G; левая панель, 1 мг INO-4800; правая панель, 2 мг INO-4800).

На фиг. 13A-13C иллюстрируются клеточные иммунные ответы, измеренные с помощью ELISpot IFN- γ в PBMC у макак-резус, обработанных INO-4800, после внутрикожного введения pDNA в дни 0 и 28. Результаты показаны на фиг. 13A (спайковые пептиды SARS CoV-2); 13B (спайковые пептиды SARS CoV); и 13C (спайковые пептиды MERS CoV).

На фиг. 14A и 14B показано картирование Т-клеточного эпитопа после введения INO-4800 мышам BALB/c. Спленоциты стимулировали в течение 20 часов с помощью картирующих пулов матричных пептидов SARS-CoV-2. На фиг. 14A показаны Т-клеточные ответы после стимуляции картирующими пулами матричных пептидов SARS-CoV-2. Столбцы представляют среднее значение +SD для 5 мышей. На фиг. 14B показана карта спайкового белка SARS-CoV-2 и идентификация иммунодоминантных пептидов у мышей BALB/c. Для сравнения включен известный иммунодоминантный эпитоп HLA-A2 SARS-CoV. На фиг. 14B показаны SEQ ID NO: 26-35 соответственно, в порядке появления.

На фиг. 15A-15H показаны гуморальные корреляты защиты в области глотки и носовой полости. (фиг. 15A-15D). Корреляция Log10 копий cDNA вирусной нагрузки в глотке мл-1 в день 1 (фиг. 15A, 15B) и день 3 (фиг. 15C, 15D) после стимуляции SARS-CoV-2 с титрами микронеutralизации (фиг. 15A, 15C) и конечными титрами связывания RBD IgG (фиг. 15B, 15D). Фиг. 15E-15H. Тот же анализ для вирусной нагрузки в носовой полости. P- и R-значения предоставлены для двустороннего непараметрического анализа ранговой корреляции Спирмена. Контрольные животные - красные заштрихованные кружки, INO-4800 X1 - зеленые заштрихованные кружки и INO-4800 X2 - синие заштрихованные кружки.

На фиг. 16 иллюстрируется блок-схема исследования фазы I.

На фиг. 17A, 17B, 17C и 17D иллюстрируется гуморальный ответ антител в фазе I клинического исследования. Гуморальный ответ в группе с введением дозы 1,0 мг и группе с введением дозы 2,0 мг оценивали по способности нейтрализовать живой вирус (n=18, 1,0 мг; n=19, 2,0 мг) (фиг. 17A); связыванию с областями RBD (фиг. 17B); и связыванию с цельного спайковым белком (S1 и S2) (фиг. 17C). Конечные титры рассчитывали в виде титра, демонстрирующего OD 3,0 SD выше исходного уровня, титры на исходном уровне принимали за 1. На фиг. 17D гуморальный ответ в группе с введением дозы 1,0 мг и группе с введением дозы 2,0 мг оценивали в отношении способности связывать цельный спайковый белок (S1 и S2) (n=19, 1,0 мг; n=19, 2,0 мг). Конечные титры рассчитывали в виде титра, демонстрирующего OD 3,0 SD выше исходного уровня, титры на исходном уровне принимали за 1. Реакцией на нейтрализацию живого вируса была IC50 PRNT \geq 10. На всех графиках горизонтальные линии представляют медиану, а столбцы представляют межквартильный диапазон.

На фиг. 18A-18G иллюстрируются результаты анализа клеточного иммунного ответа фазы I клинического исследования. PBMC, выделенные от вакцинированных лиц, стимулировали *in vitro* спайковым антигеном SARS-CoV-2. Количество клеток, способных секретировать IFN-гамма, измеряли в стандартном анализе ELISpot для группы с введением дозы 1,0 мг и группы с введением дозы 2,0 мг (фиг. 18A). Горизонтальные линии представляют медианы, а столбцы представляют межквартильные диапазоны. Как показано на фиг. 18B, пептиды, охватывающие весь спайковый антиген, разделяли на пулы и тестировали по отдельности в ELISpot, при этом пулы сопоставляли с конкретными областями антигена. Показаны три субъекта, иллюстрирующие разнообразие ответов пула и ассоциированную с ним величину по субъектам. Круговая диаграмма представляет разнообразие всей группы с введением дозы 2,0 мг. Как иллюстрируется на фиг. 18C, продуцирование цитокинов, специфичных для спайкового белка SARS-CoV-2, измеряли из CD4+ и CD8+ Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Столбцы представляют средний ответ. Продуцирование цитокинов дополнительно представлено на фиг. 18D с использованием CCR7 и CD45RA с помощью статуса дифференцировки центральной памяти (CM), эффекторной памяти (EM) или эффектора (E) с данными, показывающими, какой процент общего цитокинового ответа исходит от какой дифференцированной группы. Круговые диаграммы, представляющие полифункциональность CD4+ и CD8+ Т-клеток для каждой когорты доз, представлены на фиг. 18E. Продуцирование IL-4 CD4+ Т-клетками для каждой когорты доз показана на фиг. 18F. Горизонтальные линии представляют средний ответ. Графики представляют всех подлежащих оценке субъектов. Статистический анализ проводили для всех парных совокупностей данных. Те из них, которые были значимыми, отмечены на фигуре, отсутствие обозначений на фигуре означает отсутствие статистической значимости. На фиг. 18G представлена тепловая карта каждого субъекта в группе с введением дозы 2,0 мг и процент ее ответа в ELISpot, относящийся к каждому пулу, охватывающему спайковый антиген SARS-CoV-2.

На фиг. 19 иллюстрируются связанные с фазой I системные и местные нежелательные явления по степени тяжести: легкой (степень 1), средней (степень 2), тяжелой (степень 3) и опасной для жизни (степень 4).

На фиг. 20 представлены дополнительные данные для гуморального иммунного ответа. Три образца от выздоравливающих субъектов (все 3 с симптомами, но не госпитализированные), протестированные с помощью анализа ELISpot, показали более низкие Т-клеточные ответы со средним значением 33, чем группа с введением дозы 2,0 мг на неделю 8.

На фиг. 21 представлены дополнительные данные метода иммуноферментных пятен (ELISpot).

На фиг. 22A-22F показаны гуморальные и клеточные ответы у макак-резус, вакцинированных INO-4800. Схема исследования (фиг. 22A). Спайк-специфические IgG (фиг. 22B), RBD (фиг. 22C) и нейтрализующие живой вирус антитела (фиг. 22D) измеряли в сыворотке крови макак-резус, получавших 1 или 2 дозы INO-4800 или не вакцинированных (контроль). Линии представляют средние геометрические. Клеточные иммунные ответы у макак-резус, вакцинированных INO-4800. Секретция специфического для SARS-CoV-2 гамма-интерферона (IFN γ) из PBMC измеряли у макак-резус, которые получили 1 или 2 дозы INO-4800 или не были вакцинированы (контроль), до (фиг. 22E) и после стимуляции (фиг. 22F). PBMC стимулировали 5 отдельными пептидными пулами, охватывающими спайковый белок, и частоты SFU измеряли в ответ на суммирование каждого пула. Линии представляют средние значения.

На фиг. 23A-23C иллюстрируется изменение веса, температуры и гемоглобина у животных на протяжении исследования. Животные получали одну (INO-4800X1) или две (INO-4800X2) дозы INO-4800 или не были вакцинированы (контроль). Процентное изменение веса тела (фиг. 23A), температуры (фиг. 23B) и содержания гемоглобина (фиг. 23C) у отдельных животных регистрировали и наносили на график в указанные временные точки до и после стимуляции. Линии представляют среднее значение (фиг. 23A) и среднее геометрическое значение (фиг. 23B и 23C) для каждой группы.

На фиг. 24A-24F иллюстрируются вирусные нагрузки верхних дыхательных путей, обнаруженные с помощью RT-qPCR после стимуляции SARS-CoV-2. Животные получали одну (INO-4800X1) или две (INO-4800X2) дозы INO-4800 или не были вакцинированы (контроль). Вирусная нагрузка представлена в виде Log₁₀ cDNA копий/мл для каждого животного в мазках из гортани (фиг. 24A-24C) мазки из носовой полости (фиг. 24D-24F). Фиг. 24A и 24D. Линии представляют групповые средние геометрические значения с 95% CI. Площадь под кривой (AUC) вирусной нагрузки для мазков из глотки (фиг. 24B) и мазков из носовой полости (фиг. 24E) для каждой экспериментальной группы. Пиковые вирусные нагрузки, измеренные у каждого животного в период стимуляции для мазков из глотки (фиг. 24C) и мазков из носовой полости (фиг. 24F). LLOQ (нижний предел количественного обнаружения, 3,80 log копий/мл) и LLOD (нижний предел обнаружения, 3,47 log копий/мл). Положительным образцам, обнаруженным ниже LLOQ, присваивали значение 3,80 log копий/мл. * $p \leq 0,05$ с t-критерием Манна-Уитни.

На фиг. 25A-25F иллюстрируются субгеномные вирусные нагрузки верхних дыхательных путей, обнаруженные с помощью RT-qPCR после стимуляции SARS-CoV-2. Животные получали одну (INO-4800X1) или две (INO-4800X2) дозы INO-4800 или не были вакцинированы (контроль). Вирусная нагрузка представлена в виде Log₁₀ cDNA копий/мл для каждого животного в мазках из гортани (фиг. 25A-25C) мазки из носовой полости (фиг. 25D-25F). Фиг. 25A и 25D. Линии представляют групповые средние

геометрические значения с 95% CI. Площадь под кривой (AUC) вирусной нагрузки для мазков из глотки (фиг. 25B) и мазков из носовой полости (фиг. 25E) для каждой экспериментальной группы. Пиковые вирусные нагрузки, измеренные у каждого животного в период стимуляции для мазков из глотки (фиг. 25C) и мазков из носовой полости (фиг. 25F). LLOQ (4,11 log копий/мл) и LLOD (3,06 log копий/мл). Положительным образцам, обнаруженным при ниже LLOQ, присваивали значение 3,81 log копий/мл.

На фиг. 26A-26D иллюстрируются вирусные нагрузки нижних дыхательных путей, обнаруженные с помощью RT-qPCR после стимуляции SARS-CoV-2. Животные получали одну (INO-4800X1) или две (INO-4800X1) дозы INO-4800 или не были вакцинированы (контроль). Геномную и субгеномную вирусную нагрузку SARS-CoV-2 измеряли у отдельных животных в бронхоальвеолярном лаваже (BAL (фиг. 26A и 26B)) и легочной ткани (фиг. 26C и 26D). Образцы, собранные при вскрытии (6-8 дней после контрольной стимуляции). Столбцы представляют групповые медианные значения. Анализ LLOQ и LLOD представлены в разделе "Методы".

На фиг. 27 иллюстрируется вирусная РНК в тканях животных после стимуляции. Животные получали одну (INO-4800X1) или две (INO-4800X2) дозы INO-4800 или не были вакцинированы (контроль). Вирусную нагрузку SARS-CoV-2 измеряли у отдельных животных в образцах тканей, собранных при вскрытии (6-8 DPC). Столбцы представляют групповое медианное значение с 95% CI. Положительным образцам тканей, обнаруженным ниже предела количественного определения (LoQ) 4,76 log копий/мл, присваивали значение 5 копий/мкл, что соответствует 4,46 log копий/г, в то время как необнаруженным образцам присваивали значение <2,3 копий/мкл, что эквивалентно нижнему пределу обнаружения анализа (LoD), который равен 4,76 log копий/г.

На фиг. 28 показана репрезентативная гистопатология (окраска H и E) и присутствие вирусной РНК SARS-CoV-2 (окраска в ISH RNAScore) у животных, вакцинированных 1 дозой (вверху), 2 дозами (посередине) или невакцинированных (внизу). У животных, вакцинированных 1 дозой, наблюдали многоочаговую альвеолярную и интерстициальную пневмонию от минимальной до легкой степени тяжести (*) с более тяжелой степенью тяжести у животного 10A. Остальные животные из группы 1 имеют минимальные/слабые воспалительные инфильтраты (*). Также наблюдали умеренную периваскулярную инфильтрацию (указатели), а вирусная РНК была обнаружена с помощью ISH в очагах поражения (стрелки), в значительных количествах у животного 10A и в небольших количествах у животных 30A, 24A, 21A и 38A (стрелки). У животных, вакцинированных 2 дозами, наблюдали мультифокальную альвеолярную и интерстициальную пневмонию от минимальной до легкой степени тяжести (*) вместе с минимальной периваскулярной инфильтрацией (указатели). Небольшие количества вирусной РНК наблюдали с помощью ISH в очагах животных 9A, 45A, 33 A и 13 A (стрелки). У невакцинированных животных наблюдали умеренную многоочаговую альвеолярную и интерстициальную пневмонию (*) с наличием большого количества вирусной РНК в очагах от всех животных (стрелки).

На фиг. 29A-29G показан груз заболевания легких, измеренный с помощью гистопатологии и СТ после стимуляции SARS-CoV-2. Общий гистопатологический индекс (фиг. 29A) и анализ изображений площади, положительно окрашенной в меченых срезах в ISH RNAScore, в отношении вирусной РНК (фиг. 29B). На фиг. 29C представлена тепловая карта, иллюстрирующая оценку гистопатологии для каждого параметра для отдельных животных. Общий индекс СТ (фиг. 29E). Радиологические показатели СТ для отдельных животных (фиг. 29D-29G). Фиг. 29D: степень аномалии в процентах от пораженного легкого. Фиг. 29E. Паттерн заболевания COVID с оценкой, основанной на наличии узелков, помутнения по типу матового стекла и консолидации. Фиг. 29F. Зональная классификация (легкое разделено на 12 зон, и каждой зоне с аномалиями присваивается 1 балл). Фиг. 29G: общий кумулятивный индекс СТ (баллы паттерна+зоны). Линия на графиках представляет медианное значение группы. * $p \leq 0,05$ с t-критерием Манна-Уитни.

На фиг. 30 иллюстрируется репрезентативный пример легочных аномалий, идентифицированных на изображениях, созданных на основе СТ. На изображениях представлены животные, не получившие вакцинацию (контроль): 8A [A], 25A [B], 28A [C], 14A [D], 50A [E]; животные, получившие одну дозу вакцины INO-4800: 10A [F], 21A [G], 38A [H]; животные, получившие две дозы вакцины INO-4800: 21A [I], 33A [J]. Стрелки указывают области помутнения по типу матового стекла и области консолидации. Изображения, полученные от макак, которые не имели аномальных особенностей, не показаны.

На Фиг. 31A-31F представлены изображения ELISpot спленоцитов мыши IFN- γ после стимуляции антигенами SARS-CoV-2 и SARS. Мышей иммунизировали в день 0 и собирали спленоциты в указанные временные точки. IFN- γ -секретирующие клетки в селезенках иммунизированных животных подсчитывали с помощью анализа ELISpot. Репрезентативные изображения показывают специфичные для SARS-CoV-2 (фиг. 31A-31C) и специфичные для SARS-CoV (фиг. 31D-31F) пятнообразующие единицы IFN- γ в популяции спленоцитов в дни 4, 7 и 10 после иммунизации. Изображения получали с помощью ридера ImmunoSpot CTL. На фиг. 32A и фиг. 32B показан проточный цитометрический анализ популяций Т-клеток, продуцирующих IFN- γ при стимуляции белком S SARS-CoV-2. Спленоциты, собранные у мышей BALB/c и C57BL/6 через 14 дней после обработки pVAX или INO-4800, превращали в суспензии отдельных клеток. Клетки стимулировали в течение 6 часов пулами перекрывающихся пептидов SARS-CoV-2.

Фиг. 32А: Стратегия гейтирования CD4+ и CD8+ Т-клеток; синглеты отбирали (i), затем лимфоциты (ii), а затем живые CD45+ клетки (iii). Следующие CD3+ клетки гейтировали (iv) и из этой популяции гейтировали CD4+ (v) и CD8+ (vi) Т-клетки. Клетки IFN γ + гейтировали из каждой из популяций CD4+ (vii) и CD8+ (viii) Т-клеток. Фиг. 32В: показан процент CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN γ . Столбцы представляют среднее значение \pm SD. В этом исследовании использовали 4 мышей BALB/c и 4 мышей C57BL/6. * $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни.

На фиг. 33А-33Н показаны гуморальные и клеточные иммунные ответы у макак-резус. Фиг. 33А: план исследования, показывающий схему вакцинации и сроки взятия крови. Фиг. 33В: схема спайкового белка SARS-CoV-2. Фиг. 33С: S1+S2 ECD, S1, RBD и S2 SARS-CoV-2 белок-связывающий антиген IgG в серийно разведенных сыворотках NHP, собранных на неделе 0, 2, 6, 12 и 15. Данные представляют средние конечные титры для каждого отдельного NHP. D и E: анализ псевдонейтрализации с использованием сыворотки NHP, показывающий наличие специфических к SARS-CoV-2 нейтрализующих антител к вариантам D614 (фиг. 33D) и G614 (фиг. 33E) SARS-CoV-2. Фиг. 33F и фиг. 33G: сыворотка крови, собранная на неделе 6 от вакцинированных INO-4800 NHP, ингибировала связывание ACE2. Фиг. 33F: анализ конкуренции ACE2 на основе планшета. Фиг. 33G: анализ ингибирования ACE2 на основе потока, показывающий ингибирование связывания ACE2 в серийно разведенных сыворотках NHP. Фиг. 33Н: Т-клеточные ответы измеряли с помощью IFN- γ ELISpot в PBMC, собранных на неделях 0, 2, 6 и 15, и стимулировали в течение 20 ч с помощью перекрывающихся пулов пептидов, охватывающих спайковый белок SARS-CoV-2. Столбцы представляют среднее значение \pm SD.

На фиг. 34 показана перекрестная реактивность IgG сыворотки крови к спайковому белку SARS-CoV и MERS-CoV. Связывание IgG измеряли в сыворотке крови вакцинированных INO-4800 макак-резус с белковым антигеном S1 SARS-CoV и S1 MERS-CoV.

На фиг. 35 показаны IgG бронхоальвеолярного лаважа (BAL), реагирующие на антигены белка S SARS-CoV-2. Образцы BAL, взятые у вакцинированных животных, оценивали в отношении связывания IgG, реагирующего с SARS-CoV-2, с полноразмерным спайковым белком SARS-CoV-2 и доменом RBD.

На фиг. 36А и фиг. 36В представлены иллюстративные экспериментальные данные, демонстрирующие перекрестную реактивность клеточного ответа в отношении спайкового белка SARS-CoV и MERS-CoV. Ответы PBMC анализировали с помощью ELISpot IFN γ после стимуляции перекрывающимися пулами пептидов, охватывающими спайковый белок SARS-CoV-1 (фиг. 36А) и спайковый белок MERS-CoV (фиг. 36В). Столбцы представляют среднее значение \pm SD.

На фиг. 37А-37С показаны иллюстративные эксперименты, демонстрирующие восстановление гуморальных иммунных ответов после стимуляции вирусом. Фиг. 37А: план исследования. Фиг. 37В: ELISA связывания IgG. S1+S2 SARS-CoV-2 и RBD SARS-CoV-2 белок-связывающий антиген IgG в разведенной сыворотке крови NHP, собранной до стимуляции, во время стимуляции и после стимуляции. Фиг. 37С: анализ псевдонейтрализации с использованием сыворотки крови NHP, показывающий наличие специфических к SARS-CoV-2 нейтрализующих антител к против вариантам D614 и G614 SARS-CoV-2 до и после стимуляции вирусом у вакцинированных INO-4800 (верхние панели) и интактных животных (нижние панели).

На фиг. 38 представлены иллюстративные эксперименты, демонстрирующие восстановление клеточных иммунных ответов после стимуляции вирусом. Т-клеточные ответы анализировали с помощью IFN γ ELISpot в PBMC, стимулированных перекрывающимися пулами пептидов, охватывающими спайковый белок SARS-CoV-2. Столбцы представляют среднее значение \pm SD. Т-клеточные ответы, анализируемые с помощью ELISpot IFN γ в PBMC, выделенных до и после стимуляции вирусом SARS-CoV-2. Левая панель - наивные животные, правая панель - вакцинированные INO-4800 животные.

На Фиг. 39 представлены иллюстративные эксперименты, демонстрирующие восстановление клеточных иммунных ответов после стимуляции вирусом у отдельных макак-резус. Клеточные ответы анализировали до и после стимуляции вирусом с помощью ELISpot IFN γ в PBMC, стимулированных перекрывающимися пептидными пулами, охватывающими спайковый белок SARS-CoV-2. Правая панель - наивные животные, левая панель - вакцинированные INO-4800 животные.

На фиг. 40А-40F показаны вирусные нагрузки в жидкости BAL и мазках из носовой полости после стимуляции вирусом. На неделе 17 наивных и иммунизированных INO-4800 (5 в группе) макак-резус стимулировали интраназальным и интратрахеальным введением $1,1 \times 10^4$ PFU SARS-CoV-2 (изолят US-WA1). Фиг. 40А и фиг. 40D: Log sgмRNA копий/мл в BAL (фиг. 40А) и NS копий/мазок (фиг. 40D) измеряли в нескольких временных точках после стимуляции у наивных (левые панели) и вакцинированных INO-4800 (правые панели) животных. Фиг. 40А и фиг. 40Е: пиковые вирусные нагрузки (между днями 1 и 7) в BAL (фиг. 40В) и NS (фиг. 40Е) после стимуляции. Фиг. 40С и фиг. 40F: вирусная РНК в BAL и NS в день 7 после стимуляции. Синие и красные линии отражают среднюю вирусную нагрузку. Приведены Р-значения критерия Манна-Уитни (фиг. 40В и 40С).

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. В случае конфликта данный документ, в том числе определения, будет иметь преимущественную силу. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, несмотря на то, что способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, могут быть использованы при практическом применении или проверке данного изобретения. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными и не предусматривают ограничительного характера.

Предполагается, что термин "содержащий" включает примеры, охватываемые терминами "состоящий по сути из" и "состоящий из"; аналогичным образом, термин "состоящий по сути из" предназначен для включения примеров, охватываемых термином "состоящий из". Настоящее изобретение также содержит другие варианты осуществления, "содержащие", "состоящие из" или "состоящие по сути из" вариантов осуществления или элементов, присутствующих в данном документе, изложенных или не изложенных явным образом.

Следует понимать, что определенные свойства раскрытых материалов и методов, которые для наглядности описаны в данном документе в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предусмотрены в комбинации в одном варианте осуществления. С другой стороны, различные свойства раскрытых материалов и методов, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подкомбинации.

Формы существительного единственного числа включают формы множественного числа, если контекст четко не определяет иное.

Термин "приблизительно" при использовании в отношении диапазонов числовых значений, граничных значений или конкретных значений используется для указания того, что перечисленные значения могут варьировать вплоть до 10% от указанного значения. Таким образом, термин "приблизительно" используется для включения вариаций $\pm 10\%$ или менее, вариаций $\pm 5\%$ или менее, вариаций $\pm 1\%$ или менее, вариаций $\pm 0,5\%$ или менее или вариаций $\pm 0,1\%$ или менее от определенного значения. Когда значения выражаются как приближения с использованием предшествующего "приблизительно", следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант осуществления. Отсылка на определенное числовое значение включает в себя по меньшей мере это конкретное значение, если из контекста явно не следует иное.

Термин "адъювант", используемый в данном документе, означает любую молекулу, добавленную к вакцине, описанной в данном документе, в целях усиления иммуногенности антигена.

Термин "антитело", используемый в данном документе, означает антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или их фрагменты или производные, в том числе Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела, диатела, биспецифические антитела, бифункциональные антитела и их производные. Антитело может представлять собой антитело, выделенное из образца сыворотки млекопитающего, поликлональное антитело, аффинно очищенное антитело или их смеси, которые проявляют достаточную специфичность связывания с необходимым эпитопом или последовательностью, происходящей из него.

Термин "биосимиляр" (утвержденного эталонного продукта/биологического препарата, т.е. препарата, включенного в перечень эталонных препаратов) относится к биологическому продукту, который очень похож на эталонный продукт, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах при отсутствии клинически значимых различий между биосимиляром и эталонным продуктом с точки зрения безопасности, чистоты и активности на основе данных, полученных в результате (a) аналитических исследований, которые демонстрируют, что биологический продукт очень похож на эталонный продукт, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах; (b) исследований на животных (включая оценку токсичности); и/или (c) клинического исследования или исследований (включая оценку иммуногенности и фармакокинетики или фармакодинамики), достаточных для демонстрации безопасности, чистоты и активности в одном или нескольких подходящих условиях применения, для которых эталонный продукт лицензирован и предназначен для применения и для которых запрашивается лицензия на биосимиляр. Биосимиляр может представлять собой взаимозаменяемый продукт, который можно заменить эталонным продуктом в аптеке без вмешательства лечащего врача. Чтобы соответствовать дополнительному стандарту "взаимозаменяемости", ожидается, что биосимиляр будет давать такой же клинический результат, как и эталонный продукт, у любого конкретного пациента, и, если биосимиляр вводится пациенту более одного раза, риск с точки зрения безопасности или снижение эффективности чередования или переключения между использованием биосимиляра и эталонного продукта не превышает риск применения эталонного продукта без такого чередования или переключения. Биосимиляр использует те же механизмы действия для предложенных условий применения, насколько механизмы известны для эталонного продукта. Условие или условия применения, предписан-

ные, рекомендованные или предложенные в маркировке, предложенной для биосимиляра, были ранее одобрены для эталонного продукта. Путь введения, лекарственная форма и/или эффективность биосимиляра являются такими же, как и у эталонного продукта, а биосимиляр производится, перерабатывается, упаковывается или хранится в учреждении, которое соответствует стандартам, предназначенным для обеспечения непрерывности действия биосимиляра для того, чтобы быть безопасным, чистым и активным. Биосимиляр может включать незначительные модификации аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным продуктом, такие как N- или C-концевые усечения, которые, как ожидается, не изменят эффективность биосимиляра.

Термин "кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота", используемый в данном документе, означает нуклеиновые кислоты (молекулу РНК или ДНК), которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодированная последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, в том числе промотором и сигналом полиаденилирования, способным направлять экспрессию в клетках индивидуума или млекопитающего, которым вводят нуклеиновую кислоту.

Термин "комплемент" или "комплементарный", используемый в данном документе, означает спаривание оснований по Уотсону-Крику (например, А-Т/У и С-Г) или спаривание оснований по Хугстону между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот.

Термин "консенсус" или "консенсусная последовательность", используемый в данном документе, может означать синтетическую последовательность нуклеиновой кислоты или соответствующую полипептидную последовательность, сконструированную на основе анализа выравнивания многочисленных подтипов определенного антигена. Последовательность может быть использована для индуцирования широкого спектра иммунитета против многочисленных подтипов, серотипов или штаммов определенного антигена. Синтетические антигены, такие как слитые белки, могут быть использованы для получения консенсусных последовательностей (или консенсусных антигенов).

Термин "электропорация", "электропермеабилитация" или "электрокинетическое усиление" ("EP"), используемый в данном документе взаимозаменяемо, означает использование трансмембранного импульса электрического поля в целях индуцирования микроскопических путей (пор) в биомембране; их присутствие способствует тому, что биомолекулы, такие как плазмиды, олигонуклеотиды, siRNA, лекарственные средства, ионы и вода, проходят с одной стороны клеточной мембраны на другую.

Термин "фрагмент", используемый в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты или ее часть, которая кодирует полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего. Фрагменты могут представлять собой фрагменты ДНК, выбранные по меньшей мере из одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют белковые фрагменты, изложенные ниже.

Термин "фрагмент" или "иммуногенный фрагмент" по отношению к полипептидным последовательностям означает полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который перекрестно реагирует с полноразмерным антигеном SARS-CoV-2 штамма дикого типа. Фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% консенсусного белка. В некоторых вариантах осуществления фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 20 аминокислот или более, по меньшей мере 30 аминокислот или более, по меньшей мере 40 аминокислот или более, по меньшей мере 50 аминокислот или более, по меньшей мере 60 аминокислот или более, по меньшей мере 70 аминокислот или более, по меньшей мере 80 аминокислот или более, по меньшей мере 90 аминокислот или более, по меньшей мере 100 аминокислот или более, по меньшей мере 110 аминокислот или более, по меньшей мере 120 аминокислот или более, по меньшей мере 130 аминокислот или более, по меньшей мере 140 аминокислот или более, по меньшей мере 150 аминокислот или более, по меньшей мере 160 аминокислот или более, по меньшей мере 170 аминокислот или более, по меньшей мере 180 аминокислот или более, по меньшей мере 190 аминокислот или более, по меньшей мере 200 аминокислот или более, по меньшей мере 210 аминокислот или более, по меньшей мере 220 аминокислот или более, по меньшей мере 230 аминокислот или более или по меньшей мере 240 аминокислот или более консенсусного белка.

Используемый в данном документе термин "генетическая конструкция" относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодированная последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, в том числе промотором и сигналом полиаденилирования, способным направлять экспрессию в клетках индивидуума, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. Используемый в данном документе термин "экспрессируемая форма" относится к генным конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок таким образом, что при присутствии в клетке индивидуума кодирующая последовательность будет экспрессироваться.

Термин "идентичный" или "идентичность", используемый в данном документе в контексте двух или

более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, означает, что последовательности имеют определенный процент остатков, которые являются одинаковыми в определенном участке. Этот процент может быть рассчитан с помощью оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей в определенном участке, определения числа положений, в которых встречается идентичный остаток в обеих последовательностях с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в определенном участке и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательности. В случаях, если две последовательности имеют различную длину или выравнивание приводит к образованию одного или нескольких ступенчатых концов, а определенный участок сравнения содержит только одну последовательности, остатки одной последовательности включают в знаменатель, но не в числитель расчета. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентичность можно определять вручную или с помощью компьютерного алгоритма для работы с последовательностями, такого как BLAST или BLAST 2.0.

Термин "иммунный ответ", используемый в данном документе, означает активацию иммунной системы хозяина, например, такую млекопитающего, в ответ на введение антигена. Иммунный ответ может быть в форме клеточного или гуморального ответа, или обоих.

Термин "нуклеиновая кислота" или "олигонуклеотид" или "полиинуклеотид" или "молекула нуклеиновой кислоты", используемый в данном документе, означает по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанные друг с другом. Изображение одной нити также определяет последовательность комплементарной нити. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает в себя комплементарную нить изображенной одной нити. Многие варианты нуклеиновой кислоты могут быть использованы с той же самой целью, что и определенная нуклеиновая кислота. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает в себя по сути идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементы. Одна нить обеспечивает зонд, который может гибридизироваться с целевой последовательностью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает в себя зонд, который гибридизируется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть однонитевыми или двунитевыми, или могут содержать участки как двунитевой, так и однонитевой последовательности. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, как геномную, так и cDNA, РНК или гибрид, в котором нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезокси- и рибонуклеотидов, и комбинации оснований, в том числе урацила, аденина, тимина, цитозина, гуанина, инозина, ксантина, гипоксантина, изоцитозина и изогуанина. Нуклеиновые кислоты могут быть получены с помощью методов химического синтеза или с помощью рекомбинантных методов. Термин "функционально связанный", используемый в данном документе, означает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может быть расположен в направлении 5' (выше) или 3' (ниже) от гена, находящегося под его контролем. Расстояние между промотором и геном может быть примерно таким же самым, что и расстояние между промотором и геном, который он контролирует, в гене, из которого промотор происходит. Как известно в данной области техники, вариация этого расстояния может быть согласована без потери функции промотора.

Термин "пептид", "белок" или "полипептид", используемый в данном документе, может означать связанную последовательность аминокислот и может быть природной, синтетической или модификацией или комбинацией природной и синтетической.

Термин "промотор", используемый в данном документе, означает синтетическую или природную молекулу, которая способна обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или несколько конкретных транскрипционных регуляторных последовательностей в целях дополнительного усиления экспрессии и/или изменения пространственной и/или временной экспрессии того же самого. Промотор может также содержать дистальные энхансерные или супрессорные элементы, которые могут быть расположены на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Промотор может быть получен из источников, в том числе, вирусов, бактерий, грибов, растений, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно или дифференциально по отношению к клетке, ткани или органу, в котором происходит экспрессия или по отношению к стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние раздражители, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие средства. Иллюстративные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, промотор lac-оперона, tac-промотор, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR и промотор CMV IE.

Термин "сигнальный пептид" и "лидерная последовательность" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть связана с аминоконцом белка SARS-CoV-2, изложенного в данном документе. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности в типичном случае направляют локализацию белка. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности, используемые в данном документе, предпочтительно облегчают секрецию белка из клетки, в которой он был продуцирован. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от оставшейся части белка, часто называемой зрелым белком, при секреции из клетки. Сиг-

нальные пептиды/лидерные последовательности связаны на N-конце белка.

Термин "субъект", используемый в данном документе, может означать млекопитающее, которое желает или нуждается в иммунизации описанной в данном документе иммуногенной композицией или вакциной. Млекопитающее может представлять собой человека, шимпанзе, морскую свинку, собаку, кошку, лошадь, корову, мышь, кролика или крысу.

Термин "по сути идентичный" может означать, что первая и вторая аминокислотные последовательности идентичны на меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в участке из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более аминокислот. Термин "по сути идентичный" может также означать, что первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты идентичны на меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в участке из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более нуклеотидов.

Термин "лечение" или "лечебный", используемый в данном документе, может означать защиту животного от заболевания посредством предупреждения, подавления, сдерживания или полного устранения заболевания. Предупреждение заболевания включает введение животному иммуногенной композиции или вакцины по настоящему изобретению до начала заболевания. Подавление заболевания включает в себя введение иммуногенной композиции или вакцины по настоящему изобретению животному после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Сдерживание заболевания включает в себя введение иммуногенной композиции или вакцины по настоящему изобретению животному после клинического проявления заболевания.

Как используется в данном документе, если не указано иное, термин "клинически доказанный" (используемый независимо или для модификации терминов "безопасный" и/или "эффективный") должен означать, что это было доказано клиническим испытанием, при этом клиническое испытание удовлетворяло требованиям стандартов одобрения Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, ЕМА или соответствующего национального регулирующего органа. Например, доказательство может быть предоставлено в ходе клинического (клинических) испытания (испытаний), описанного (описанных) в примерах, представленных в данном документе.

Термин "клинически доказанная безопасность", поскольку он относится к дозе, режиму дозирования, лечению или способу с использованием антигена SARS-CoV-2 (например, спайкового антигена SARS-CoV-2, вводимого в виде рGX9501 или INO-4800 или его биосимилляра) относится к благоприятному соотношению риск:польза с приемлемой частотой и/или приемлемой тяжестью нежелательных явлений, возникающих при лечении (обозначаемых АЕ или ТЕАЕ) по сравнению со стандартным лечением или с другим компаратором. Побочное явление представляет собой неблагоприятное медицинское явление у пациента, которому вводили лекарственный препарат. Одним из показателей безопасности является частота нежелательных явлений (АЕ) согласно Национального института рака (NCI), классифицированная в соответствии с Общими критериями токсичности для нежелательных явлений CTCAE v4.03.

Термины "клинически доказанная эффективность" и "клинически доказанный эффективный", используемые в данном документе в контексте дозы, схемы дозирования, лечения или способа, относятся к эффективности конкретной дозы, дозировки или схемы лечения. Эффективность можно измерить, основываясь на изменении течения заболевания в ответ на средство по настоящему изобретению. Например, антиген SARS-CoV-2 (например, спайковый антиген SARS-CoV-2, вводимый в виде рGX9501 или INO-4800, или его биосимилляра) вводят пациенту в количестве и на время, достаточные для индукции улучшения, предпочтительно устойчивого улучшения, по меньшей мере по одному показателю, отражающему тяжесть заболевания, которое подлежит лечению. Различные показатели, отражающие степень болезни, заболевания или состояния субъекта, могут быть оценены для определения того, достаточны ли количество и время лечения. Такие индикаторы включают, например, клинически признанные индикаторы тяжести заболевания, симптомов или проявлений рассматриваемого нарушения. Степень улучшения обычно определяется врачом, который может сделать это определение на основе признаков, симптомов, результатов биопсии или других анализов, а также может использовать опросники, которые задают субъекту, такие как опросники качества жизни, разработанные для данного заболевания. Например, антиген SARS-CoV-2 (например, спайковый антиген SARS-CoV-2, вводимый в виде рGX9501 или INO-4800, или его биосимилляра) можно вводить для достижения улучшения состояния пациента, связанного с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2. Об улучшении может свидетельствовать улучшение индекса активности заболевания, улучшение клинических симптомов или любой другой показатель активности заболевания.

Термин "вариант", используемый в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, означает (i) участок или фрагмент упомянутой нуклеотидной последовательности; (ii) комплемент упомянутой нуклеотидной последовательности или ее участка; (iii) нуклеиновую кислоту, которая по сути идентична упомянутой нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизируется в жестких условиях с упомянутой нуклеиновой кислотой, ее комплементом или последователь-

ностями, по сути идентичными им.

Вариант может быть дополнительно определен как пептид или полипептид, который отличается аминокислотной последовательностью в результате вставки, делеции или замены аминокислот, однако сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Иллюстративные примеры "биологической активности" включают способность быть связанным специфическим антителом или активировать иммунный ответ. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по сути идентична упомянутому белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативная замена аминокислоты, т.е., замещение аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных участков) признается в данной области техники как в типичном случае включающая незначительное изменение. Эти незначительные изменения могут быть выявлены, отчасти, в результате рассмотрения индекса гидропатичности аминокислот, как понимается в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислоты основан на ее гидрофобности и заряде. В данной области техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности могут быть замещены и при этом сохраняют функцию белка. В одном аспекте замещают аминокислоты, имеющие индексы гидропатичности ± 2 . Гидрофильность аминокислот также может быть использована для обнаружения замен, которые приводили ли бы к образованию белков, сохраняющих биологическую функцию. Учет гидрофильности аминокислот в контексте пептида способствует расчету наибольшей локальной средней гидрофильности этого пептида, полезной величины, которая, как отмечалось, высоко коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Замена аминокислот, имеющих аналогичные коэффициенты гидрофильности, может приводить к образованию пептидов, сохраняющих биологическую активность, например, иммуногенность, как понимается в данной области техники. Замены можно осуществлять с использованием аминокислот, имеющих коэффициенты гидрофильности в пределах ± 2 друг от друга. Как индекс гидропатичности, так и коэффициент гидрофильности аминокислот находятся под влиянием конкретной боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением, подразумевается, что аминокислотные замены, которые соответствуют биологической функции, зависят от относительного сходства аминокислот, и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, как определяется по гидрофобности, гидрофильности, заряду и другим свойствам.

Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая по сути идентична полной длине последовательности всего гена или его фрагмента. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть идентичная на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% полной длине последовательности гена или его фрагмента. Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, которая по сути идентична полной длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента. Аминокислотная последовательность может быть идентичная на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% полной длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

Термин "вектор", используемый в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой вирусный вектор, бактериофаг, искусственную хромосому бактерий или искусственную хромосому дрожжевых грибов. Вектор может представлять собой ДНК-вектор или РНК-вектор. Вектор может представлять собой самореплицирующийся внехромосомный вектор, и предпочтительно представляет собой плазмиду ДНК.

Для перечисления числовых диапазонов в данном документе каждое промежуточное число между ними с такой же самой степенью точности подразумевается явным образом. Например, в случае диапазона 6-9, числа 7 и 8 подразумеваются в добавление к 6 и 9, а для диапазоне 6,0-7,0, числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0 подразумеваются явным образом.

Молекулы нуклеиновых кислот, антигены и иммуногенные композиции.

В данном документе представлены иммуногенные композиции, такие как вакцины, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. В данном документе также представлены иммуногенные композиции, такие как вакцины, содержащие антиген SARS-CoV-2, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Иммуногенные композиции можно использовать для защиты и лечения любого количества штаммов SARS-CoV-2, за счет чего происходит лечение, предупреждение и/или защита от патологий, вызываемых SARS-CoV-2. Иммуногенные композиции могут значительно индуцировать иммунный ответ у субъекта, которому вводили иммуногенные композиции, за счет чего происходит защита и лечение инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

Иммуногенная композиция может представлять собой ДНК-вакцину, пептидную вакцину или комбинацию ДНК- и пептидной вакцины. ДНК-вакцина может включать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, cDNA, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Молекула нуклеиновой кислоты также может содержать дополнительные последовательности, кодирующие линкерные, лидерные или тэговые после-

довательности, которые связаны с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген SARS-CoV-2, посредством пептидной связи. Пептидная вакцина может содержать антигенный пептид SARS-CoV-2, антигенный белок SARS-CoV-2, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Комбинация ДНК и пептидной вакцина может включать описанную выше молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2 и антигенный пептид или белок SARS-CoV-2, в которой антигенный пептид или белок SARS-CoV-2 и кодируемый SARS-CoV-2 антиген имеют одинаковую аминокислотную последовательность.

Раскрытые иммуногенные композиции могут вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, нацеленный на антиген SARS-CoV-2 у субъекта, которому вводили иммуногенную композицию. Раскрытые иммуногенные композиции могут индуцировать нейтрализующие антитела и антитела на основе иммуноглобулина G (IgG), которые вступают в реакцию со спайковым антигеном SARS-CoV-2. Иммуногенная композиция также может вызывать CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточные ответы, которые реагируют на антиген SARS-CoV-2 и приводят к продуцированию гамма-интерферон (IFN- γ), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерлейкин-2 (IL-2).

Иммуногенная композиция может индуцировать гуморальный иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию. Индуцированный гуморальный иммунный ответ может быть специфическим в отношении антигена SARS-CoV-2. Индуцированный гуморальный иммунный ответ может реагировать на антиген SARS-CoV-2. Гуморальный иммунный ответ может быть индуцирован у субъекта, которому вводят вакцину, от приблизительно более 1,5 раз до приблизительно более 16 раз, от приблизительно более 2 раз до приблизительно более 12 раз или от приблизительно более 3 раз до приблизительно более 10 раз. Гуморальный иммунный ответ может быть индуцирован у субъекта, которому вводят вакцину, по меньшей мере в приблизительно более 1,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 2,0 раза, по меньшей мере в приблизительно более 2,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 3,0 раза, по меньшей мере в приблизительно более 3,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 4,0 раза, по меньшей мере в приблизительно более 4,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 5,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 5,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 6,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 6,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 7,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 7,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 8,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 8,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 9,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 9,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 10,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 10,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 11,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 11,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 12,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 12,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 13,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 13,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 14,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 14,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 15,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 15,5 раз или по меньшей мере в приблизительно более 16,0 раз.

Гуморальный иммунный ответ, индуцированный иммуногенной композицией, может включать в себя повышенный уровень нейтрализующих антител, ассоциированных с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию. Нейтрализующие антитела могут быть специфическими в отношении антигена SARS-CoV-2. Нейтрализующие антитела могут реагировать на антиген SARS-CoV-2. Нейтрализующие антитела могут обеспечивать защиту от и/или лечение инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, и ассоциированных с ней патологий у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию.

Гуморальный иммунный ответ, индуцированный иммуногенной композицией, может включать в себя повышенный уровень антител на основе IgG, ассоциированных с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию. Эти антитела на основе IgG могут быть специфическими в отношении антигена SARS-CoV-2. Эти антитела на основе IgG могут реагировать на антиген SARS-CoV-2. Уровень антитела IgG, ассоциированного с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, может быть повышен, от приблизительно 1,5 раза до приблизительно 16 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 12 раз или от приблизительно 3 раз до приблизительно 10 раз по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию. Уровень антитела IgG, ассоциированного с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, может быть повышен по меньшей мере в приблизительно более 1,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 2,0 раза, по меньшей мере в приблизительно более 2,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 3,0 раза, по меньшей мере в приблизительно более 3,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 4,0 раза, по меньшей мере в приблизительно более 4,5 раза, по меньшей мере в приблизительно более 5,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 5,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 6,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 6,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 7,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 7,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 8,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 8,5 раз, по меньшей мере в приблизительно более 9,0 раз, по меньшей мере в приблизительно более 9,5 раз, по меньшей мере в приблизи-

CD3+CD8+ Т-клеток, которые продуцируют как IFN- γ , так и TNF- α . Частота CD3+CD8+IFN- γ +TNF- α + Т-клеток, ассоциированных с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, может быть повышена по меньшей мере в приблизительно 25 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз, 55 раз, 60 раз, 65 раз, 70 раз, 75 раз, 80 раз, 85 раз, 90 раз, 95 раз, 100 раз, 10 раз, 120 раз, 130 раз, 140 раз, 150 раз, 160 раз, 170 раз или 180 раз по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию.

Клеточный иммунный ответ, индуцированный иммуногенной композицией, может включать в себя активацию CD4+ Т-клеточного ответа. Вызванный CD4+ Т-клеточный ответ может реагировать на антиген SARS-CoV-2. Вызванный CD4+ Т-клеточный ответ может быть полифункциональным. Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать в себя активацию CD4+ Т-клеточного ответа, при котором CD4+ Т-клетки продуцируют IFN- γ , TNF- α , IL-2 или комбинацию IFN- γ и TNF- α .

Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать в себя повышенную частоту CD3+CD4+ Т-клеток, которые продуцируют IFN- γ . Частота CD3+CD4+IFN- γ + Т-клеток, ассоциированных с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, может быть повышена по меньшей мере в приблизительно 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз, 14 раз, 15 раз, 16 раз, 17 раз, 18 раз, 19 раз или 20 раз по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию.

Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать в себя повышенную частоту CD3+CD4+ Т-клеток, которые продуцируют TNF- α . Частота CD3+CD4+TNF- α + Т-клеток, ассоциированных с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, может быть повышена по меньшей мере в приблизительно 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз, 14 раз, 15 раз, 16 раз, 17 раз, 18 раз, 19 раз, 20 раз, 21 раз или 22 раз по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию.

Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать в себя повышенную частоту CD3+CD4+ Т-клеток, которые продуцируют IL-2. Частота CD3+CD4+IL-2+ Т-клеток, ассоциированных с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, может быть повышена по меньшей мере в приблизительно 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз, 14 раз, 15 раз, 16 раз, 17 раз, 18 раз, 19 раз, 20 раз, 21 раз, 22 раза, 23 раза, 24 раза, 25 раз, 26 раз, 27 раз, 28 раз, 29 раз, 30 раз, 31 раз, 32 раза, 33 раза, 34 раза, 35 раз, 36 раз, 37 раз, 38 раз, 39 раз, 40 раз, 45 раз, 50 раз, 55 раз или 60 раз по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию.

Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать в себя повышенную частоту CD3+CD4+ Т-клеток, которые продуцируют как IFN- γ , так и TNF- α . Частота CD3+CD4+IFN- γ +TNF- α + Т-клеток, ассоциированных с субъектом, которому вводят иммуногенную композицию, может быть повышена по меньшей мере в приблизительно 2 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 3,5 раза, 4,0 раза, 4,5 раза, 5,0 раз, 5,5 раз, 6,0 раз, 6,5 раз, 7,0 раз, 7,5 раз, 8,0 раз, 8,5 раз, 9,0 раз, 9,5 раз, 10,0 раз, 10,5 раз, 11,0 раз, 11,5 раз, 12,0 раз, 12,5 раз, 13,0 раз, 13,5 раз, 14,0 раз, 14,5 раз, 15,0 раз, 15,5 раз, 16,0 раз, 16,5 раз, 17,0 раз, 17,5 раз, 18,0 раз, 18,5 раз, 19,0 раз, 19,5 раз, 20,0 раз, 21 раз, 22 раза, 23 раза, 24 раза, 25 раз, 26 раз, 27 раз, 28 раз, 29 раз, 30 раз, 31 раз, 32 раза, 33 раза, 34 раза или 35 раза по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию.

Иммуногенная композиция по данному изобретению может иметь свойства, предъявляемые к эффективным иммуногенным композициям, например, быть безопасной для того, чтобы сама иммуногенная композиция не вызывала заболевание или смерть; иметь защитный характер от заболевания, возникающего в результате воздействия живых патогенов, таких как вирусы или бактерии; индуцировать образование нейтрализующих антител для предупреждения инвазии клеток; индуцировать защитные Т-клетки против внутриклеточных патогенов; и обеспечивать легкость введения, незначительные побочные эффекты, биологическую стабильность и низкократность на дозу.

Иммуногенная композиция может дополнительно индуцировать иммунный ответ при введении в различные ткани, такие как мышца или кожа. Иммуногенная композиция может дополнительно индуцировать иммунный ответ при парентеральном введении, например, путем подкожной, внутрикожной или внутримышечной инъекции, необязательно с последующей электропорацией, как описано в данном документе.

а. Антиген SARS-CoV-2 и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие одно и то же.

Как описано выше, в данном документе представлены иммуногенные композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. В данном документе также представлены иммуногенные композиции, содержащие антиген SARS-CoV-2, его фрагмент, его вариант или их комбинацию.

После связывания белков клеточной поверхности и слияния мембран коронавируса проникает в клетку, и его одноцепочечный геном на основе РНК высвобождается в цитоплазму инфицированной клетки. Геном одноцепочечной РНК представляет собой положительную цепь и, таким образом, может быть транслирован в РНК-полимеразу, которая продуцирует дополнительные вирусные РНК, представляющие собой минус-цепи. Соответственно, антиген SARS-CoV-2 также может представлять собой РНК-полимеразу SARS-CoV-2.

Вирусные минус-цепи РНК транскрибируются в более мелкие субгеномные положительные цепи РНК, которые используются для трансляции других вирусных белков, например, белка нуклеокапсида (N), оболочечного белка (E) и матричного белка (M). Соответственно, антиген SARS-CoV-2 может содержать нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2, оболочечный белок SARS-CoV-2 или матричный белок SARS-CoV-2.

Вирусные минус-цепи РНК также можно использовать для репликации вирусного генома, который связан нуклеокапсидным белком. Матричный белок вместе со спайковым белком интегрируется в эндоплазматический ретикулум инфицированной клетки. Совместно нуклеокапсидный белок, связанный с вирусным геномом, и встроенный в мембрану матричный и спайковый белки встраиваются в просвет эндоплазматического ретикулума, тем самым заключая вирусный геном в мембрану. Затем вирусное потомство транспортируется везикулами Гольджи к клеточной мембране инфицированной клетки и высвобождается во внеклеточное пространство путем эндоцитоза.

Коронавирусы, в том числе SARS-CoV-2, инкапсулированы мембраной и имеют мембранный гликопротеин типа 1, известный как спайковый белок (S), который образует выступающие шипы на поверхности коронавируса. Белок S SARS-CoV-2 представляет собой белок слияния мембраны класса I, который является основным оболочечным белком на поверхности коронавирусов. Спайковый белок способствует связыванию коронавируса с белками, расположенными на поверхности клетки, например, металлопротеазой аминопептидазой N, и опосредует слияние клеточно-вирусной мембраны. В частности, спайковый белок содержит субъединицу S1, которая способствует связыванию коронавируса с белками клеточной поверхности. Соответственно, субъединица S1 спайкового белка контролирует то, какие клетки заражены коронавирусом. Спайковый белок также содержит субъединицу S2, которая является трансмембранной субъединицей, которая способствует слиянию вирусной и клеточной мембран. Соответственно, антиген SARS-CoV-2 может содержать спайковый белок SARS-CoV-2, субъединицу S1 спайкового белка SARS-CoV-2, субъединицу S2 спайкового белка SARS-CoV-2 или фрагмент субъединицы S1, содержащий домен связывания рецептора спайкового белка SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 может представлять собой спайковый белок SARS-CoV-2, РНК-полимеразу SARS-CoV-2, нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2, оболочечный белок SARS-CoV-2, матричный белок SARS-CoV-2, их фрагмент, их вариант или их комбинацию.

Антиген SARS-CoV-2 может представлять собой спайковый антиген SARS-CoV-2, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Спайковый антиген SARS-CoV-2 способен вызывать у млекопитающих иммунный ответ против одного или нескольких штаммов SARS-CoV-2. Спайковый антиген SARS-CoV-2 может содержать эпитоп (эпитопы), который (которые) делают его особенно эффективным в качестве иммуногена, против которого можно индуцировать иммунный ответ против SARS-CoV-2.

Антиген SARS-CoV-2 может представлять собой консенсусный антиген, полученный из двух или более штаммов SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 представляет собой консенсусный спайковый антиген SARS-CoV-2. Консенсусный спайковый антиген SARS-CoV-2 может быть получен из последовательностей спайковых антигенов штаммов SARS-CoV-2, и, таким образом, консенсусный спайковый антиген SARS-CoV-2 является уникальным. В некоторых вариантах осуществления консенсусный спайковый антиген SARS-CoV-2 может представлять собой посторонний спайковый антиген, имеющий большее расхождение аминокислотной последовательности с другими спайковыми белками SARS-CoV-2. Соответственно, иммуногенные композиции по настоящему изобретению широко применимы к множеству штаммов SARS-CoV-2 вследствие уникальных последовательностей консенсусного спайкового антигена SARS-CoV-2. Эти уникальные последовательности позволяют вакцине обеспечивать универсальную защиту от нескольких штаммов SARS-CoV-2, включая генетически разнообразные варианты SARS-CoV-2. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антиген SARS-CoV-2, могут быть модифицированы для улучшения экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК, добавление последовательности Козак для усиления инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности антигена SARS-CoV-2. Спайковый антиген SARS-CoV-2 может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, без ограничения сигнальный пептид иммуноглобулина E (IgE) или иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах осуществления спайковый антиген SARS-CoV-2 может содержать тэг геммагглютинина (HA). Спайковый антиген SARS-CoV-2 можно сконструировать так, чтобы он вызывал более сильный и широкий клеточный и/или гуморальный иммунный ответ, чем соответствующий спайковый антиген с оптимизированным кодоном.

В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществе-

ствления антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген SARS-CoV-2, содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности, указанной в нуклеотидах 55-3837 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4 или по всей длине SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген SARS-CoV-2, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную по всей длине нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5 или по всей длине SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 6; или последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 функционально связан с лидерной последовательностью IgE. В некоторых таких вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, в которых антиген SARS-CoV-2 включает лидерный IgE, антиген SARS-CoV-2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых таких вариантах осуществления антиген SARS-CoV-2 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Могут быть представлены иммуногенные фрагменты SEQ ID NO: 1. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновую лидерную последовательность, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 1. Такие иммуногенные фрагменты могут быть гомологичными на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID NO: 1. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 96% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 97% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 98% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 99% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновую лидерную последовательность, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 1. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 1. Иммуногенные фрагменты могут быть на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичными фрагментам SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, иммуног-

лобулиновую лидерную последовательность, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах осуществления фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность.

Могут быть представлены иммуногенные фрагменты SEQ ID NO: 4. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновую лидерную последовательность, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 4. Такие иммуногенные фрагменты могут быть гомологичными на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID NO:4. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 96% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 97% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 98% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам, которые на 99% гомологичны иммуногенным фрагментам консенсусных белковых последовательностей в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновую лидерную последовательность, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

Некоторые варианты осуществления относятся к иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 4. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 4. Иммуногенные фрагменты могут быть на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, иммуноглобулиновую лидерную последовательность, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность.

b. Вектор.

Иммуногенные композиции могут содержать один или несколько векторов, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2. Один или несколько векторов способны экспрессировать антиген. Вектор может иметь последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой плазмиду, бактериофаг, искусственную хромосому бактерий или искусственную хромосому дрожжевых грибов. Вектор может быть как самореплицирующимся внехромосомным вектором, так и вектором, который интегрируется в геном хозяина.

Один или несколько векторов могут представлять собой экспрессионную конструкцию, которая, как правило представляет собой плазмиду, которая используется для введения конкретного гена в целевую клетку. Как только вектор экспрессии попадает в клетку, белок, который кодируется этим геном, продуцируется с помощью рибосомальных комплексов системы клеточной транскрипции и трансляции. Плазмиду часто конструируют таким образом, чтобы она содержала регуляторные последовательности, которые выступают в роли энхансерных и промоторных участков и приводят к эффективной транскрипции гена, переносимого на векторе. Векторы по настоящему изобретению экспрессируют большие количества стабильной матричной РНК, и, тем самым, белков.

Векторы могут иметь экспрессионные сигнальные последовательности, такие как сильный промотор, сильный терминирующий кодон, регулирование расстояния между промотором и клонируемым геном и вставка последовательности терминации транскрипции и PTIS (портативная последовательность инициации трансляции).

(1) Векторы экспрессии.

Вектор может представлять собой кольцевую плазмиду или линейную нуклеиновую кислоту. Кольцевая плаزمиды и линейная нуклеиновая кислота способны направлять экспрессию определенной нук-

леотидной последовательности в подходящей клетке субъекта. Вектор может иметь промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, которая может быть функционально связана с сигналами терминации. Вектор также может содержать последовательности, необходимые для соответствующей трансляции нуклеотидной последовательности. Вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, представляющую интерес, может быть химерным, означая, что по меньшей мере один из его компонентов является гетерологичным в отношении по меньшей мере одного из его других компонентов. Экспрессия нуклеотидной последовательности в экспрессионной кассете может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцибельного промотора, который инициирует транскрипцию только в том случае, если клетка-хозяин оказывается под воздействием некоторых определенных внешних раздражителей. В случае многоклеточного организма промотор может быть специфическим в отношении определенной ткани или органа или стадии развития.

(2) Кольцевые и линейные векторы.

Вектор может представлять собой кольцевую плазмиду, которая может трансформировать клетку в результате интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономная реплицирующаяся плазида с точной начала репликации).

Вектор может представлять собой pVAX, pcDNA3.0, pGX-0001 или pprovaх или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК, кодирующую антиген, и обеспечивать трансляцию клеткой последовательности в антиген, который распознается иммунной системой.

Также в данном документе предложена иммуногенная композиция на основе линейной нуклеиновой кислоты или линейная кассета экспрессии ("LEC"), которая способна к эффективной доставке субъекту посредством электропорации и экспрессии одного или нескольких необходимых антигенов. LEC может представлять собой любую линейную ДНК, лишенную какого-либо фосфатного остова. ДНК может кодировать один или несколько антигенов. LEC может содержать промотор, интрон, кодон и/или сигнальную последовательности полиаденилирования. Экспрессия антигена может контролироваться промотором. LEC может не содержать генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатного остова. LEC может не содержать других последовательностей нуклеиновых кислот, не связанных с экспрессией необходимого гена антигена.

LEC может происходить из любой плазмиды, способной линеаризоваться. Плазида может быть способной к экспрессии антигена. Плазида может представлять собой pNP (Пуэрто-Рико/34) или pM2 (Новая Каледония/99). Вектор может представлять собой WLV009, pVAX, pcDNA3.0 или pprovaх или любой другой экспрессионный вектор, способный экспрессировать ДНК, кодирующую антиген, и обеспечивать трансляцию клеткой последовательности в антиген, который распознается иммунной системой.

LEC может представлять собой perM2. LEC может представлять собой perNP. perNP и perMR могут происходить из pNP (Пуэрто-Рика/34) и pM2 (Новая Каледония/99) соответственно.

(3) Промотор, интрон, стоп-кодон и сигнальная последовательность полиаденилирования.

Вектор может иметь промотор. Промотор может представлять собой любой промотор, способный управлять экспрессией генов и регулировать экспрессию выделенной нуклеиновой кислоты. Такой промотор представляет собой элемент действующей в цис-положении последовательности, необходимый для транскрипции посредством ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая транскрибирует антигенную последовательность, описанную в данном документе. Выбор промотора, используемого для направления экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты, зависит от конкретного применения. Промотор может быть расположен на около том же расстоянии от сайта инициации транскрипции в векторе, что и от сайта инициации транскрипции в своем естественном окружении. Однако вариация этого расстояния может быть согласована без потери функции промотора.

Промотор может быть функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген и сигнальные последовательности, необходимые для эффективного полиаденилирования транскрипта, сайтов связывания рибосом и сайта терминации трансляции. Промотор может представлять собой промотор CMV, ранний промотор SV40, поздний промотор SV40, промотор металлотионеина, промотор вируса опухоли молочной железы мышей, промотора вируса саркомы Рауса, промотора полиэдрина или другого промотора, который, как было показано, является эффективным для экспрессии в эукариотических клетках.

Вектор может содержать энхансер и интрон с функциональными сайтами донора и акцептора сплайсинга. Вектор может содержать участок терминации транскрипции ниже структурного гена в целях обеспечения эффективной терминации. Участок терминации может быть получен из того же самого гена, что и промоторная последовательность, или может быть получен из других генов.

с. Наполнители и другие компоненты иммуногенных композиций.

Иммуногенные композиции могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый наполнитель. Фармацевтически приемлемый наполнитель может представлять собой функциональные молекулы, такие как основы, ностели, буферы или разбавители. Как используется в данном документе, термин "буфер" относится к забуференному раствору, который противостоит изменениям pH за счет действия его кислотно-щелочных сопряженных компонентов. Буфер обычно имеет pH от приблизительно 4,0 до приблизительно 8,0, например, от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0. В некоторых вариантах

осуществления буфер представляет собой солевой буфер на основе цитрата натрия (SSC). В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуногенная композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую спайковый антиген SARS-CoV-2, как описано выше, иммуногенная композиция содержит 10 мг/мл вектора в буфере, например, без ограничения буфере SSC. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция содержит 10 мг/мл плазмиды ДНК рGX9501 или рGX9503 в буфере. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию хранят при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию хранят при комнатной температуре. Иммуногенная композиция может храниться по меньшей мере год при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления иммуногенная композиция стабильна при комнатной температуре в течение по меньшей мере года, при этом стабильность определяется как процент суперскрученной плазмиды, составляющий по меньшей мере приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления процент сверхскрученных плазмид составляет по меньшей мере приблизительно 85% после хранения в течение по меньшей мере года при комнатной температуре.

Фармацевтически допустимый наполнитель может представлять собой средство, облегчающее трансфекцию, которое может включать в себя поверхностно-активные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, в том числе монофосфорил-липид А, мурамилпептиды, хиноновые аналоги, везикулы, такие как сквален и сквалан, гиалуроновую кислоту, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные средства, облегчающие трансфекцию.

Средство, облегчающее трансфекцию, может представлять собой полианион, в том числе поли-L-глутамат (LGS) или липид. Средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой поли-L-глутамат, и поли-L-глутамат может присутствовать в иммуногенной композиции в концентрации менее чем 6 мг/мл. Средство, облегчающее трансфекцию, может также включать в себя поверхностно-активные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, в том числе монофосфорил-липид А, мурамилпептиды, хиноновые аналоги и везикулы, такие как сквален и сквалан, и гиалуроновую кислоту можно также вводить совместно с генетической конструкцией. Иммуногенные композиции на основе плазмид ДНК могут также включать в себя средство, облегчающее трансфекцию, такое как липиды, липосомы, в том числе лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники, такие как смесь липосом для доставки ДНК (см., например, WO9324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные средства, облегчающие трансфекцию. Средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой полианион, в том числе поли-β-глутамат (LGS) или липид. Концентрация средства, облегчающего трансфекцию, в иммуногенной композиции, составляет менее чем 4 мг/мл, менее чем 2 мг/мл, менее чем 1 мг/мл, менее чем 0,750 мг/мл, менее чем 0,500 мг/мл, менее чем 0,250 мг/мл, менее чем 0,100 мг/мл, менее чем 0,050 мг/мл или менее чем 0,010 мг/мл.

Фармацевтически приемлемый наполнитель может представлять собой адъювант. Адъювант может представлять собой другие гены, которые экспрессируются в альтернативной плазмиде или доставляются в виде белков в комбинации с плазмидой, указанной выше, в иммуногенной композиции. Адъювант может быть выбран из группы, состоящей из: α-интерферона (IFN-α), β-интерферона (IFN-β), γ-интерферона, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), TNFα, TNFβ, GM-CSF, эпидермального фактора роста (EGF), хемокина, привлекающего Т-клетки кожи (СТАКК), хемокина, экспрессируемого эпителием тимуса (ТЕСК), эпителиального хемокина, ассоциированного со слизистыми оболочками (МЕС), IL-12, IL-15, МНС, CD80, CD86, включая IL-15, с делегированной сигнальной последовательностью и необязательно включающим сигнальный пептид из IgE. Адъювант может представлять собой IL-12, IL-15, IL-28, СТАКК, ТЕСК, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), TNFα, TNFβ, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), L-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 или их комбинацию.

Другие гены, которые можно использовать в качестве адъювантов, включают гены, кодирующие: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, IL-22, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа на интерферон, NFκB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, лиганд RANK, Oх40, лиганд Oх40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

Иммуногенная композиция может дополнительно содержать средство-фасилитатор генетической вакцины, как описано в заявке США с серийным номером 021579, поданной 1 апреля 1994 г., которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

Иммуногенная композиция может быть составлена в соответствии с используемым способом введения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммуногенную композицию готовят в

буфере, необязательно солевом буфере на основе цитрата натрия. Например, иммуногенная композиция может быть составлена в концентрации 10 мг молекулы нуклеиновой кислоты на миллилитр солевого буфера на основе цитрата натрия. Инъецируемая иммуногенная фармацевтическая композиция может быть стерильной, апирогенной и не содержащей твердых частиц. Можно использовать изотонический состав или раствор. Вспомогательные вещества для изотоничности могут включать в себя хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Иммуногенная композиция может содержать сосудосуживающее средство. Изотонические растворы могут включать фосфатно-солевой буфер. Иммуногенные композиции могут дополнительно содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизаторы могут обеспечить стабильность состава при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение продолжительных периодов времени, включая LGS, поликатионы или полианионы.

Также в данном документе представлены изделия, содержащие иммуногенную композицию. В некоторых вариантах осуществления изделие представляет собой контейнер, содержащий иммуногенную композицию. Контейнер может представлять собой, например, без ограничения шприц или флакон. Флакон может иметь пробку, прокалываемую шприцем.

Иммуногенная композиция может быть упакована в надлежащим образом стерилизованные контейнеры, такие как ампулы, флаконы или флаконы, либо в многодозовых, либо в стандартных лекарственных формах. Контейнеры предпочтительно герметично закрывают после заполнения вакцинным препаратом. Предпочтительно, чтобы вакцины были упакованы в контейнер с прикрепленной к нему этикеткой, которая идентифицирует вакцину и содержит уведомление в форме, предписанной государственным учреждением, таким как Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, отражающее одобрение вакцины согласно соответствующим законам, информацию о дозировке и т.п. Этикетка предпочтительно содержит информацию о вакцине, которая применима для медицинского работника, вводящего вакцину пациенту. Упаковка также предпочтительно содержит печатные информационные материалы, касающиеся введения вакцины, инструкции, показания и любые необходимые требуемые предупреждения.

Способы вакцинации.

Также в данном документе представлены способы лечения, защиты от и/или предупреждения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, с помощью введения субъекту иммуногенной композиции. Введение иммуногенной композиции субъекту может индуцировать или вызывать иммунный ответ у субъекта. Индуцированный иммунный ответ можно использовать для лечения, предупреждения и/или защиты от заболеваний, например патологий, связанных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2.

Индуцированный иммунный ответ у субъекта, которому вводили иммуногенную композицию, может обеспечить устойчивость к одному или нескольким штаммам SARS-CoV-2.

Индуцированный иммунный ответ может включать в себя индуцированный иммунный гуморальный ответ и/или индуцированный клеточный иммунный ответ. Гуморальный иммунный ответ может быть индуцирован от приблизительно более 1,5 раз до приблизительно более 16 раз, от приблизительно более 2 раз до приблизительно более 12 раз или от приблизительно более 3 раз до приблизительно более 10 раз. Индуцированный гуморальный иммунный ответ может включать в себя образование антител IgG и/или нейтрализующих антител, которые являются реактивными в отношении антигена. Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать в себя CD8+ Т-клеточный ответ, который индуцируется от приблизительно 2 раз до приблизительно более 30 раз, от приблизительно 3 раз до приблизительно 25 раз или от приблизительно 4 раз до приблизительно 20 раз.

Доза вакцины может составлять от 1 мкг до 10 мг активного компонента/кг массы тела/время и может составлять от 20 мкг до 10 мг компонента/кг массы тела/время. Вакцину можно вводить каждые 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 или более дней или каждые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более недель. Число доз вакцины для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше.

В одном варианте осуществления общая доза вакцины составляет 1,0 мг нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления общая доза вакцины составляет 2,0 мг нуклеиновой кислоты, вводимой в виде 2×1,0 мг нуклеиновой кислоты.

а. Введение.

Иммуногенная композиция может быть составлена в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в фармацевтической области. Таким композициям можно вводить в дозах и с помощью методик, хорошо известных специалистам в области медицинских наук, учитывая такие факторы, как возраст, пол, масса тела и состояние определенного субъекта, а также путь введения. Вакцину можно вводить, например, в виде одной, двух, трех, четырех или более инъекций. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят начальную дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты. Начальную дозу можно вводить в виде одной, двух, трех или более инъекций. За начальной дозой может следовать введение одной, двух, трех, четырех или более последующих доз от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг молекулы нуклеиновой кислоты через приблизительно одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, десять, двенадцать или более недель после непосредственно предшествующей дозы. Каждую последующую дозу можно вводить в виде

одной, двух, трех или более инъекций. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию вводят субъекту до введения дополнительного средства, одновременно с ним или после него. В некоторых вариантах осуществления иммуногенную композицию вводят в качестве бустерной дозы после введения средства для лечения инфекции SARS-CoV-2 или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2. В одном варианте осуществления заболевание или нарушение, ассоциированные с инфекцией SARS-CoV-2, включает без ограничения коронавирусную болезнь 2019 (COVID-19). В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированные с инфекцией SARS-CoV-2, представляют собой мультисистемный воспалительный синдром у взрослых (MIS-A) или мультисистемный воспалительный синдром у детей (MIS-C).

Субъект может представлять собой млекопитающее, такое как человек, лошадь, примат, корова, свинья, овца, кошка, собака, морская свинка, кролик, крыса или мышь.

Вакцину можно вводить профилактически или терапевтически. При профилактическом введении вакцины можно вводить в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа. В терапевтических целях вакцины вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для достижения терапевтического эффекта. Количество, необходимое для осуществления этого, определяется как "терапевтически эффективная доза". Количества, эффективные для такого применения, будут зависеть, например, от конкретной композиции вакцины, схемы введения, способа введения, стадии и тяжести заболевания, общего состояния пациента и оценки лечащего врача.

Вакцину можно вводить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, как описано в Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Feigner et al. (патент США № 5580859, выданный 3 декабря 1996 г.); Feigner (патент США № 5703055, выданный 30 декабря 1997 г.); и Carson et al. (патент США № 5679647, выданный 21 октября 1997 г.), содержание всех из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. ДНК вакцины может образовывать комплексы с частицами или гранулами, которые можно вводить индивидууму, например, с помощью вакцинной пушки. Специалист в данной области техники будет знать, что выбор фармацевтически приемлемого носителя, в том числе физиологически приемлемого соединения, зависит, например, от пути введения экспрессионного вектора.

Вакцина может быть доставлена с помощью ряда путей. Типичные пути доставки включают в себя парентеральное введение, например, внутридермальную, внутримышечную или подкожную доставку. Другие пути включают в себя пероральное введение, интраназальные и интравaginaльные пути. В случае ДНК вакцины, в частности, вакцина может быть доставлена в интерстициальные пространства тканей индивидуума (Feigner et al., патенты США №№ 5580859 и 5703055, содержание всех из которых включены в данный документ во всей своей полноте). Вакцина также может быть введена в мышцу или может быть введена посредством интрадермальных или подкожных инъекций, или трансдермально, например, с помощью ионофореза. Также может быть использовано эпидермальное введение вакцины. Эпидермальное введение может включать в себя механическое или химическое раздражение самого верхнего слоя эпидермиса для стимуляции иммунного ответа на раздражитель (Carson et al., патент США № 5679647, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Парентеральное введение необязательно может сопровождаться электропорацией, как описано в данном документе.

Вакцина также может быть составлена для введения через носовые ходы. Составы, подходящие для назального введения, в которых носитель представляет собой твердое вещество, может включать в себя крупный порошок, имеющий размер частицы, например, в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 500 микрон, который вводят таким образом, чтобы вдохнуть его, например, в результате быстрой ингаляции через носовой ход из контейнера с порошком, удерживаемого возле носа. Состав может представлять собой назальный спрей, назальный капли или может быть введен с помощью небулайзера. Состав может включать в себя водные или маслянистые растворы вакцины.

Вакцина может представлять собой жидкий препарат, такой как суспензия, сироп или эликсир. Вакцина также может представлять собой препарат для парентерального, подкожного, внутримышечного или внутривенного введения (например, инъекционного введения), такой как стерильная суспензия или эмульсия.

Вакцина может быть включена в липосомы, микросферы или другие полимерные матрицы (Feigner et al., патент США № 5703055; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I-III (2nd ed. 1993), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Липосомы могут состоять из фосфолипидов или других липидов, и могут быть нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно легко изготавливать и вводить.

Вакцину можно вводить с помощью электропорации, например, способом, описанным в патенте США № 7664545, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Электропорация может быть осуществлена с помощью способа и/или устройства, описанных в патентах США №№ 6302874; 5676646; 6241701; 6233482; 6216034; 6208893; 6192270; 6181964; 6150148; 6120493; 6096020; 6068650; и 5702359, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Электропорацию можно осуществлять посредством минимально инвазивного устройства.

Минимально инвазивное устройство для электропорации ("MID") может представлять собой устройство для инъекции вакцины, описанной выше, и соответствующей жидкости в ткань организма. Устройство может содержать полую иглу, кассету ДНК и средство доставки жидкости, при этом устройство адаптируют для приведения в действие средства доставки жидкости с тем, чтобы одновременно (например, автоматически) инъецировать ДНК в ткань организма во время вставки иглы в указанную ткань организма. Это имеет то преимущество, что способность инъецировать ДНК и соответствующую жидкость постепенно в то время, когда вставлена игла, приводит к более равномерному распределению жидкости через ткань организма. Боль, испытываемая во время инъекции, может быть ослаблена в результате распределения ДНК, подлежащей инъекции, на большей площади.

С помощью MID можно инъецировать вакцину в ткань без использования иглы. С помощью MID можно инъецировать вакцину в виде небольшого потока или струи с такой силой, чтобы вакцина проникла через поверхность ткани и проходила через подлежащую ткань и/или мышцу. Усилие для небольшого потока или струи может обеспечиваться за счет расширения сжатого газа, такого как диоксид углерода, посредством микроотверстия в течение доли секунды. Примеры устройств для минимально инвазивной электропорации и способы их использования описаны в опубликованной заявке на патент США № 20080234655; патентах США №№ 6520950; 7171264; 6208893; 6009347; 6120493; 7245963; 7328064; и 6763264, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

MID может содержать инжектор, который создает высокоскоростную струю жидкости, которая безболезненно проникает через ткань. Такие безыгольные инжекторы являются коммерчески доступными. Примеры безыгольных инжекторов, которые могут быть использованы в данном документе, включают описанные в патентах США №№ 3805783; 4447223; 5505697; и 4342310, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Требуемая вакцина в форме, подходящей для прямого или непрямого электротранспорта, может быть введена (например, инъецирована) с помощью безыгольного инжектора в ткань, подлежащую лечению, обычно с помощью приведения в контакт поверхности ткани с инжектором таким образом, чтобы осуществлять доставку струи агента с достаточным усилием для того, чтобы вызвать проникновение вакцины в ткань. Например, если ткань, подлежащая лечению, представляет собой слизистую оболочку, кожу или мышцу, то средство выпускается в слизистую оболочку или поверхность ткани с достаточным усилием для того, чтобы вызывать проникновение через роговой слой и в слои кожи, или в подлежащую ткань и мышцу соответственно.

Безыгольные инжекторы хорошо подходят для доставки вакцин во все типы тканей, в частности, в кожу и слизистую оболочку. В некоторых вариантах осуществления безыгольный инжектор может быть использован для проталкивания жидкости, которая содержит вакцину, к поверхности и в кожу или слизистую оболочку субъекта. Иллюстративные примеры различных типов тканей, которые можно лечить с помощью способов данного изобретения, включают в себя поджелудочную железу, глотку, носоглотку, подглотку, ротоглотку, губу, горло, легкое, сердце, почку, мышцу, молочную железу, толстую кишку, предстательную железу, тимус, семенник, кожу, слизистую ткань, яичник, кровеносные сосуды или любую их комбинацию.

MID может иметь игольчатые электроды, которые электропорировать ткань. В результате генерирования импульсов между многочисленными парами электродов в массиве из множества электродов, например, упорядоченных в виде прямоугольников или квадратов, обеспечиваются улучшенные результаты по сравнению с таковыми при генерировании импульсов между парой электродов. Например, в патенте США № 5702359 под названием "Игольчатые электроды для опосредованной доставки лекарственных препаратов и генов" раскрыт массив игл, в котором множество пар игл может подлежать генерированию импульсов во время терапевтической обработки. В этой заявке, которая включена в данный документ посредством ссылки, как если бы она была полностью изложена, иглы размещали по кругу, однако они имели коннекторы и устройство для переключения, позволяющее генерировать импульс между противоположными парами игольчатых электродов. Может быть использована пара игольчатых электродов для доставки рекомбинантных экспрессионных векторов в клетки. Такое устройство и система описаны в патенте США № 6763264, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы может быть использовано одно игольчатое устройство, которое способствует инъекции ДНК и электропорации с помощью одной иглы, напоминающей обычную иглу для инъекций, и применяются импульсы более низкого напряжения, чем таковые, доставляемые используемыми в настоящее время устройствами, таким образом ослабляя электрическое ощущение, испытываемое пациентом.

MID может содержать один или несколько массивов электродов. Массивы могут содержать одну или несколько игл одинакового диаметра или разных диаметров. Иглы могут быть распределены равномерно или неравномерно. Иглы могут составлять от 0,005 дюймов до 0,03 дюймов, от 0,01 дюймов до 0,025 дюймов; или от 0,015 дюймов до 0,020 дюймов. Игла может составлять 0,0175 дюймов в диаметре. Иглы могут размещаться на расстоянии 0,5 мм, 1,0 мм, 1,5 мм, 2,0 мм, 2,5 мм, 3,0 мм, 3,5 мм, 4,0 мм или более.

MID может состоять из генератора импульсов и двух или более игольчатых инжекторов для вакци-

ны, которые доставляют вакцину и импульсы для электропорации за один этап. Генератор импульсов может обеспечивать гибкое программирование параметров импульсов и инъекции посредством персонального компьютера, управляемого флэш-картой, а также полной записью и хранением данных об электропорации и пациентах. Генератор импульсов может доставлять множество импульсов напряжения в течение коротких периодов времени. Например, генератор импульсов может доставлять три 15-вольтных импульса продолжительностью по 100 мсек. Примером такого MID является система Elgen 1000 от Inovio Biomedical Corporation, которая описана в патенте США № 7328064, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

MID может представлять собой устройство и систему CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Блю-Белл, Пенсильвания), которая представляет собой модульную электродную систему, которая облегчает введение макромолекулы, такой как ДНК, в клетки определенной ткани в организм или растение. Модульная электродная система может содержать множество игольчатых электродов; гиподермальную иглу; эклектический коннектор, который обеспечивает проводящую связь от программируемого контроллера импульсов постоянного тока для множества электродов; и источник напряжения. Оператор может захватывать множество игольчатых электродов, которые помещены на опорную структуру, и прочно включать их в определенную ткань в организме или растении. Затем макромолекулы доставляются посредством гиподермальной иглы в определенную ткань. Программируемый контроллер импульсов постоянного тока активируется и электрический импульс постоянного тока используется в отношении множества игольчатых электродов. Используемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение макромолекулы в клетку между множеством электродов. Гибель клеток вследствие перегревания клеток сводится к минимуму в результате ограничения рассеивания энергии в ткани за счет импульсов постоянного тока. Устройство и система Cellectra® описаны в патенте США № 7245963, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Устройство CELLECTRA® может представлять собой устройство CELLECTRA 2000® или устройство CELLECTRA® 3PSP.

MID может представлять собой систему Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals). Система Elgen 1000 может представлять собой устройство, которое предусматривает полую иглу; и средство доставки жидкости, при этом устройство адаптируют для приведения в действие средства доставки жидкости с тем, чтобы одновременно (например, автоматически) инъецировать жидкость, описанную вакцину в данном документе, в ткань организма во время вставки иглы в указанную ткань организма. Преимуществом является способность инъецировать жидкость постепенно в то время, когда вставлена игла, приводит к более равномерному распределению жидкости через ткань организма. Также считается, что боль, испытываемая во время инъекции, ослабляется в результате распределения объема жидкости, подлежащего инъекции, на большей площади.

В добавление к этому, автоматическая инъекция жидкости облегчает автоматический контроль и регистрацию фактической дозы инъецируемой жидкости. Эти данные при необходимости могут храниться с помощью контрольного блока в целях документирования.

Следует понимать, что скорость инъекции может быть как линейной, так и нелинейной, и что инъекция может осуществляться после того, как иглы введены в кожу субъекта, подлежащего лечению, и до тех пор пока они введены далее в ткань организма.

Подходящие ткани, в которые жидкость может быть введена с помощью устройства по данному изобретению, включают в себя опухолевую ткань, кожу или ткань печени, но это может быть и мышечная ткань.

Устройство дополнительно содержит средство введения иглы для направления иглы в ткань организма. Скорость инъекции жидкости контролируется с помощью скорости введения иглы. Это имеет то преимущество, что введение иглы и инъекция жидкости может контролироваться таким образом, что при необходимости введение может совпадать со скоростью инъекции. Это также делает устройство более легким для применения пользователем. При необходимости могут быть предложены средства для автоматического введения иглы в ткань организма.

Пользователь может выбирать, когда начинать инъекцию жидкости. Однако в идеальном случае инъекция начинается, когда кончик иглы достиг мышечной ткани и устройство может включать средство для определения того, что игла была вставлена на достаточную глубину для начала инъекции жидкости. Это означает, что начало инъекции жидкости может быть начато автоматически, когда игла достигла необходимой глубины (которая обычно будет представлять собой глубину, на которое начинается мышечная ткань). Глубина, на которой начинается мышечная ткань, например, может быть взята в качестве предварительной глубины введения иглы, например, значение 4 мм, которое будет считаться достаточным для того, чтобы игла прошла через слой кожи.

Средство измерения может представлять собой в себя ультразвуковой зонд. Средство измерения может представлять собой средство для определения изменения импеданса или сопротивления. В этом случае средство может не определять как таковую глубину иглы в ткани организма, а вместо этого быть адаптированным к определению изменения импеданса или сопротивления, по мере того, как игла движется из другого типа ткани организма в мышцу. Любая из этих альтернатив обеспечивает относительно

точные и простые для применения средства определения того, что можно начинать инъекцию. Глубина введения иглы при необходимости может дополнительно фиксироваться и может быть использована для контроля инъекции жидкости, поскольку объем жидкости, подлежащей введению, определяется по мере того, как фиксируется глубина введения иглы.

Устройство может дополнительно содержать: основание для поддержания иглы; и установку для расположения в ней основания, при этом основание является подвижным по отношению к установке, таким образом, что игла возвращается в установку, когда основание находится в первом обратном положении по отношению к установке и игла выходит из установки, когда основание находится во втором обратном положении в установке. Это является предпочтительным для пользователя, поскольку установка может быть расположена на коже пациента и иглы затем могут быть введены в кожу пациента в результате движения установки по отношению к основанию.

Как указано выше, желательно достигать контролируемой скорости инъекции жидкости таким образом, чтобы жидкость равномерно распределялась по длине иглы, по мере того, как она вводится в кожу. Средство доставки жидкости может представлять собой средство, приводящее в движение поршень, адаптированное для инъекции жидкости с контролируемой скоростью. Средство, приводящее в движение поршень, например, может быть активировано серводвигателем. Однако средство, приводящее в движение поршень, может быть приведено в действие с помощью основания, движущегося в аксиальном направлении по отношению к установке. Следует понимать, что могут быть предложены альтернативные средства для доставки жидкости. Таким образом, например, закрытый контейнер, который можно сжимать для доставки жидкости с контролируемой и неконтролируемой скоростью, может быть представлен в месте шприца или поршневого системы.

Устройство, описанное выше, может быть использовано для любого типа инъекции. Однако, предполагается, что оно является особенно пригодным в области электропорации и, таким образом, оно может дополнительно содержать средство для применения напряжения по отношению к игле. Это позволяет использовать иглу не только для инъекции, но также и в качестве электрода во время электропорации. Это является особенно предпочтительным, поскольку это означает, что электрическое поле применяется по отношению к той же площади, что и инъецируемая жидкость. Традиционно существовала проблема в отношении электропорации, которая заключалась в том, что очень сложно точно выравнивать электрод в отношении ранее инъецируемой жидкости и, таким образом, пользователи, как правило, вводили больший объем жидкости, чем требуется на большую площадь, и применяли электрическое поле на большей площади в целях обеспечения наложения вещества и электрического поля. С помощью данного изобретения как объем инъецируемой жидкости, так и величина используемого электрического поля может быть снижена, при этом достигается высокое соответствие между электрическим полем и жидкостью.

Применение в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения, защиты от и/или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, у субъекта, нуждающегося в этом, с помощью введения комбинации молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген SARS-CoV-2 или его фрагмент или вариант, в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, ассоциированные с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, представляют собой коронавирусное заболевание 2019 (COVID-19), мультисистемный воспалительный синдром у взрослых (MIS-A) или мультисистемный воспалительный синдром у детей (MIS-C).

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2, и дополнительное средство можно вводить с использованием любого подходящего способа, при котором комбинация молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей как антиген SARS-CoV-2, так и дополнительное средство, присутствуют у субъекта. В одном варианте осуществления способ может включать введение первой композиции, содержащей средство для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, и введение второй композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген SARS-CoV-2 через менее чем 1, менее чем 2, менее чем 3, менее чем 4, менее чем 5, менее чем 6, менее чем 7, менее чем 8, менее чем 9 или менее чем 10 дней после введения первой композиции, содержащей средство для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2. В одном варианте осуществления способ может включать введение первой композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2, и введение второй композиции, содержащей средство для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, через менее чем 1, менее чем 2, менее чем 3, менее чем 4, менее чем 5, менее чем 6, менее чем 7, менее чем 8, менее чем 9 или менее чем 10 дней после введения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген SARS-CoV-2. В одном варианте осуществления способ может включать введение первой композиции, содержащей средство для лечения инфекции, вызываемой

SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией SARS-CoV-2, и второй композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, одновременно кодирующую антиген SARS-CoV-2. В одном варианте осуществления способ может включать введение одной композиции, содержащей средство для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией SARS-CoV-2, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген SARS-CoV-2.

В некоторых вариантах осуществления средство для лечения инфекции SARS-CoV-2 или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, представляет собой терапевтическое средство. В одном варианте осуществления терапевтическое средство представляет собой противовирусное средство. В одном варианте осуществления терапевтическое средство представляет собой антибиотическое средство.

Неограничивающие примеры антибиотиков, которые можно использовать в комбинации с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген SARS-CoV-2 по настоящему изобретению, включают аминогликозиды (например, гентамицин, амикацин, тобрамицин), хинолоны (например, ципрофлоксацин, левофлоксацин), цефалоспорины (например, цефтазидим, цефепим, цефоперазон, цефпиром, цефтобипрол), антисинегнойные пенициллины: карбоксипенициллины (например, карбенициллин и тикарциллин) и уреидопенициллины (например, мезлоциллин, азлоциллин и пиперациллин), карбапенемы, меропенемы (например, меропенемы) дорипенем), полимиксины (например, полимиксин В и колистин) и монобактамы (например, азтреонам).

Введение в качестве бустера.

В одном варианте осуществления иммуногенную композицию вводят в виде бустерной вакцины после введения исходного средства или вакцины для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемых SARS-CoV-2, включая без ограничения COVID-19, мультисистемный воспалительный синдром у взрослых (MIS-A) или мультисистемный воспалительный синдром у детей (MIS-C). В одном варианте осуществления бустерную вакцину вводят по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза или по меньшей мере 5 раз после введения исходного средства или вакцины для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, включая без ограничения COVID-19, мультисистемный воспалительный синдром у взрослых (MIS-A) или мультисистемный воспалительный синдром у детей (MIS-C). В одном варианте осуществления бустерную вакцину вводят через по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 16 часов, по меньшей мере 20 часов, по меньшей мере 24 часа, по меньшей мере 36 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 60 часов, по меньшей мере 72 часов, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 1 неделю, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 3 недели, по меньшей мере 4 недели, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 1 год и более 1 года после введения исходного средства или вакцины для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой SARS-CoV-2, включая без ограничения COVID-19, мультисистемный воспалительный синдром у взрослых (MIS-A) или мультисистемный воспалительный синдром у детей (MIS-C).

Применение в анализах.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот или кодируемые антигены по настоящему изобретению можно использовать в анализах *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты или кодируемые антигены можно использовать в анализах для обнаружения присутствия антител к спайковому белку SARS-CoV-2. Иллюстративные анализы, в которые могут быть включены молекулы нуклеиновой кислоты или кодируемые антигены, включают без ограничения вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, методы поверхностного плазмонного резонанса, методы проточной цитометрии, различные иммунологические анализы, например, иммуногистохимические анализы, иммуноцитохимические анализы, ELISA, захват ELISA, твердофазные иммуноферментные анализы (ELISpot), сэндвич-анализы, иммуноферментный анализ, радиоиммунный анализ, флуоресцентный иммуноанализ и т.п., все из которых известны специалистам в данной области техники. См., например, Harlow et al., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Harlow et al., 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

В одном варианте осуществления спайковый антиген SARS-CoV-2 или его фрагменты по настоящему изобретению можно использовать в анализе окрашивания внутриклеточных цитокинов в комбинации с проточной цитометрией для оценки Т-клеточных иммунных ответов. Этот анализ позволяет одновременно оценивать множественные фенотипические, дифференциальные и функциональные параметры, относящиеся к реагирующим Т-клеткам, в первую очередь экспрессию множественных эффекторных цитокинов. Эти свойства делают методику особенно подходящей для оценки Т-клеточных иммунных

ответов, индуцированных вакциной по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления спайковый антиген SARS-CoV-2 или его фрагменты по настоящему изобретению можно использовать в анализе ELISpot. Анализ ELISpot представляет собой высокочувствительный иммуноанализ, который измеряет частоту клеток, секретирующих цитокины, на уровне отдельных клеток. В этом анализе клетки культивируют на поверхности, покрытой специфическим захватывающим антителом, в присутствии или в отсутствие стимулов. В одном варианте осуществления спайковый антиген SARS-CoV-2 или его фрагменты по настоящему изобретению можно использовать в качестве стимула в анализе ELISpot.

Методы диагностики.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам диагностики у субъекта инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или наличия антител к SARS-CoV-2. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение образца субъекта в контакт с антигеном SARS-CoV-2 по настоящему изобретению или клеткой, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, для экспрессии антигена SARS-CoV-2, и обнаружение связывания антитела к спайковому антигену SARS-CoV-2 с антигеном SARS-CoV-2 по настоящему изобретению. В таком варианте осуществления связывание антитела к спайковому антигену SARS-CoV-2, присутствующего в образце субъекта, с антигеном или его фрагментом по настоящему изобретению будет указывать на то, что субъект в настоящее время инфицирован или ранее был инфицирован SARS-CoV-2.

Наборы и изделия.

В данном документе предложен набор, который может быть использован для лечения субъекта с помощью способа вакцинации, описанного выше. Набор может содержать иммуногенную композицию, описанную в данном документе.

Набор также может содержать инструкции для осуществления способа вакцинации, описанного выше и/или того, как применять набор. Инструкции, включенные в набор, могут быть прикреплены к упаковочному материалу или могут быть включены в виде инструкции по применению препарата. Несмотря на то, что инструкции в типичном случае представляют собой письменные или печатные материалы, они не ограничены таковыми. Настоящим раскрытием предусмотрен любой носитель, способный хранить инструкции и передавать их конечному пользователю. К таким носителям относятся, но не ограничиваясь ими, электронные носители (например, магнитные диски, пленки, картриджи), оптические носители (например, CD-ROM) и т.п. Используемый в данном документе термин "инструкции" может включать адрес интернет-сайта, который предлагает инструкции.

Кроме того, в данном документе содержатся продукты, содержащие иммуногенную композицию, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изделие представляет собой контейнер, такой как флакон, необязательно одноразовый флакон. В одном варианте осуществления изделие представляет собой одноразовый стеклянный флакон, снабженный пробкой, который содержит иммуногенную композицию, описанную в данном документе, для введения. В некоторых вариантах осуществления флакон содержит пробку, прокалываемую шприцем, и пломбу. В некоторых вариантах осуществления изделие представляет собой шприц.

Настоящее изобретение имеет несколько аспектов, проиллюстрированных эффектами неограничивающими примерами.

Примеры

Пример 1.

Материалы и методы.

Клеточные линии. Линии клеток почки эмбриона человека (HEK)-293Т (ATCC® CRL-3216™) и почки африканской зеленой мартышки COS-7 (ATCC® CRL-1651™) получали от ATCC (Олд Таун Манассас, Вирджиния). Все клеточные линии поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и пенициллин-стрептомицина.

Экспрессия белка *in vitro* (вестерн-блоттинг). Клетки эмбриональной почки человека 293Т культивировали и трансфицировали, как описано ранее (Yan, et al. Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther.* 2007;15(2):411-421.). Клетки 293Т трансфицировали pDNA с использованием реагента для трансфекции TurboFectin8.0 (OriGene) в соответствии с протоколом производителя. Через сорок восемь часов лизаты клеток собирали с использованием модифицированного буфера для лизиса клеток RIPA. Белки разделяли на 4-12% геле BIS-TRIS (ThermoFisher Scientific). После переноса блоты инкубировали с поликлональным антителом к спайковому белку SARS-CoV (Novus Biologicals), а затем визуализировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) антителом к IgG мыши (GE Amersham).

Иммунофлуоресценция трансфицированных клеток 293Т. Для окрашивания экспрессии спайкового белка *in vitro* клетки 293Т культивировали на 4-луночных предметных стеклах (Lab-Tek) и трансфицировали 3 мкг/луночка pDNA с использованием реагента для трансфекции TurboFectin8.0 (OriGene) в соответствии с протоколом производителя. Клетки фиксировали через 48 часов после трансфекции 10% нейтральным забуференным формалином (BBC Biochemical, штат Вашингтон) в течение 10 минут при ком-

натной температуре (к.т.), а затем промывали PBS. Перед окрашиванием предметные стекла камеры блокировали 0,3% (об./об.) Triton-X (Sigma), 2% (об./об.) ослиной сывороткой в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки окрашивали кроличьим поликлональным антителом к спайковому белку SARS-CoV (Novus Biologicals), разведенному в 1% (масс/об.) BSA (Sigma), 2% (об./об.) ослиной сыворотке крови, 0,3% (об./об.) Triton-X (Sigma) и 0,025% (об./об.) 1 г/мл азида натрия (Sigma) в PBS в течение 2 часов при к.т. Предметные стекла промывали три раза в течение 5 мин. в PBS, а затем окрашивали меченым AF488 ослиным антителом к IgG кролика (Life Technologies, A21206) в течение 1 часа при к.т. Предметные стекла промывали повторно, укладывали и покрывали DAPI-Fluoromount (SouthernBiotech).

Экспрессия РНК *in vitro* (qRT-PCR). Экспрессию мРНК плазмиды *in vitro* демонстрировали путем трансфекции COS-7 серийно разведенными плазмидами с последующим анализом общей РНК, выделенной из клеток, с использованием обратной транскрипции и ПЦР. Трансфекции четырех концентраций плазмиды выполняли с использованием реагента для трансфекции FuGENE® 6 (Promega), что приводило к конечным массам в диапазоне от 80 до 10 нг/лунок. Трансфекции проводили в двух повторностях. Через 18-26 часов инкубации клетки лизировали буфером RLT (Qiagen). Суммарную РНК выделяли из каждой лунки с помощью набора Qiagen RNeasy согласно инструкциям к набору. Полученную концентрацию РНК определяли с помощью OD260/280, а образцы РНК разводили до 10 нг/мкл. Затем сто нанogramмов РНК преобразовывали в cDNA с использованием набора для обратной транскрипции (RT) cDNA высокой мощности (Applied Biosystems) согласно инструкциям к набору. Реакционные смеси, полученные при к.т., содержащие РНК, но не содержащие обратную транскриптазу (минус RT), включали в качестве контролей контаминации образца плазмидной ДНК или клеточной геномной ДНК. Затем восемь мкл образца cDNA подвергали ПЦР с использованием праймеров и зондов, специфичных для целевой последовательности (pGX9501, прямой праймер - CAGGACAAGAACACACAGGAA (SEQ ID NO: 7); pGX9501, обратный праймер - CAGGCAGGATTTGGGAGAAA (SEQ ID NO: 8); pGX9501, зонд - ACCCATCAAGGACTTTGGAGG (SEQ ID NO: 9); и pGX9503, прямой праймер - AGGACAAGAACACACAGGAAG (SEQ ID NO: 10); pGX9503, обратный праймер - CAGGATCTGGGAGAAGTTGAAG (SEQ ID NO: 11); pGX9503, зонд - ACACCACCCATCAAGGACTTTGGA (SEQ ID NO: 12)). В отдельной реакции такое же количество образца cDNA подвергали ПЦР с использованием праймеров и зонда, разработанных для последовательностей β-актина клеточной линии COS-7 (β-актин, прямой праймер - GTGACGTGGACATCCGTA AAA (SEQ ID NO: 13); β-актин, обратный праймер - CAGGGCAGTAATCTCCTTCTG (SEQ ID NO: 14); β-актин, зонд - TACCCTGGCATTTGCTGACAGGATG (SEQ ID NO: 15)). Праймеры и зонды синтезировали компанией Integrated DNA Technologies, Inc., и зонды помечали 56-FAM и Black Hole Quencher 1. В реакции использовали ABI Fast Advance 2X (кат. № 4444557), с конечными концентрациями прямого и обратного праймера 1 мкМ и концентрацией зонда 0,3 мкМ. Используя систему QuantStudio™ 7 Flex Real Time PCR Studio (Applied Biosystems), образцы сначала подвергали выдержке в течение 1 минуты при 95°C, а затем 40 циклам ПЦР, каждый из которых состоял из 1 секунды при 95°C и 20 секунд при 60°C. После ПЦР результаты амплификации анализировали следующим образом. Отрицательные контроли трансфекции (NTC), контроли минус RT и NTC тщательно исследовали для каждого из их соответствующих показаний. Пороговый цикл (CT) каждой концентрации трансфекции для целевой мРНК INO-4800 SARS-CoV-2 и для мРНК β-актина получали с помощью программного обеспечения QuantStudio™ с использованием автоматической настройки порогового значения. Плазмиду считали активной в отношении экспрессии мРНК, если экспрессия в любой из лунок, трансфицированных плазмидой, по сравнению с отрицательным контролем трансфекции превышала 5 CT. Животные. Самок мышей C57/BL6 и BALB/c в возрасте 6 недель приобретали в Charles River Laboratories (Малверн, Пенсильвания) и The Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн). Самок морских свинок Hartley в возрасте 8 недель приобретали в Elm Hill Labs (Челмсфорд, Массачусетс). Всех животных содержали в помещении для животных в Центре животных Института Вистар или в Acculab Life Sciences (Сан-Диего, Калифорния). Все испытания и исследования на животных соответствовали всем применимым этическим нормам, а исследования получили этическое одобрение Института Вистар или Институциональных комитетов по уходу и использованию животных Acculab (IACUC). В исследованиях на мышах в день 0 дозы 2,5, 10 или 25 мкг pDNA вводили в переднюю большеберцовую мышцу (TA) с помощью иглы с последующей электропорацией CELLECTRA® *in vivo* (EP). Доставка CELLECTRA® EP состоит из двух наборов импульсов с постоянным током 0,2 А. Второй набор импульсов задерживается на 3 секунды. В каждом наборе имеются два импульса по 52 мс с задержкой 198 мс между импульсами. В дни 0 и 14 собирали кровь. Параллельные группы мышей последовательно умерщвляли в дни 4, 7 и 10 после иммунизации для анализа клеточных иммунных ответов. В исследованиях на морских свинках в день 0 100 мкг pDNA вводили в кожу с помощью инъекции Манту с последующим введением *in vivo* EP CELLECTRA®.

ELISA связывания антигена. Для определения титров связывания антител в сыворотке крови проводили ELISA. Планшеты Nunc для ELISA покрывали 1 мкг/мл рекомбинантных белковых антигенов в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали три раза, затем блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в DPBS с 0,05% Tween 20 в течение 2

часов при 37°C.

Затем планшеты промывали и инкубировали с серийными разведениями сыворотки крови мыши или морской свинки и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Планшеты промывали повторно и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) вторичным антителом к IgG морской свинки в разведении 1:10000 (Sigma-Aldrich, кат. A7289) или конъюгированным с HRP вторичным антителом к IgG мыши (Sigma-Aldrich), и инкубировали в течение 1 часа при к.т. После окончательной промывки планшеты проявляли с использованием однокомпонентного субстрата пероксидазы SureBlue™ TMB 1 (KPL, кат. 52-00-03), а реакцию останавливали стоп-раствором TMB (KPL, кат. 50-85-06). Планшеты считывали при длине волны 450 нм в течение 30 минут с использованием планшет-ридера Synergy™ HTX (BioTek Instalments, Хайленд-Парк, Вермонт). Титры конечных точек связывания антител (EPT) рассчитывали, как описано ранее (Bagarazzi ML, Yan J, Morgow MP, et al. Иммуноterapia против HPV16/18 приводит к образованию мощных TH1 и цитотоксических клеточных иммунных ответов. *Sci Transl Med.* 2012;4(155):155ra138). Тестируемые связывающие антигены включали антигены SARS-CoV-2: спайковый белок S1 (Sino Biological 40591-V08H), спайковый белок S1+S2 ECD (Sino Biological 40589-V08B1), RBD (Техасский университет в Остине (McLellan Lab.)); антигены SARS-COV: спайковый белок SI (Sino Biological 40150-V08B1), S (1-1190) (Immune Tech IT-002-001P) и спайковый С-концевой пептид (Meridian Life Science R18572).

ELISA конкуренции за ACE2. Для исследований на мышах выполняли ELISA для определения конкуренции сывороточных антител на основе IgG к ACE2 человека с тэгом Fc человека. Планшеты Nunc для ELISA покрывали кроличьим антителом к His6X в концентрации 1 мкг/мл в 1X PBS на 4-6 часов при комнатной температуре (к.т.) и промывали 4 раза промывочным буфером (1X PBS и 0,05% Tween® 20). Планшеты блокировали в течение ночи при 4°C блокирующим буфером (1X PBS, 0,05% Tween® 20, 5% сгущенного молока и 1% FBS). Планшеты промывали четыре раза промывочным буфером, затем инкубировали с полноразмерным (S1+S2) спайковым белком, содержащим С-концевой His-тэг (Sino Biologicals, кат. 40589-V08B1) при 10 мкг мл-1 в течение 1 часа при к.т.. Планшеты промывали, а затем серийные разведения очищенного IgG мыши, смешанного с 0,1 мкг мл-1 рекомбинантного ACE2 человека с тэгом Fc человека (ACE2-IgHu), инкубировали в течение 1-2 часов при к.т.. Планшеты промывали повторно и затем инкубировали с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) вторичным антителом к IgG человека в разведении 1:10000 (Bethyl, кат. A80-304P) и инкубировали в течение 1 часа при к.т.. После окончательной промывки планшеты проявляли с использованием субстрата 1-Step Ultra для TMB-ELISA (Thermo, кат. 34029) и реакцию останавливали 1 М серной кислотой. Планшеты считывали при длине волны 450 нм в течение 30 минут с использованием устройства для считывания микропланшетов SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Строили кривые конкуренции, и площадь под кривой (AUC) рассчитывали с использованием аналитического программного обеспечения Prism 8 с несколькими t-критериями для определения статистической значимости.

Для исследований на морских свинках 96-луночные планшеты для анализа половинной площади (Costar) покрывали 25 мкл на лунку 5 мкг/мл спайкового белка S1+S2 SARS-CoV-2 (Sino Biological), разведенного в 1×DPBS (ThermoFisher) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали буфером 1×PBS с 0,05% TWEEN® 20 (Sigma). Добавляли по 100 мкл на лунку 3% (вес/об.) BSA (Sigma) в 1×PBS с 0,05% TWEEN® 20 и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Образцы сыворотки крови разводили 1:20 в 1% (вес/об.) BSA в 1×PBS с 0,05% TWEEN. После промывания планшета для анализа добавляли 25 мкл/лунка разведенной сыворотки крови и инкубировали 1 час при 37°C. Рекомбинантный ACE2-Fc-тэг человека (Sinobiological) добавляли непосредственно к разведенной сыворотке крови с последующим инкубированием в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали и добавляли в аналитический планшет по 25 мкл на лунку разведенного 1:10000 конъюгированного с HRP козьего антитела к hu Fc-фрагменту (Bethyl, A80-304P). Планшеты инкубировали 1 час при к.т.. Для разработки использовали стоп-раствор SureBlue/TMB (KPL, Мэриленд) и O.D. Регистировали при 450 нм.

Анализ нейтрализации псевдовируса SARS-CoV-2. Псевдотипированные вирусы SARS-CoV-2 получали с использованием клеток HEK293T, трансфицированных GeneJammer (Agilent) с использованием плазмиды S IgE-SARS-CoV-2 (Genscript) и плазмиды pNL4-3.Luc.R-E- (реагент NIH AIDS) при соотношении 1:1. Через сорок восемь часов после трансфекции супернатант трансфекции собирали, обогащали FBS до 12% конечного объема, подвергали стерилизующей фильтрации (Millipore Sigma) и разделяли на аликвоты для хранения при -80°C. Псевдотипированные вирусы SARS-CoV-2 титровали и давали более чем в 50 раз больше относительных единиц люминесценции (RLU) только для клеток через 72 часа после инфицирования. Сыворотки крови мышей из групп, вакцинированных INO-4800, и групп наивных животных инактивировали нагреванием в течение 15 минут при 56°C и серийно разводили в три раза, начиная с разведения 1:10 для анализа. Сыворотки крови инкубировали с фиксированным количеством псевдотипированного вируса SARS-CoV-2 в течение 90 минут. Клетки HEK293T, стабильно экспрессирующие ACE2, добавляли через 90 минут и инкубировали в стандартном инкубаторе (влажность 37%, 5% CO₂) в течение 72 часов. После инфицирования клетки лизировали с использованием системы анализа Britelite™ plus люминесценции репортерного гена (Perkin Elmer, кат. № 6066769) и измеряли относи-

тельные единицы люминесценции (RLU) с помощью планшет-ридера Biotek. Титры нейтрализации (ID50) рассчитывали как разведение сыворотки крови, при котором RLU снижались на 50% по сравнению с RLU в лунках с контролем вируса после вычитания фонового RLU в лунках с клеточным контролем.

Анализы нейтрализации вируса дикого типа SARS-CoV-2. Анализы нейтрализации изолятов SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 проводили в Public Health England (Портон-Даун, Великобритания). Титры нейтрализующих вирусов измеряли в образцах сыворотки крови, которые инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 минут. SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020 isolate) (Caly et al., Isolation and rapid sharing of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) from the first patient diagnosed with COVID-19 in Australia. *Med. J. Aust.* (2020) doi: 10.5694/mja2.50569; опубликовано онлайн: 13 апреля 2020 г.) разбавляли до концентрации 933 pfu/мл и смешивали 50:50 в 1% FCS/MEM, содержащем 25 мМ буфера HEPES, с удвоенными разведениями сыворотки крови от 1:10 до 1:320 в 96-луночном планшете с V-образным дном. Планшет инкубировали при 37°C во влажном боксе в течение 1 часа, после чего вирус переносили в лунки 24-луночного планшета, дважды промытого DPBS, которые засеивали за день до этого по $1,5 \times 10^5$ клеток Vero E6 на лунку в 10% FCS/MEM. Вирусу давали адсорбироваться при 37°C в течение еще одного часа и покрывали средой для анализа бляшек (конечная среда 1X MEM/1,5% СМС/4% FCS). После 5 дней инкубации при 37°C во влажном боксе планшеты фиксировали, окрашивали и подсчитывали бляшки. Средние нейтрализующие титры (ND50) определяли с использованием формулы Спирмена-Карбера относительно контрольных лунок, содержащих только вирус.

Анализы нейтрализации изолятов SARS-CoV-2/WH-09/human/2020 проводили в Институте лабораторных животных Китайской академии медицинских наук (CAMS), одобренные Национальной комиссией здравоохранения Китайской Народной Республики. Затравочные растворы SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/WH-09/human/2020) и исследования по выделению вируса проводили в клетках Vero E6, которые содержали в модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM, Invitrogen, Карлсбад, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и инкубировали при 36,5°C, 5% CO₂. Титр вируса определяли, используя стандартную дозу инфекции 50% культуры ткани (TCID50). Образцы сыворотки крови, собранные у иммунизированных животных, инактивировали при 56°C в течение 30 минут и серийно разводили средой для культивирования клеток в две стадии. Разведенные образцы смешивали с вирусной суспензией 100 TCID50 в 96-луночных планшетах в соотношении 1:1 с последующей инкубацией в течение 2 часов при 36,5°C в инкубаторе с 5% CO₂. $1-2 \times 10^4$ клеток Vero затем добавляли к смеси сыворотка-вирус и планшеты инкубировали в течение 3-5 дней при 36,5°C в инкубаторе с 5% CO₂. Цитопатический эффект (CPE) каждой лунки регистрировали под микроскопом, а нейтрализующий титр рассчитывали по степени разведения 50% защитного состояния.

Сбор бронхоальвеолярного лаважа. Жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BAL) собирали путем промывания легких умерщвленных и обескровленных мышей 700-1000 мкл ледяным PBS, содержащим 100 мкМ EDTA, 0,05% азида натрия, 0,05% Tween® 20 и 1× ингибитором протеазы (Pierce) (готовые растворы для слизистых оболочек (MPS)) иглой с тупым концом. Легкие морской свинки промывали 20 мл MPS через катетер 16G, введенный в трахею.

Собранную жидкость BAL хранили при температуре -20°C до момента анализа.

ELISpot IFN- γ . Мыши: селезенки мышей собирали отдельно в среде RPMI1640 с добавлением 10% FBS (R10) и пенициллина/стрептомицина и перерабатывали в суспензии отдельных клеток. Клеточные осадки ресуспендировали в 5 мл буфера для лизиса ACK (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем добавляли PBS для остановки реакции. Образцы снова центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин., осадки клеток ресуспендировали в R10, а затем пропускали через нейлоновый фильтр 45 мкм перед использованием в анализе ELISpot. Анализы ELISpot проводили с использованием планшетов Mouse IFN- γ ELISpot^{PLUS} (MABTECH). 96-луночные планшеты для ELISpot, предварительно покрытые захватывающими антителами, блокировали средой R10 в течение ночи при 4°C. 200000 мышинных спленоцитов помещали в каждую лунку и стимулировали в течение 20 часов пулами 15-мерных пептидов, перекрывающихся на 9 аминокислот из спайковых белков SARS-CoV-2, SARS-CoV или MERS-CoV (5 пептидных пулов на белок). Кроме того, выполняли матричное картирование с использованием пулов пептидов в матрице, разработанной для выявления иммунодоминантных ответов. Клетки стимулировали конечной концентрацией 5 мкл каждого пептида на лунку в RPMI+10% FBS (R10). Пятна проявляли на основе инструкций производителя. R10 и коктейли для стимуляции клеток (Invitrogen) использовали для отрицательного и положительного контроля соответственно. Пятна сканировали и количественно оценивали с помощью ридера ImmunoSpotTM CTL. Пятнообразующую единицу (SFU) на миллион клеток рассчитывали путем вычитания лунок с отрицательным контролем.

Проточная цитометрия. Окрашивание внутриклеточных цитокинов проводили на спленоцитах, собранных у мышей BALB/c и C57BL/6, стимулированных перекрывающимися пептидами, охватывающими белок S SARS-CoV-2, в течение 6 часов при 37°C, 5% CO₂. Клетки окрашивали следующими антителами

от BD Biosciences, если не указано иное, с разведениями, указанными в скобках: конъюгированное с FITC антитело к CD107a мыши (1:100), конъюгированное с PerCP-Cy5.5 антитело к CD4 мыши (1:100), конъюгированное с APC к CD8a мыши (1:100), ViViD Dye (1-40) (LIVE/DEAD®, набор для фиксированной окраски мертвых клеток в фиолетовый цвет, Invitrogen, L34955), конъюгированное с APC-Cy7 антитело к CD3e (1:100) и конъюгированное с BV605 антитело к IFN-у мыши (1:75) (eBiosciences). Форболмиристатацетат (PMA) использовали в качестве положительного контроля, а полную среду - только в качестве отрицательного контроля. Клетки промывали, фиксировали и клеточные явления регистрировали с помощью анализа FACS CANTO (BD Biosciences), а затем с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo LLC, Ашленд, Орегон).

Статистика. Все статистические анализы проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 или 8 (Ла Хойя, Калифорния). Эти данные считались значимыми, если $p < 0,05$. Линии на всех графиках представляют собой среднее значение, а планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. Никакие образцы или животные не были исключены из анализа. Рандомизацию не проводили для исследований на животных. Информацию об образцах и животных не делали закрытой для исследователя перед выполнением каждого эксперимента.

Результаты.

Конструкция и синтез конструкций ДНК-вакцин к SARS-CoV-2.

Четыре последовательности спайковых белков извлекали из первых четырех доступных полных геномных последовательностей SARS-CoV-2, опубликованных в GISAID (Глобальная инициатива по обмену всеми данными о гриппе). Три последовательности спайкового белка совпадали на 100%, а одна считалась посторонней (98,6% идентичности последовательности с другими последовательностями). После выполнения выравнивания последовательностей последовательность спайкового гликопротеина SARS-CoV-2 ("антиген спайка Covid-19"; SEQ ID NO: 1) получали и добавляли N-концевую лидерную последовательность IgE. Высокооптимизированную последовательность ДНК, кодирующую спайковый белок на основе SARS-CoV-2-IgE, создавали, как описано в другом разделе данного документа, для повышения экспрессии и иммуногенности. Последовательность спайкового гликопротеина SARS-CoV-2 ("спайковый антиген OL Covid-19"; SEQ ID NO: 4) получали и добавляли N-концевую лидерную последовательность IgE. Синтезировали оптимизированную последовательность ДНК, расщепляли BamHI и XhoI и клонировали в вектор экспрессии рGX0001 под контролем непосредственно раннего промотора цитомегаловируса человека и сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста. Полученные плазмиды обозначали как рGX9501 и рGX9503, предназначенные для кодирования белка S SARS-CoV-2 из 3 сопоставимых последовательностей и посторонней последовательности соответственно (фиг. 1А).

In vitro характеристика конструкций синтетических ДНК-вакцин.

Измеряли экспрессию кодируемого спайкового трансгена SARS-CoV-2 на уровне РНК в клетках COS-7, трансфицированных рGX9501 и рGX9503. Используя общую РНК, выделенную из трансфицированных клеток COS-7, экспрессию спайкового трансгена подтверждали с помощью RT-PCR (фиг. 1В). Экспрессию спайкового белка in vitro в клетках 293Т измеряли с помощью вестерн-блоттинга с использованием перекрестно-реактивного антитела к белку S SARS-CoV на клеточных лизатах.

Вестерн-блоты лизатов клеток HEK-293Т, трансфицированных конструкциями рGX9501 или рGX9503, выявили полосы, близкие к прогнозируемой молекулярной массе белка S, 140-142 кДа, с небольшими сдвигами, вероятно, в связи с 22 потенциальными N-связанными гликанами в белке S (фиг. 1С). В иммунофлуоресцентных исследованиях белок S обнаруживали в клетках 293Т, трансфицированных рGX9501 или рGX9503 (фиг. 1D). Таким образом, исследования in vitro выявили экспрессию спайкового белка как на уровне РНК, так и на уровне белка после трансфекции клеточных линий вакцинными конструкциями-кандидатами.

Гуморальные иммунные ответы у мышей. рGX9501 выбирали в качестве конструкции вакцины для перехода к исследованиям иммуногенности в связи с более широким охватом, который она, вероятно, обеспечит по сравнению с вакциной с посторонним антигеном, рGX9503. рGX9501 впоследствии обозначали INO-4800. Иммуногенность INO-4800 оценивали на мышах BALB/c после введения в переднюю большеберцовую мышцу с использованием устройства доставки CELLECTRA®. (Sardesai & Weiner, *Curr. Opin. Immunol.*, 23, 421-429 (2011)). Реактивность сыворотки крови из группы мышей, иммунизированных INO-4800, измеряли в отношении панели антигенов SARS-CoV-2 и SARS-CoV (фиг. 2). Анализ показал связывание IgG с антигенами белка S SARS-CoV-2 с ограниченной перекрестной реактивностью с антигенами белка S SARS-CoV в сыворотке крови мышей, иммунизированных INO-4800. Титры конечной точки связывания IgG измеряли в сыворотке крови у мышей, иммунизированных рDNA против областей S1+S2 рекомбинантного спайкового белка SARS-CoV-2 (фиг. 3А и 3В) и домена связывания рекомбинантного спайкового белка SARS-CoV-2 (RBD) (фиг. 3С и 3D). Конечные титры наблюдали в сыворотке крови мышей в день 14 после иммунизации однократной дозой INO-4800 (фиг. 3В, 3С, 3D).

Анализ нейтрализации. Разрабатывали анализ нейтрализации с псевдовирусом на основе рNL4-3.Luc.R-E, экспонирующего спайковый белок SARS-CoV-2. Титры нейтрализации определяли с помощью снижения относительных единиц люциферазы (RLU) по сравнению с контролями, у которых отсут-

ствовало снижение сигнала RLU. Мышей BALB/c дважды иммунизировали INO-4800, в дни 0 и 14, и сыворотку крови собирали в день 7 после 2-й иммунизации. Псевдовиром инкубировали с серийными разведениями сыворотки крови мыши и смесь сыворотка-вирус добавляли к клеткам 293Т, стабильно экспрессирующим рецептор ACE2 человека (ACE2-293Т), на 72 часа. Средние титры нейтрализации ID50, равные 92,2, наблюдали у мышей, иммунизированных INO-4800 (фиг. 4А и 4В). У контрольных животных снижения RLU не наблюдали. Нейтрализующие титры дополнительно измеряли в отношении двух штаммов вируса SARS-CoV-2 дикого типа с помощью теста нейтрализации уменьшения бляшек (PRNT). Сыворотки крови от мышей BALB/c, иммунизированных INO-4800, нейтрализовала штаммы вируса SARS-CoV-2/WH-09/human/2020 и SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 со средними титрами ND50 97,5 и 128,1 соответственно (табл. 1). Титры, нейтрализующие живой вирус, также оценивали у мышей C57BL/6 после той же схемы иммунизации INO-4800. Сыворотка крови мышей C57BL/6, иммунизированных INO-4800, нейтрализовала вирус SARS-CoV-2 дикого типа со средним титром ND50, составляющим 340 (табл. 1).

Таблица 1

Нейтрализующая активность сывороток крови после введения INO-4800 мышам и морским свинкам.

Модель	Вакцина	N	Схема иммунизации	Временная точка для получения образца	Анализ нейтрализации	ND50 сыворотки крови (Реципрокное разведение)
Мышь BALB/c	pVAX	4	25 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2 (WH-09/human/2020)	<20, <20, <20, <20
	INO-4800	4	25 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2 (WH-09/human/2020)	30, 40, 80, 240

	pVAX	8	25 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	<10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 24
	INO-4800	8	25 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	27, 46, 91, 108, 130, 161, 221, 241
	pVAX	5	10 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	8, 8, 8, 8, 8
	INO-4800	5	10 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	43, 55, 87, 129, 147
	pVAX	4	25 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2	<20, <20, <20, <20
C57B Мышь L/6					(WH- 09/human/2020)	
	INO-4800	4	25 мкг Дни 0, 14	День 21	SARS-CoV-2 (WH- 09/human/2020)	240, 240, 240, 640
Морская свинка	pVAX	5	100 мкг Дни 0, 14, 28	День 42	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	<10, 14, 20, 21, 25
	INO-4800	5	100 мкг Дни 0, 14, 28	День 42	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	>320, >320, >320, >320, >320
	pVAX	5	100 мкг Дни 0, 14, 28	День 35	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	<20, <20, <20, <20, <20
	INO-4800	5	100 мкг Дни 0, 14, 28	День 35	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	527, 532, 579, 614, 616
Новозеландский белый кролик	SSC	5	Дни 0, 28	День 42	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	<10, <10, <10, <10, <10
	INO-4800	5	1 мг, дни 0, 28	День 42	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	12, 23, 32, 148, 178
	INO-4800	5	2 мг, дни 0, 28	День 42	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	202, 237, 252, 455, 995
Отличныес от человека приматы	INO-4800	5	1 мг, дни 0, 28	День 42	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	15, 27, 55, 61, 1489
	INO-4800	5	2 мг, дни 0, 28	День 42	SARS-CoV-2 Псевдовиррус	78, 23, 13, 48, <10

Иммуногенность INO-4800 оценивали на модели морской свинки Hartley, подтвержденной модели внутрикожной доставки вакцины (Carter, et al. The adjuvant GLA-AF enhances human intradermal vaccine responses. *Sci Adv.* 2018;4(9):eaas9930; Schultheis, et al.

Characterization of guinea pig T cell responses elicited after EP-assisted delivery of DNA vaccines to the skin. *Vaccine.* 2017;35(1):61-70). 100 мкг pDNA вводили с помощью инъекции Манту в кожу, а затем с помощью устройства CELLECTRA® в день, как описано в разделе методов выше. В день 14 с помощью ELISA измеряли связывание сывороточных антител к спайковому белку. Иммунизация INO-4800 выявила иммунный ответ в отношении уровней IgG, связывающих белок S1+2 SARS-CoV-2, в сыворотке крови (фиг. 5A и 5B). Конечный титр связывания белка S SARS-CoV-2 в день 14 составил 10530 и 21 у морских свинок, обработанных 100 мкг INO-4800 или pVAX (контроль) соответственно (фиг. 5B). Оценивали нейтрализующую активность антител после внутрикожной иммунизации INO-4800 на модели морской свинки. Морских свинок обрабатывали в дни 0, 14 и 28 pVAX или INO-4800, а образцы сыворотки крови собирали в дни 35 или 42 для измерения нейтрализующей активности сыворотки к псевдовирусу или вирусу дикого типа соответственно. Нейтрализующую активность псевдовируса SARS-CoV-2 со средними титрами ND50, составляющими 573,5, наблюдали у морских свинок, иммунизированных INO-4800 (табл. 1). Активность вируса SARS-CoV-2 дикого типа также наблюдали у иммунизированных INO-4800 морских свинок с титрами ND50>320 по анализу PRNT, наблюдаемому у всех животных (таблица 1). Функциональность сывороточных антител дополнительно измеряли путем оценки их способности ингибировать связывание ACE2 со спайковым белком SARS-CoV-2. Сыворотка крови (разведение 1:20),

полученная от морских свинок, иммунизированных INO-4800, после 2-й иммунизации ингибировала связывание спайкового белка SARS-CoV-2 в диапазоне концентраций ACE-2 (от 0,25 мкг/мл до 4 мкг/мл) (фиг. 6E). Кроме того, кривые разведения сыворотки крови показали, что сыворотка крови, собранная у морских свинок, иммунизированных INO-4800, блокирует связывание ACE-2 с SARS-CoV-2 в зависимости от разведения (фиг. 6F). Сыворотка крови, собранная у животных, получавших pVAX, показала незначительную активность в отношении ингибирования связывания ACE-2 с вирусным белком, снижение сигнала OD при наиболее высокой концентрации сыворотки крови считается матричным эффектом в анализе.

Ингибирование связывания белка S SARS-CoV-2 с рецептором ACE2. Исследовали функциональность ингибирования рецепторов индуцированных INO-4800 ответов антител. Анализ ингибирования ACE2 на основе ELISA разрабатывали в качестве замены для нейтрализации. В качестве контроля в анализе показано, что ACE2 связывается со спайковым белком SARS-CoV-2 с EC50 0,025 мкг/мл (фиг. 6A). Мышей BALB/c иммунизировали в дни 0 и 14 10 мкг INO-4800, а IgG сыворотки крови очищали в день 21 после иммунизации, чтобы убедиться, что ингибирование опосредовано антителами. Сравнивали ингибирование взаимодействия спайковый белок-ACE2 с использованием IgG сыворотки крови от нативной мыши и от мыши, вакцинированной INO-4800 (фиг. 6B). Анализ ингибирования рецепторов повторяли с группой из пяти иммунизированных мышей, что продемонстрировало, что антитела, индуцированные INO-4800, конкурировали со связыванием ACE2 со спайковым белком SARS-CoV-2 (фиг. 6C и 6F). Ингибирование связывания ACE2 далее оценивали на модели морской свинки. Сыворотка крови, полученная от морских свинок, иммунизированных INO-4800, ингибировала связывание спайкового белка SARS-CoV-2 в диапазоне концентраций ACE2 (от 0,25 мкг/мл до 4 мкг/мл) (фиг. 6D). Кроме того, кривые разведения сыворотки крови показали, что сыворотки крови, собранные у морских свинок, иммунизированных INO-4800, блокируют связывание ACE2 с SARS-CoV-2 в зависимости от разведения (фиг. 6E). Сыворотки крови, собранные у животных, получавших pVAX, показали незначительную активность в отношении ингибирования связывания ACE2 с вирусным белком, снижение сигнала OD при наиболее высокой концентрации сыворотки крови считается матричным эффектом в анализе. На фиг. 6F показаны IgG, очищенные от n=5 мышей в день 14 после второй иммунизации INO-4800, демонстрирующие конкуренцию за связывание с рецептором ACE2 со спайковым белком SARS-CoV-2 по сравнению с объединенными IgG интактных мышей.

Таким образом, тестирование иммуногенности как на мышах, так и на морских свинках показало, что вакцина-кандидат против SARS-CoV-2, INO-4800, способна вызывать гуморальный ответ на спайковый белок SARS-CoV-2. ACE2 считается основным рецептором для проникновения SARS-CoV-2 в клетки, блокирование этого взаимодействия предполагает, что антитела, индуцированные INO-4800, могут предупредить инфекцию у хозяина.

Биораспределение IgG, реагирующего с SARS-CoV-2, в легких. Заболевание нижних дыхательных путей (LRD) ассоциировано с тяжелыми случаями COVID-19. Наличие на слизистой оболочке легких антител, нацеленных на SARS-CoV-2, потенциально может опосредовать защиту от LRD. Оценивали наличие специфических антител к SARS-CoV-2 в легких иммунизированных мышей и морских свинок. Мышей BALB/c и морских свинок Hartley иммунизировали в дни 0 и 14 или 0, 14 и 28 соответственно pDNA INO-4800 или контроля pVAX. После умерщвления собирали жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BAL) и проводили ELISA белка S SARS-CoV-2. Как у мышей BALB/c, так и у морских свинок Hartley, получавших INO-4800, измеряли статистически значимое повышение IgG, связывающего белок S SARS-CoV-2, в жидкости BAL по сравнению с животными, получавшими контроль pVAX (фиг. 7A-7D). В совокупности эти данные демонстрируют наличие специфических к SARS-CoV-2 антител в легких после иммунизации INO-4800.

Перекрестно-реактивные клеточные иммунные ответы на коронавирус у мышей. Т-клеточные ответы на антигены S SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV анализировали с помощью ELISpot IFN- γ . Группы мышей BALB/c умерщвляли в дни 4, 7 или 10 после введения INO-4800 (2,5 или 10 мкг pDNA), собирали спленоциты и стимулировали суспензию отдельных клеток в течение 20 часов пулами из 15-мерных перекрывающихся пептидов, охватывающих спайковый белок SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV. В день 7 после введения INO-4800 измеряли Т-клеточные ответы 205 и 552 SFU на 10^6 спленоцитов против SARS-CoV-2 для доз 2,5 и 10 мкг соответственно (фиг. 8A). Ответы более высокой величины 852 и 2193 SFU на 10^6 спленоцитов против SARS-CoV-2 наблюдали в день 10 после введения INO-4800. Кроме того, анализировали перекрестную реактивность клеточного ответа, вызванного INO-4800 против SARS-CoV, который показал обнаруживаемый, хотя и более низкий, Т-клеточный ответ как в день 7 (74 [доза 2,5 мкг] и 140 [доза 10 мкг] SFU на 10^6 спленоцитов), так и в день 10 после введения (242 [доза 2,5 мкг] и 588 [доза 10 мкг] SFU на 10^6 спленоцитов) (фиг. 8B). Интересно, что перекрестно-реактивных Т-клеточных ответов на пептиды MERS-CoV не наблюдали (фиг. 8C). Репрезентативные изображения планшетов ELISpot для IFN- γ представлены на фиг. 31. Идентифицировали популяции Т-клеток, которые продуцировали IFN- γ . Проточный цитометрический анализ спленоцитов, собранных у мышей BALB/c в день 14 после однократной иммунизации INO-4800, показал, что Т-клеточный компар-

тмент содержит 0,04% CD4+ и 0,32% CD8+ IFN- γ + Т-клеток после стимуляции антигенами SARS-CoV-2 (фиг. 32).

Картирование эпитопа BALB/c SARS-CoV-2. Картирование эпитопов, проведенных на спленоцитах мышей BALB/c, получавших дозу 10 мкг INO-4800. Для стимуляции спленоцитов в течение 20 часов создавали пулы матричного картирования, а иммунодоминантные ответы обнаруживали в нескольких пулах пептидов (фиг. 14A). Ответы представляют деконволюции для определенных эпитопов (H2-Kd), кластеризующихся в рецепторно-связывающем домене и в домене S2 (фиг. 14B). Интересно, что один эпитоп H2-Kd SARS-CoV-2, PHGVVFLHV (SEQ ID NO: 16), как было обнаружено, перекрывается с эпитопом VVFLHVTYVYV, рестриктированным по HLA-A2 к вирусу SARS-CoV человека (SEQ ID NO: 17), и находится вблизи от него.

Таким образом, Т-клеточные ответы против эпитопов белка S SARS-CoV-2 обнаруживали у мышей, иммунизированных INO-4800.

Пример 2.

Клеточные и гуморальные иммунные ответы, измеренные у новозеландских белых (NZW) кроликов, обработанных INO-4800.

Внутрикожная доставка рDNA в день 0 и 28. PBMC в ELISpot IFN- γ (фиг. 9); ELISA связывания IgG сыворотки кожи (фиг. 10).

Пример 3.

Гуморальный иммунный ответ на спайковый белок SARS-CoV-2, измеренный у обработанных INO-4800 макак-резус. Внутрикожная доставка рDNA в день 0 и 28. ELISA связывания IgG сыворотки крови. (фиг. 11A-11E).

Гуморальные иммунные ответы на спайковый белок SARS и MERS, измеренные у макак-резус, обработанных INO-4800. Внутрикожная доставка рDNA в день 0 и 28. ELISA связывания IgG сыворотки крови. (фиг. 12A-12G; левая панель, 1 мг INO-4800; правая панель, 2 мг INO-4800). Клеточные иммунные ответы, измеренные с помощью ELISpot IFN- γ в PBMC у обработанных INO-4800 макак-резус после внутрикожной доставки рDNA в дни 0 и 28. Результаты показаны на фиг. 13A (спайковые пептиды SARS CoV-2); 13B (спайковые пептиды SARS CoV); и 13C (спайковые пептиды MERS CoV).

Пример 4.

Анализ ELISA спайкового белка SARS-CoV-2 с использованием INO-4800.

Спайковый белок SARS-CoV-2 наносят на лунки 96-луночного микропланшета путем инкубации в течение ночи или до трех дней. Затем добавляют блокирующий буфер, чтобы заблокировать оставшиеся свободные сайты связывания. Образцы сыворотки крови человека, содержащие антитела к спайковому белку SARS-COV-2 и контрольные образцы, добавляют в заблокированный планшет и инкубируют в течение 1 часа. Во время инкубации антитела к спайковому белку, присутствующие в образцах и положительном контроле, связываются со спайковым белком, иммобилизованным на планшете. Затем планшеты промывают для удаления несвязавшихся компонентов сыворотки крови. Затем добавляют меченое пероксидазой хрена (HRP) антитело к IgG человека для обнаружения антитела, связанного со спайковым белком. После инкубации в течение одного часа планшеты промывают с удалением несвязавшегося антитела для обнаружения HRP, и в планшеты добавляют субстрат ТМВ. В присутствии пероксидазы хрена субстрат ТМВ становится темно-синим, пропорциональным количеству HRP, присутствующему в лунке. После протекания реакции в течение примерно 10 минут добавляют стоп-раствор на основе кислоты, который останавливает ферментативную реакцию и окрашивает ТМВ в желтый цвет. Желтый цвет пропорционален количеству связанных антител к спайковому белку в каждой лунке и считывается при 450 нм. Величина ответа в анализе выражается в виде титров. Значения титра определяют в виде наибольшего серийного разведения, при котором сигнал анализа превышает пороговое значение, основанное на фоновых уровнях анализа для панели сыворотки крови от нормальных доноров-людей.

Квалификация метода анализа ELISA.

Анализ ELISA спайкового белка SARS-CoV-2 с использованием INO-4800 квалифицировали и признали пригодным для предполагаемого использования для измерения гуморального ответа у субъектов, участвующих в клинических испытаниях с использованием INO-4800. Формальная квалификация состояла из 18 планшетов и проводилась двумя операторами в течение четырех дней. Квалификация определяла чувствительность, специфичность, селективность и прецизионность анализа. Во время разработки анализа сыворотка крови выздоравливающих не была доступна. Поэтому при разработке использовали моноклональное антитело. Моноклональное антитело, разведенное в нормальной сыворотке крови человека, использовали для проверки всех параметров в этом анализе. Общая чувствительность анализа составляла 16,1 нг/мл для сыворотки крови, разведенной 1/20, что составляет 322 нг/мл для неразведенной сыворотки крови. Специфичность оценивали с помощью предварительного инкубирования антитела к спайковому белку с рекомбинантным спайковым белком перед анализом. Предварительная инкубация с рекомбинантным спайковым белком приводила к уменьшению сигнала более чем на 60%, что указывает на то, что антитело специфически связывалось со спайковым белком, нанесенным на планшет, а не с другим компонентом анализа. Селективность исследовали путем добавления в отдельные образцы сыво-

ротки крови человека положительных контрольных антител к спайковому белку в концентрации, близкой к пределу обнаружения. Сигнал у семи из 10 человек был выше порогового значения, а у восьми из десяти человек сигнал анализа находился в пределах 20% от среднего сигнала для десяти человек, что свидетельствует о том, что матричные эффекты, как ожидается, будут незначительными для большинства образцов сыворотки крови человека при разведении 1/20. Точность анализа оценивали путем шестикратного анализа высокого, низкого и среднего уровня положительного контроля антитела к спайковому белку на каждом из шести планшетов. Результаты показали низкую вариацию необработанного сигнала внутри анализа, но высокую вариацию необработанного сигнала между анализами. Поскольку предельное значение каждого отдельного планшета основано на сигнале отрицательного контроля на каждом планшете, ожидается, что изменение необработанного сигнала между анализами не повлияет на точность расчетов окончательного титра. Для проверки этого точность предельных значений планшетов оценивали в этой квалификации путем титрования НРС (высокий положительный контроль) шесть раз на каждом из шести планшетов, всего тридцать шесть оценок титра. Тридцать пять из тридцати шести значений были идентичными (титр 180), а одно из определений титра составляло на один этап ниже остальных (60 вместо 180). Это приводило к CV между анализами, составляющему 4,6%.

Пример 5. Анализ ELISPOT спайкового белка SARS-CoV-2 с использованием INO-4800.

Анализ на основе метода иммуноферментных пятен (ELISPOT) представляет собой высокочувствительный иммуноанализ, который измеряет частоту клеток, секретирующих цитокины, на уровне отдельных клеток. В этом анализе клетки культивируют на поверхности, покрытой специфическим захватывающим антителом, в присутствии или в отсутствие стимулов. По прошествии соответствующего времени инкубации клетки удаляют и секретируемую молекулу обнаруживают с помощью детекторного антитела в процедуре, аналогичной той, что используется в ELISA. Детекторное антитело биотинилируют, и добавляют после конъюгата стрептавидин-фермент. При использовании субстрата с осаждающим, а не растворимым продуктом конечным результатом являются видимые пятна на поверхности. Каждое пятно соответствует отдельной цитокин-секретирующей клетке. Квалификацию анализа ELISPOT IFN- γ успешно завершали оценкой специфичности, воспроизводимости и прецизионности анализа (прецизионность внутри анализа и прецизионность между анализами), динамического диапазона, линейности, относительной точности, предела обнаружения и количественной оценки, а также надежности анализа. Анализ тестировали и квалифицировали в соответствии с лабораторными рекомендациями GLP/GCLP.

Квалификация метода анализа ELISPOT. Показания специфичности приводили к получению среднего значения <10 пятнообразующих единиц (SFU) для отрицательного контроля анализа (среда с DMSO), среднего значения 565 SFU для пула пептидов положительного контроля CEF и среднего значения 593 SFU в ответ на стимуляцию с помощью митогена (форбол миристат ацетат+лономицин). Наиболее высокий зарегистрированный % CV для изменчивости внутри анализа составлял 7,37%. Наиболее высокий зарегистрированный % CV для вариации между анализами составлял 17,23%. Наиболее высокий наблюдаемый % CV для изменчивости между операторами составлял 8,11%. Эти значения составляют ниже рекомендованных FDA стандартных критериев приемлемости, равных 20%.

Линейность кривой разведения демонстрировали с помощью наклона, составляющего 0,15, и значения R², составляющего 0,99. Точность анализа составляла >90% в указанном динамическом диапазоне (156-5000 клеток/лунка), что соответствовало критериям приемлемости 80-120%. Предел обнаружения составлял 11 SFU/1×10⁶ PBMC, предел количественного определения наблюдали при 20 SFU/1×10⁶ PBMC. Надежность анализа оценивали путем изменения (i) концентрации пептида; (ii) концентрация вторичных антител; (iii) времени инкубации и (iv) высыхания мембран планшета.

На основании результатов этой квалификации ELISPOT IFN- γ считается квалифицированным и готовым к использованию в клинических испытаниях.

Пример 6. Фаза 1 открытого исследования для оценки безопасности, переносимости и иммуногенности INO-4800, профилактической вакцины против SARS-CoV-2, вводимой внутривенно с последующей электропорацией у здоровых добровольцев.

Оно представляет собой фазу 1 открытого многоцентрового исследования (идентификатор NCT04336410 на clinicaltrials.gov) для оценки безопасности, переносимости и иммунологического профиля INO-4800 (pGX9501), вводимого путем внутривенной (IV) инъекции с последующей электропорацией (EP) с использованием устройства CELLECTRA® 2000 у здоровых взрослых добровольцев. Примерно 40 здоровых добровольцев будут оцениваться по двум (2) уровням доз: Исследуемая группа 1 и исследуемая группа 2, как показано в табл. 2. Всего в каждую группу исследования будет включено 20 субъектов.

Таблица 2
Основные группы введения дозы в исследовании COVID19-001

Исследуемая группа	Количество субъектов	Введение дозы, недели	Количество инъекций+EP на визит для введения дозы	INO-4800 (мг) на инъекцию	INO-4800 (мг) на визит для введения дозы	Общая доза INO-4800 (мг)
1	20	0, 4	1	1,0	1,0	2,0
2	20	0, 4	2 ^a	1,0	2,0	4,0
Всего	40					

^a INO-4800 будет вводиться внутривенно, а затем EP в приемлемом месте на двух разных конечностях при каждом визите для введения дозы.

Все субъекты будут наблюдаться в течение 24 недель после введения последней дозы. Неделя 28 будет представлять собой визитом окончания исследования (EOS).

Основные цели.

Оценить переносимость и безопасность INO-4800, вводимого с помощью ID инъекции с последующей EP у здоровых взрослых добровольцев.

Оценить клеточный и гуморальный иммунный ответ на INO-4800, вводимую с помощью ID инъекции с последующей EP.

Основные конечные точки безопасности:

Частота нежелательных явлений по классу систем органов (SOC), предпочтительному термину (PT), тяжести и связи с исследуемым препаратом.

Реакции в месте введения (т.е. инъекции) (описанные с помощью частоты и тяжести).

Частота нежелательных явлений, представляющих особый интерес.

Первичные конечные точки иммуногенности.

Антигенспецифические антитела к спайковому гликопротеину SARS-CoV-2, определенные с помощью анализов связывания.

Антигенспецифический клеточный иммунный ответ, определенный с помощью IFN- γ , ELISpot и/или проточной цитометрии.

Исследовательская цель.

Оценить расширенный иммунологический профиль с помощью оценки Т- и В-клеточного иммунного ответа.

Исследовательская конечная точка.

Расширенный иммунологический профиль, который может включать (без ограничения) дополнительную оценку количества Т- и В-клеток, реакции нейтрализации и молекулярных изменений Т- и В-клеток путем измерения иммунологических белков и уровней мРНК генов, представляющих интерес, в течение всех недель, что определяется наличием образца.

Оценка безопасности.

Субъекты будут находиться под наблюдением в целях безопасности на протяжении всего испытания до окончания исследования (EOS) или до последнего визита субъекта. Данные о нежелательных явлениях будут собираться при каждом визите (и телефонном звонке в день 1). Лабораторные образцы крови и мочи будут взяты при скрининге, в день 0 (только тест на беременность), на неделе 1, неделе 4 (только тест на беременность), неделе 6, неделе 8, неделе 12 и неделе 28 в соответствии с графиком мероприятий (таблица 3). Все нежелательные явления, независимо от связи, будут собираться с момента согласия до EOS. Все серьезные нежелательные явления, нежелательные явления, представляющие особый интерес, и нежелательные явления, связанные с лечением, будут отслеживаться до разрешения или стабилизации.

Таблица 3
График событий клинического испытания

Тесты и оценки	Скрининг ^a	День 0		День 1 (+1 д.)	Неделя 1 (± 3 д.)	Неделя 4 (± 5 д.)		Неделя 6 (± 5 д.)	Неделя 8 (± 5 д.)	Неделя 12 (± 5 д.)	Неделя 28 (± 5 д.)
		До	После			До	После				
Информированное согласие	X										
Критерии включения/исключения	X										
Медицинский анамнез	X	X									
Демографическая информация	X										
Сопутствующие лекарственные препараты	X	X			X	X		X	X	X	X
Физическое обследование ^b	X	X			X	X		X	X	X	X
Основные показатели жизнедеятельности	X	X			X	X		X	X	X	X
Рост и вес	X										
СВС с лейкоцитарной формулой	X				X			X	X	X	X
Биохимический анализ ^c	X				X			X	X	X	X
Серологический анализ ^d	X										
ЭКГ в 12 отведениях	X										
Клинический анализ мочи ^e	X				X			X	X	X	X
Тест на беременность ^f	X	X				X					
INO-4800+EP ^g		X ^h				X ^h					
Загрузить данные EP ⁱ			X				X				
Нежелательные явления ^j	X	X	X	X ^k	X	X	X	X	X	X	X
Иммунологический анализ (лейкоциты) ^l	X	X				X		X	X	X	X
Иммунологический анализ (сыворотка крови) ^m	X	X				X		X	X	X	X

Скрининговая оценка проводится от -30 дней до -1 дня до дня 0.

Полное медицинское обследование только при скрининге и на неделе 28 (или при любом другом визите прекращения исследования). Целевой медицинский осмотр во время всех других визитов.

Включает Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, глюкозу, BUN и Cr.

Антитело к HIV или экспресс-тест, HBsAg, антитело к HCV.

Индикаторная полоска для определения глюкозы, белка и гематурии. Если индикаторная полоска не соответствует норме, необходимо провести микроскопическое исследование.

Тест сыворотки крови на беременность при скрининге. Анализ мочи на беременность во время других визитов.

Все дозы доставляли посредством внутривенной инъекции с последующей EP.

Для исследуемой группы 1 одна инъекция в кожу, предпочтительно над дельтовидной мышцей, в день 0 и на неделе 4. Для исследуемой группы 2 две инъекции в кожу, каждая из которых в разные дельтовидные или латеральные четырехглавые мышцы; предпочтительно над дельтовидными мышцами, в день 0 и на неделе 4.

После введения INO-4800 данные EP будут загружены с устройства CELLECTRA® 2000 и предоставлены Inovio.

Включает АЕ с момента согласия и все реакции в месте инъекции, которые квалифицируются как АЕ.

Телефонный звонок при последующем наблюдении для сбора АЕ.

4×8,5 мл (34 мл) цельной крови в 10 мл пробирках с кислым цитратом и декстрозой (ACD, с желтой крышкой) на временную точку. Примечание: Соберите в общей сложности 68 мл цельной крови до введения 1-й дозы (скрининг и до введения дозы в день 0).

1×8 мл крови в 10 мл пробирке для сбора сыворотки крови с красной крышкой на временную точку. Примечание: Соберите четыре аликвоты сыворотки по 1 мл каждая (всего 4 мл) в каждой временной точке до введения 1-й дозы (скрининг и до введения дозы в день 0).

Оценка иммуногенности:

Образцы крови для иммунологического исследования будут собираться при скрининге, в день 0 (до введения дозы), на неделе 4 (до введения дозы), на неделе 6, неделе 8, неделе 12 и неделе 28. Определение анализа собранных образцов для иммунологических конечных точек будет определяться на постоянной основе на протяжении всего исследования.

Популяция клинического испытания:

Здоровые взрослые добровольцы в возрасте от 18 до 50 лет включительно.

Критерии включения:

Взрослые в возрасте от 18 до 50 лет включительно;

Оценен исследователем как здоровый на основании истории болезни, физического осмотра и показателей жизнедеятельности, проведенных при скрининге;

Способен и желает соблюдать все процедуры исследования.

Результаты скрининговых лабораторных исследований в пределах нормы или признаны исследова-

телем клинически незначимыми.

Отрицательные серологические тесты на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), антитела к гепатиту С и скрининг антител к вирусу иммунодефицита человека (HIV).

Электрокардиограмма (ЭКГ) при скрининге, которая, по мнению исследователя, не имеет клинически значимых результатов (например, синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта).

Использование эффективных с медицинской точки зрения контрацептивов с частотой неудач <1% в год при последовательном и правильном использовании с момента скрининга до 3 месяцев после введения последней дозы, в постменопаузе, при хирургической стерильности или при наличии стерильного партнера.

Критерии исключения:

Беременные или кормящие грудью, или намеревающиеся забеременеть или иметь детей в течение прогнозируемой продолжительности исследования, начиная с визита скрининга и до 3 месяцев после введения последней дозы.

В настоящее время участвует или участвовал в исследовании с использованием исследуемого препарата в течение 30 дней, предшествующих дню 0.

Предыдущий контакт с SARS-CoV-2 (лабораторное тестирование по усмотрению исследователя) или получение исследуемого вакцинного продукта для профилактики COVID-19, MERS или SARS;

Текущие или история следующих заболеваний: заболевания дыхательной системы (например, астма, хроническая обструктивная болезнь легких);

Артериальная гипертензия, систолическое артериальное давление в положении сидя >150 мм рт.ст. или диастолическое артериальное давление >95 мм рт.ст.;

Злокачественность в течение 5 лет после скрининга;

Сердечно-сосудистые заболевания (например, инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, кардиомиопатия или клинически значимые аритмии);

Иммуносупрессия в результате основного заболевания или лечения, включая:

Первичные иммунодефициты;

Длительное применение (≥ 7 дней) пероральных или парентеральных глюкокортикоидов.

Текущее или предполагаемое использование доз, модифицирующих заболевание, противоревматических препаратов и биологических препаратов, модифицирующих заболевание;

история трансплантации твердых органов или костного мозга;

в анамнезе другое клинически значимое иммуносупрессивное или клинически диагностированное аутоиммунное заболевание.

Доступно менее двух приемлемых мест для ID инъекции и EP с учетом дельтовидной и переднелатеральной четырехглавой мышц.

Любые результаты медицинского осмотра и/или история любого заболевания, которые, по мнению исследователя, могут исказить результаты исследования или создать дополнительный риск для пациента в связи с их участием в исследовании.

Лечение в ходе клинического испытания: Лекарственный препарат INO-4800 содержит 10 мг/мл ДНК-плазмиды rGX9501 в буфере 1X SSC (150 мМ хлорида натрия и 15 мМ цитрата натрия). Объем 0,4 мл будет помещен в 2-мл стеклянные флаконы, снабженные резиновыми пробками и герметичными алюминиевыми колпачками. INO-4800 хранят при температуре 2-8°C.

Исследуемой группе 1 вводят одну внутривенную (IV) инъекцию в дозе 1,0 миллиграмм (мг) INO-4800 с последующей электропорацией (EP) с использованием устройства CELLECTRA® 2000 во время визита для введения дозы в день 0 и на неделе 4. Исследуемой группе 2 вводят две ID инъекции в дозе 1,0 мг (всего 2,0 мг во время визита для введения дозы) (в приемлемое место на двух разных конечностях) INO-4800 с последующей EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 в день 0 и на неделе 4.

Оценки иммуногенности периферической крови.

Получают образцы цельной крови и сыворотки крови. Образцы крови и сыворотки крови для иммунологического исследования берутся при скрининге и во время визитов, указанных в графике мероприятий (табл. 2). Для проведения всех иммунологических тестов требуются образцы как для скрининга, так и для иммунологического исследования в день 0. Т- и В-клеточные иммунные ответы на INO-4800 измеряют с помощью анализов, которые могут включать без ограничения ELISA, нейтрализацию, оценку экспрессии иммунологических генов, оценку экспрессии иммунологических белков, проточную цитометрию и ELISPOT. Анализ связывания ELISA представляет собой стандартный ELISA на основе планшетов с использованием 96-луночных планшетов для ELISA.

Планшеты покрывают спайковым белком SARS-CoV-2 и блокируют. После блокировки сыворотки крови вакцинированных субъектов серийно разводят и инкубируют на планшете. Вторичное антитело, способное связывать IgG человека, используется для оценки уровня вакциносpezifических антител в сыворотке крови. Т-клеточный ответ оценивают с помощью анализа ELISPOT IFN-гамма.

PBMC, выделенные от добровольцев, инкубируют с пептидными фрагментами спайкового белка

SARS-CoV-2. Клетки и пептиды помещают в планшеты MabTech, покрытые антителом, которое улавливает IFN-гамма. Через 24 часа после стимуляции клетки вымывают и добавляют вторичное антитело, которое связывает IFN-гамма. Каждая специфическая для вакцины клетка создает пятно, которое можно подсчитать для определения уровня индуцированного клеточного ответа. Кроме того, во время исследования также можно оценить гуморальные реакции на нуклеокапсидный белок (NP) SARS-CoV-2 для исключения потенциальной инфекции SARS-CoV-2 дикого типа после лечения INO-4800. Определение анализа собранных образцов для иммунологических конечных точек определяют на постоянной основе на протяжении всего исследования.

Основной показатель исхода:

1. Процент участников с нежелательными явлениями (AE) [временные рамки: с исходного уровня до недели 28].

2. Процент пациентов с реакциями в месте введения (инъекции) [временные рамки: с дня 0 до недели 28].

3. Частота нежелательных явлений, представляющих особый интерес (AESI) [временные рамки: с исходного уровня до недели 28].

4. Изменение титров антигенспецифических связывающих антител по сравнению с исходным уровнем [временные рамки: от исходного уровня до недели 28] Считается, что субъект имеет положительный гуморальный ответ, если оптическая плотность после вакцинации на 2,0 SD выше, чем оптическая плотность в день 0, и выше специфического порогового значения ELISA.

5. Изменение антигенспецифического гамма-интерферона (IFN- γ) клеточного иммунного ответа по сравнению с исходным уровнем [временные рамки: от исходного уровня до недели 28] Считается, что субъект имеет положительный клеточный ответ, если количество продуцирующих IFN-гамма клеток (пятен) после вакцинации на 2,0 SD выше, чем количество пятен в день 0 и выше LOD анализа.

Безопасность INO-4800 измеряют и оценивают в соответствии с "Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials", выпущенной в сентябре 2007 г. (Приложение А). Побочное явление, представляющее особый интерес (AESI) (серьезное или не-серьезное), представляет собой явление, имеющее научное или медицинское значение, характерное для препарата или программы. AESI включают перечисленные в табл. 4.

Таблица 4

Система тела	AESI
Дыхательная	Острый респираторный дистресс-синдром (ARDS)
	Пневмонит/Пневмония
Нервная	Генерализованная судорога
	Асептический менингит
	Синдром Гийена-Барре (GBS)
	Энцефалит/миелит
	Острый рассеянный энцефаломиелит (ADEM)
	Васкулопатия ЦНС (инсульт)
Кровеносная	Тромбоцитопения
	Диссеминированное внутрисудистое свертывание крови (DIC)
Иммунная	Анафилаксия
	Васкулиты
	Усиление заболевания после иммунизации
Другие	Местные/системные SAE
	Острое сердечное поражение
	Острое повреждение почек
	Синдром септического шока

Дозолимитирующая токсичность (DLT)

Для целей данного клинического испытания представлены следующие дозолимитирующие виды токсичности.

Местная эритема, отек и/или уплотнение в месте инъекции 3 степени или выше наблюдаются через ≥ 1 день после введения INO-4800 (см. табл. 5);

Боль или болезненность в месте инъекции, требующая госпитализации, несмотря на корректное применение ненаркотических анальгетиков;

Побочное явление 4 степени или выше, не связанное с инъекцией, оцениваемое PI как связанное с введением INO-4800;

Клинически значимые лабораторные аномалии 4 степени или выше, оцененные PI как связанные с введением INO-4800.

Таблица 5
Шкала оценки реакций в месте инъекции

Местная реакция на инъекционный препарат (степень)	Слабая (1)	Умеренная (2)	Тяжелая (3)	Потенциально опасно для жизни (4)
Боль	Не нарушает активность	Повторное использование ненаркотического обезболивающего в течение > 24 часов или нарушает активность	Любое использование наркотических болеутоляющих средств или ограничение повседневной активности	Визит отделения неотложной помощи или госпитализация
Болезненность	Легкий дискомфорт при прикосновении	Дискомфорт при движении	Значительный дискомфорт в покое	Визит ER или госпитализация
Эритема/покраснение ^a	2,5-5 см	5,1-10 см	> 10 см	Некроз или эксфолиативный дерматит
Уплотнение/отек ^b	2,5-5 см и отсутствие нарушения активности	5,1-10 см или нарушение активности	>10 см или препятствует повседневной активности	Некроз

Сентябрь 2007 г. "FDA Guidance for Industry-Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials".

^a В дополнение к оценке измеренной местной реакции при наибольшем отдельном диаметре измерение должно быть записано как непрерывная переменная.

^b Должны быть оценены и классифицированы с использованием функциональной шкалы, а также фактического измерения.

Популяции для анализа

Популяции для анализа представляют собой.

Модифицированная популяция начавших лечение пациентов (mITT) включает всех субъектов, которые получают по меньшей мере одну дозу INO-4800. Субъекты в этой выборке анализируются по назначенной им группе введения дозы INO-4800. Популяцию mITT используют для анализа совместных первичных и исследовательских иммунологических конечных точек.

Популяция пациентов без нарушения протокола (PP) состоит из субъектов mITT, которые получают все свои запланированные введения и у которых нет важных нарушений протокола, оцененных медицинским монитором. Считается, что анализы популяции PP подтверждают соответствующие анализы mITT.

Популяция для анализа безопасности включает всех субъектов, которые получают по меньшей мере одну дозу INO 4800, вводимую с помощью ID инъекции. Субъекты этой популяции сгруппированы в соответствии с дозой INO-4800, которую они получили. Эта популяция используется для всех анализов безопасности в исследовании.

Первичный анализ безопасности

Основными анализами для этого испытания являются анализы безопасности нежелательных явлений, возникающих при лечении (TEAE), реакций в месте введения и клинически значимых изменений лабораторных параметров безопасности по сравнению с исходным уровнем.

TEAE для данного испытания определяются как любые нежелательные явления, нежелательные явления, представляющие особый интерес, или серьезные нежелательные явления, которые возникают в день 0 или после него после IP введения. Все TEAE будут суммированы по частоте, проценту и соответствующему 95% доверительному интервалу Клоппера-Пирсона. Частоты также представлены отдельно по количеству дозы и изображены по классу системы и предпочтительному термину. Дополнительные частоты представлены в отношении максимальной серьезности и отношения к IP. Множественные проявления одного и того же АЕ у одного и того же субъекта учитываются только один раз в соответствии с подходом наихудшего случая в отношении серьезности и связи с IP. Все серьезные TEAE суммируются, как указано выше. Продолжительность АЕ рассчитывается как дата окончания АЕ - дата начала АЕ+1 день. АЕ и SAE, которые не являются TEAE или серьезными TEAE, представлены в перечнях.

Все эти первичные анализы безопасности проводят на субъектах из популяции для анализа безо-

пасности.

Первичные анализы иммуногенности

В зависимости от исследуемой группы анализируют титры антител, специфично связывающих антигенспецифический спайковой гликопротеин SARS-CoV-2, и специфические клеточные иммунные ответы в рамках возрастных групп. Титр связывающих антител анализируют для каждой исследуемой группы с использованием среднего геометрического и соответствующих 95% доверительных интервалов. Увеличение антигенспецифического клеточного иммунного ответа анализируют для каждой исследуемой группы с использованием медианы, межквартильного диапазона и 95% доверительных интервалов. Изменение по сравнению с исходным уровнем как титра связывающих антител, так и увеличения антигенспецифического клеточного ответа анализируют с использованием среднего геометрического кратного роста и 95% доверительных интервалов.

Титры связывающих антител анализируют между каждой парой исследуемых групп в возрастных группах с использованием отношения среднего геометрического и соответствующих 95% доверительных интервалов. Антигенспецифические клеточные иммунные ответы анализируют между каждой парой исследуемых групп в пределах возрастных групп с использованием медианных различий и соответствующих 95% доверительных интервалов. Все эти первичные анализы иммуногенности проводят на субъектах в популяциях mITT и PP.

Исследовательские анализы

В зависимости от исследуемой группы будут описательно анализировать число Т- и В-клеток после исходного уровня со средними значениями/медианами и соответствующими 95% доверительными интервалами. Процент нейтрализующих антител будет проанализирован для каждой исследуемой группы с использованием медианы, межквартильного диапазона и 95% доверительных интервалов.

Безопасность и иммуногенность необязательной бустерной дозы INO-4800 после предшествующей двухдозовой схемы будут проанализированы, как описано ниже. Титр живых нейтрализующих реципрокных антител и титр псевдонейтрализующих реципрокных антител будет проанализирован для каждой исследуемой группы в пределах возрастных групп с использованием среднего геометрического и соответствующих 95% доверительных интервалов. Кратность увеличения по сравнению с исходным уровнем будет приведена в таблицу для каждого иммуногенного биомаркера. Если имеется достаточно данных для анализа, будет проведено предварительное сравнение групповых иммуногенных факторов между субъектами, выбравшими только 2 введения, и субъектами, выбравшими 2 введения плюс бустерное введение.

Дополнительное изучение влияния возраста и других потенциальных искажающих факторов на взаимосвязь между иммунными биомаркерами и дозой INO-4800 может включать использование моделей ANCOVA и/или логистической регрессии.

Предварительные основные результаты исследования

Все 8 зарегистрированных нежелательных явлений относились к 1 степени; 5 в связи с местными реакциями в месте инъекции. О серьезных нежелательных явлениях, нежелательных явлениях, представляющих особый интерес, или дозолимитирующих видах токсичности, не сообщалось.

Предварительный анализ ELISA связывания показал, что 7/9 (78%) субъектов имели положительный ответ антител. Респондеры имели четырехкратное увеличение титра.

На шестой неделе проводили множественные иммунологические анализы, в том числе анализы гуморального и клеточного иммунного ответа, для когорты с введением дозы 1,0 мг и 2,0 мг после двух доз. Анализы в данной временной точке показали, что 94% (34 из 36 участников исследования) продемонстрировали общий уровень иммунологического ответа на основе предварительных данных оценки гуморального (связывания и нейтрализации) и Т-клеточного иммунного ответа. Один участник в группе с введением дозы 1 мг и два участника в когорте с введением дозы 2 мг были исключены из иммунного анализа, поскольку при включении в исследование они давали положительный результат на иммунный ответ на COVID-19, что указывает на предшествующую инфекцию.

Один участник когорты с введением дозы 2 мг прекратил исследование по причинам, не связанным с безопасностью или переносимостью.

В течение восьмой недели INO-4800 была в целом безопасной и хорошо переносимой всеми участниками обеих когорт. Все десять зарегистрированных нежелательных явлений (AE) относились к степени тяжести 1, большинство из которых представляло собой покраснение в месте инъекции. Сообщения о серьезных нежелательных явлениях (SAE) отсутствовали.

Результаты начальной фазы I

Демографическая характеристика исследуемой популяции.

Всего обследовали 55 участников, и 40 участников включали в первые две группы (фиг. 16). Средний возраст составлял 34,5 года (от 18 до 50 лет). Среди участников было 55% мужчин (табл. 6). Большинство участников были белыми (82,5%).

Таблица 6

Переменная	Статистический показатель	Группа 1, 1 мг (N=20)	Группа 2, 2 мг (N=20)	Всего (N=40)
Пол				
Мужчины	n (%)	11 (55,0)	11 (55,0)	22 (55,0)
Женщины	n (%)	9 (45,0)	9 (45,0)	18 (45,0)
Раса				
Белые	n (%)	18 (90,0)	15 (75,0)	33 (82,5)
Чернокожие или афро-американцы	n (%)	1 (5,0)	1 (5,0)	2 (5,0)
Азиаты	n (%)	1 (5,0)	4 (20,0)	5 (12,5)
Этническая принадлежность				
Испанцы или латино-американцы	n (%)	0	0	0
Не испанцы или латино-американцы	n (%)	20 (100,0)	20 (100,0)	40 (100,0)
Возраст (годы)	n	20	20	40
	Среднее значение (SD)	35,0 (10,69)	35,6 (9,18)	35,3 (9,84)
	Медиана	33,0	38,0	34,5
	Мин., макс.	18, 50	19, 50	18, 50
Рост на исходном уровне (см)	n	20	19	39
	Среднее значение (SD)	172,59 (10,853)	172,16 (8,631)	172,38 (9,707)
	Медиана	169,75	170,10	170,10
	Мин., макс.	155,9, 195,6	158,0, 188,0	155,9, 195,6
Вес на исходном уровне (кг)	n	20	19	39
	Среднее значение (SD)	74,13 (14,701)	71,35 (12,611)	72,77 (13,615)
	Медиана	70,45	69,00	69,60
	Мин., макс.	58,5, 110,0	55,0, 92,5	55,0, 110,0

Вакцину вводили в виде внутривенных инъекций в дозе 0,1 мл с последующей ЕР в месте вакцинации. ЕР выполняли с помощью CELLECTRA® 2000 четырьмя импульсами по 52 мс при 0,2 А (от 40 до 200 В, в зависимости от сопротивления ткани) за введение. Первые два импульса разделяли интервалом 0,2 секунды, после чего следовала 3-секундная пауза перед последними двумя импульсами, которые также разделяли интервалом 0,2 секунды. Группы введения дозы включали последовательно с безопасным вхождением для каждой. Участники проходили и будут оцениваться клинически и в отношении предмет безопасности в день 1 и на неделях 1, 4 (доза 2), 6, 8, 12, 28, 40 и 52. Лабораторные исследования безопасности (общий анализ крови, комплексная метаболическая панель и анализ мочи) проводились и будут проводиться во время всех последующих визитов, кроме дня 0, дня 1 и недели 4. Иммунологические образцы получали во все временные точки после введения дозы 1, кроме дня 1 и недели 1. Местные и системные АЕ, независимо от связи с вакциной, регистрировались и оценивались исследователем. АЕ оценивались в соответствии со шкалой оценки токсичности для здоровых взрослых и подростково-добровольцев, участвующих в клинических испытаниях профилактических вакцин, которые были выпущены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в сентябре 2007 года.

Безопасность и переносимость вакцины.

39 (97,5%) завершили введение обеих доз, и 1 субъект в группе введения дозы 2,0 мг прекратил участие в исследовании до получения второй дозы из-за отсутствия транспортировки в клинические центры, не связанного с исследованием или введением дозы. Все 39 оставшихся субъектов завершили визит через 8 недель после введения дозы 1. В общей сложности зарегистрировали 11 местных и системных АЕ

через 8 недель после введения 1-й дозы, шесть из них были сочтены связанными с вакциной. Все АЕ были легкими или 1 степени тяжести. Наиболее частыми нежелательными явлениями были реакции в месте инъекции, включая боль в месте инъекции (3) и эритему (2). Одним системным АЕ, связанным с вакциной, была тошнота. Лихорадочные реакции отсутствовали. Ни один субъект не прекратил исследование в связи с АЕ. Серьезных нежелательных явлений (SAE) или AESI не отмечали. В течение начального 8-недельного периода наблюдения аномальные лабораторные показатели, вызывающие клиническое беспокойство, отсутствовали. Отсутствовало увеличение числа участников, которые испытали АЕ, связанные с вакциной, в группе введения дозы 2,0 мг (10% субъектов) по сравнению с группой введения дозы 1,0 мг (15% субъектов). Кроме того, отсутствовало увеличение частоты нежелательных явлений со второй дозой по сравнению с первой дозой в обеих группах уровня дозы. Таким образом, данные по безопасности фазы 1 INO-4800 позволяют предположить, что вакцина, вероятно, является безопасной бустерной дозой, поскольку после второго введения вакцины частота побочных эффектов не увеличилась по сравнению с первой дозой.

Иммуногенность: в анализ иммуногенности включали тридцать восемь субъектов. В дополнение к одному субъекту в группе 2,0 мг, который прекратил прием до завершения введения дозы, один субъект в группе введения дозы 1,0 мг был признан серопозитивным на исходном уровне и был исключен.

Гуморальные иммунные ответы: образцы сыворотки крови использовали для измерения титров нейтрализующих антител против изолята SARS-CoV-2/Australia/ VIC01/2020 и связывающих антител к RBD и цельному спайковому белку S1+S2.

Иммуноферментный анализ S1+S2 (ELISA): стандартный ELISA связывания использовали для обнаружения сывороточных связывающих антител к SARS-CoV-2. Планшеты для ELISA покрывали рекомбинантным спайковым белком S1+S2 SARS-CoV-2 (Sino Biological), инкубировали в течение ночи и блокировали. Образцы серийно разводили и инкубировали на заблокированных планшетах для анализа в течение одного часа. Величину реакции анализа выражали в виде титров, которые определяли как наибольшее серийное разведение, при котором оптическая плотность на 3 SD выше исходного уровня в день 0. 68% участников в группе 1,0 мг и 70% участников в группе 2,0 мг имели по меньшей мере увеличение титров связывания IgG в сыворотке крови со спайковым белком S1+S2 по сравнению с временной точкой до вакцинации (день 0), с GMT респондера 320,0 (95% CI: 160,5, 638,1) и 508,0 (95% CI: 243,6, 1059,4) в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно (фиг. 17C). На фиг. 17D гуморальный ответ в группе введения дозы 1,0 мг и группе введения дозы 2,0 мг оценивали по способности связывать цельный спайковый белок (S1 и S2) (n=19, 1,0 мг; n=19, 2,0 мг). Конечные титры рассчитывали в виде титра, демонстрирующего OD 3,0 SD выше исходного уровня, титры на исходном уровне принимали за 1. Реакцией на нейтрализацию живого вируса была IC50 PRNT ≥ 10 . На всех графиках горизонтальные линии представляют медиану, а столбцы представляют межквартильный диапазон.

Сыворотки крови также тестировали в отношении способности нейтрализовать живой вирус в анализах нейтрализации вируса дикого типа SARS-CoV-2. Анализы нейтрализации изолята SARS-CoV-2/Australia/ VIC01/2020 проводили в Public Health England (Портон-Даун, Великобритания). Титры нейтрализующих вирусов измеряли в образцах сыворотки крови, которые инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 мин. SARS-CoV-2 (изолят 44 Australia/VIC01/2020) разводили до концентрации 933 pfu мл⁻¹ и смешивали в пропорции 50:50 с 1% FCS/MEM, содержащим 25 mM буфера HEPES, с удвоенными разведениями сыворотки крови.

После 5 дней инкубации при 37°C во влажном боксе планшеты фиксировали, окрашивали и подсчитывали бляшки. Титр вируса определяли, используя стандартную дозу инфекции 50% культуры ткани (TCID50). После второй вакцинации на неделе 6 средний геометрический титр (GMT) респондеров по анализу нейтрализации живого вируса PRNT IC50 составлял 82,4 и 63,5 в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. Процент респондеров (после вакцинации PRNT IC50 ≥ 10) составлял 83% и 84% в группах 1,0 мг и 2,0 мг соответственно (фиг. 17A и табл. 7).

Таблица 7

Таблица 7. Нейтрализация живых SARS-CoV-2		
	1,0 мг N=18*	2,0 мг N=19
Всего	44,4 (14,6, 134,8)	34,9 (15,8, 77,2)
Неделя 6, диапазон реципрокного титра GMT (95% CI)	1, 11647	1, 652
Респондеры** n (%)	15 (83%)	16 (84%)
Неделя 6, диапазон реципрокного титра	82,4 (29,1, 233,3)	63,5 (39,6, 101,8)
GMT (95% CI)	4, 11647	13, 652

* За исключением одного субъекта с исходным положительным результатом NP ELISA.

** Неделя 6, PRNT IC₅₀ ≥ 10 или ≥ 4 , если наблюдается активность связывания ELISA.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) RBD: 96-луночные планшеты MaxiSorp (ThermoFisher, 439454) покрывали 50 мкл/луночка 1 мкг/мл RBD SARS-CoV-2 (SinoBiological, 40592-V08H), белком, разведенным в PBS, и инкубировали при 4°C в течение ночи.

Планшеты промывали 4 раза PBST (PBS с 0,05% Tween-20) и блокировали 200 мкл/луночка блокирующего буфера (PBS с 5% обезжиренного сухого молока и 0,1% Tween-20) при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывки PBST 50 мкл/луночка образца сыворотки крови, серийно разведенной в блокирующем буфере, добавляли в планшет в двух повторностях и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывки PBST добавляли 50 мкл/луночка конъюгированного с HRP детектирующего антитела к IgG человека (BD Pharmingen, 555788), разведенного в 500 раз блокирующим буфером, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания PBST добавляли 50 мкл/луночка 1-Step Ultra TMB (Thermo, 34028) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Добавляли 50 мкл/луночка 2M серной кислоты для остановки реакции изменения цвета, и измеряли оптическое поглощение при 450 и 570 нм на микропланшет-ридере Synergy 2 (Biotek). Титры конечной точки определяли как наибольшее серийное разведение, при котором значения OD450-570 превышали на 3 стандартных отклонения соответствующий сигнал дня 0. На неделе 6 GMT респондеров составляло 385,6 (95% CI: 69,0, 2154,9) и 222,1 (95% CI: 87,0, 566,8) в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно (фиг. 17B).

Общая сероконверсия (определяемая в виде тех участников, которые отвечают нейтрализующими или связывающими антителами к белку S или RBD) после введения 2 доз вакцины в группе введения дозы 1,0 мг и дозы 2,0 мг составляла 89% и 95% соответственно.

Клеточные ответы: мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образцов крови, замораживали и хранили в жидком азоте для последующего анализа.

ELISPOT спайкового белка SARS-CoV-2 с использованием INO-4800. Периферические мононуклеарные клетки (PBMC) выделяли до и после вакцинации. Клетки стимулировали *in vitro* пулом 15-мерных пептидов (перекрывающихся на 9 остатков), охватывающих последовательность полноразмерного консенсусного спайкового белка. Клетки инкубировали в течение ночи (18-22 ч, 37°C, 5% CO₂) с пулами пептидов (225 мкг/мл), только DMSO (0,5%, отрицательный контроль) или PMA и иономицином (положительный контроль). На следующий день клетки смывали и проявляли планшеты: Детекторное антитело биотинилируют, и добавляют после конъюгата стрептавидин-фермент. При использовании субстрата с осаждающим, а не растворимым продуктом конечным результатом являются видимые пятна. Каждое пятно соответствует отдельной цитокин-секретирующей клетке. После проявления планшетов пятна сканировали и количественно определяли с помощью микроанализатора CTL S6 (CTL) с программным обеспечением ImmunoCapture™ и ImmunoSpot™. Значения показаны как среднее значение измерений в трех повторностях за вычетом исходного уровня.

Процент респондеров на неделе 8 составил 74% в группе введения дозы 1,0 мг и 100% в группе введения дозы 2,0 мг (табл. 8). Медиана SFU на 10⁶ PBMC составляла 46 и 71 для респондеров в группах введения дозы 1,0 мг и дозы 2,0 мг соответственно. В каждой группе наблюдалось статистически значимое увеличение числа клеток, секретирующих интерферон-γ (SFU), полученных на миллион PBMC по сравнению с исходным уровнем (P=0,001 и P <0,0001 соответственно, ранговый критерий Уилкоксона с согласованными парами, апостериорный анализ), фиг. 18A. Интересно, что 5 нереспондеров в группе 1,0 мг согласно анализу ELISpot T-клеток показали значительную реактивность с помощью анализа нейтрализации живого вируса. Также интересно отметить, что 3 образца выздоравливающих, протестированные с помощью анализа ELISpot, показали более низкий T-клеточный ответ со средним значением 33, чем группа введения дозы 2,0 мг на неделе 8. INO-4800 вызывал сильный T-клеточный ответ, который был более частым и более высоким медианным ответом респондеров (45,6 против 71,1) в группе введения дозы 2,0 мг. T-клеточные ответы в группе введения дозы 2,0 мг сопоставляли с 5 пулами эпитопов, как показано на фиг. 18B. Интересно, что наблюдались T-клеточные ответы во всех областях спайкового белка.

Таблица 8
Иммунные ответы

Иммунный анализ	Когорта введения дозы 1,0 мг		Когорта введения дозы 2,0 мг	
	Выходное значение	Респондеры, ‡ n (%)	Выходное значение	Респондеры, ‡ n (%)
Нейтрализация Неделя 6, GMT Реципрокный титр [95% CI] (диапазон)	44,4 [14,6, 134,8] (1, 11647)	15/18 (83%)	34,9 [15,8, 77,2] (1, 652)	16/19 (84%)
Связывание RBD Антитело, неделя 6 GMT, реципрокный титр [95% CI] (диапазон)	27,3 [4,8, 156,8] (1, 15625)	10/18 (56%)	66,8 [17,4, 257,5] (1, 3125)	14/18 (78%)
связывание S1+S2 Антитело, неделя 6 GMT, реципрокный титр [95% CI] (диапазон)	174,4 [59,9, 507,3] (1, 2560)	17/19 (89%)	136,8 [34,5, 543,1] (1, 2560)	15/19 (79%)
IFN-гамма ELISpot, неделя 8 Медиана, SFU на [95% CI] (диапазон)	26,2 SFU [10-64] (1, 374,4)	14/19 (74%) ^μ	71 SFU [32-194] (8,9, 615,6)	19/19 (100%) ^μ

Из когорты 1,0 мг исключается один субъект с исходным титром ELISA 1280[‡] Критерии ответа: Нейтрализация - неделя 6 PRNT IC₅₀≥10 или ≥4, если наблюдается активность связывания ELISA. Связывание RBD - значение недели 6>1 ELISpot - значение ≥12 SFU в течение недели 0.

^μ - Респондеры, полученные с использованием данных недели 6 и недели 8 Анализ проточной цитометрии спайкового белка SARS-CoV-2 с использованием INO-4800: Вклад CD4+ и CD8+ Т-клеток в клеточный иммунный ответ против INO-4800 оценивали с помощью окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS). PBMC также использовали для анализа окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS) с использованием проточной цитометрии. Один миллион PMBC в 200 мкл полной среды RPMI стимулировали в течение шести часов (37°C, 5% CO₂) с помощью DMSO (отрицательный контроль), PMA и иономицина (положительный контроль, 100 нг/мл и 2 мкг/мл соответственно) или указанных пептидных пулов (225 мкг/мл). Через один час после стимуляции добавляли брефельдин А и монензин (BD GolgiStop и GolgiPlug, 0,001% и 0,0015% соответственно) для блокирования секреции экспрессируемых цитокинов. После стимуляции клетки переносили в течение ночи при 4°C. Затем клетки промывали в PBS для окрашивания живых/мертвых клеток (краситель Life Technologies Live/Dead aqua fixable для оценки жизнеспособности клеток, как описано ранее), а затем ресуспендировали в буфере FACS (0,5% BSA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES). Далее клетки окрашивали в отношении внеклеточных маркеров, фиксировали и пермеабелизировали, а затем окрашивали в отношении указанных цитокинов (табл. 9) для антител, ис-

пользуемых для проточной цитометрии.

Таблица 9
Панель проточной цитометрии

Пробирка	Канал	Маркер/цитокин
1	Неокрашенные	н.о.
2	BV510	Live/Dead Fix Aqua
3	BUV737	CD8
4	APC-Cy7	IL-2
5	BV650	CD45RA
6	APC	CD3
7	BV786	CD14/CD16/CD19
8	BV711	IFN-гамма
9	BV421	CCR7
10	PE-Cy7	IL-17
11	FITC	FITC
12	PE Dazzle (PE-CF594)	IL-4
13	PE	CD107a
14	PerCP-eFluor710 (PerCP-Cy5.5)	CD4

Количество CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN- α , TNF- α и/или IL-2 (любой ответ), было статистически значимо повышено после вакцинации в группе введения дозы 2,0 мг (фиг. 18С, P=0,0181, ранговый критерий Уилкоксона для сопоставимых пар, апостериорный анализ). CD4⁺Т-клетки, продуцирующие TNF- α , также были статистически значимо повышены в группе введения дозы 2,0 мг (фиг. 18С, P=0,0020, ранговый критерий Уилкоксона для сопоставимых пар, апостериорный анализ).

CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки исследовали после вакцинации. Почти половина (47%) CD8⁺Т-клеток в группе введения дозы 2,0 мг продуцировали IFN- α и TNF- α с двойной направленностью (фиг. 18Е). CD8⁺ Т-клетки, продуцирующие цитокин в группе введения дозы 1,0 мг, были преимущественно монофункциональными клетками, продуцирующими IFN- γ . Компартмент CD4⁺ Т-клеток был высокополифункциональным: 6% и 9% (в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно) продуцировали все 3 цитокина, IFN- γ , TNF- α и IL-2.

Композицию CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих любой цитокин (любой ответ, IFN- α , TNF- α или IL-2 после вакцинации), также оценивали в отношении наличия поверхностных маркеров CCR7 и CD45RA для характеристики эффекторных клеток (CCR7-CD45RA⁺), клеток эффекторной памяти (CCR7-CD45RA⁻) и клеток центральной памяти (CCR7+CD45RA⁻) (фиг. 18D). В обеих группах доз CD8⁺Т-клетки, вырабатывающие цитокин в ответ на стимуляцию спайковыми пептидами, были сбалансированы в трех популяциях, тогда как CD4⁺ Т-клетки имели преимущественно фенотип центральной памяти (фиг. 18D).

Ответы Th2 также измеряли путем оценки продуцирования IL-4, и не наблюдалось статистически значимого повышения (ранговый критерий Уилкоксона для сопоставимых пар, апостериорный анализ) ни в одной из групп после вакцинации (фиг. 18F).

В фазе 1 этого испытания вакцинация INO-4800 приводила к сильным Т-клеточным ответам с повышенным фенотипом Th1, продемонстрированным как с помощью IFN- α ELISpot, так и с помощью многопараметрической проточной цитометрии, о чем свидетельствует повышенная экспрессия цитокинов Th1-типа IFN- γ , TNF- α и IL-2 (фиг. 18С). Оценка полифункциональности Т-клеток, индуцированных INO-4800, позволила предположить, что наличие специфических для SARS-CoV-2 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, проявляющих признаки состояния памяти, предполагает установление устойчивого клеточного ответа (фиг. 18D). Важно отметить, что это было достигнуто при минимизации индукции IL-4, прототипа цитокина Th2 (фиг. 18F).

Фаза 1, обновленный вариант

Разрабатывали как открытое многоцентровое исследование фазы 1 (NCT04336410) для оценки безопасности, переносимости и иммуногенности INO-4800, вводимого внутривенно (IV) с последующей электропорацией с использованием устройства CELLECTRA 2000.

Здоровые участники в возрасте от 18 до 50 лет без известной истории заболевания COVID-19 получали дозу INO-4800 1,0 или 2,0 мг в схеме введения 2 доз (недели 0 и 4).

ДНК-вакцина INO-4800. Вакцину получали в соответствии с действующей надлежащей производственной практикой. INO-4800 содержит плазмиду рGX9501, экспрессирующую синтетическую оптимизированную последовательность полноразмерного спайкового гликопротеина SARS-CoV-2, которую оптимизировали, как описано ранее, в концентрации 10 мг/мл в солевом буфере на основе цитрата натрия. Конечные точки. Конечные точки безопасности включали системные и местные реакции в месте введения в течение 8 недель после введения дозы 1. Иммунологические конечные точки включают титры антигенспецифических связывающих антител, титры нейтрализации и антигенспецифический клеточный

иммунный ответ на интерферон-гамма (IFN-g) после введения 2 доз вакцины. Для нейтрализации живого вируса респондер определяется как неделя 6 PRNT IC₅₀>10 или >4, если субъект является респондером в ELISA. Для ELISA S1+S2 респондер определяется как значение на неделе 6 >1. Для анализа ELISpot респондер определяется как значение на неделе 6 или неделе 8, которое составляет >12 пятнообразующих единиц на 10⁶ РВМС после недели 0.

Процедуры исследования.

Сорок участников включали в две группы; 20 участников в каждой из групп введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг, которые получали свои дозы на неделе 0 и 4. Вакцину вводили в виде внутривенных инъекций по 0,1 мл в руку с последующей ЕР в месте вакцинации. Субъекты в группе введения дозы 1,0 мг получали одну инъекцию при каждом визите введения дозы. Вторую дозу вакцины можно было вводить в ту же руку или в другую руку по сравнению с первой дозой. Субъекты в группе введения дозы 2,0 мг получали по одной инъекции в каждую руку при каждом визите введения дозы. ЕР выполняли с использованием CELLECTRA® 2000, как описано ранее. Устройство выдает всего четыре электрических импульса длительностью 52 мс каждый при силе тока 0,2 А и напряжении 40-200 В на импульс. Группы введения дозы включали последовательно с безопасным вхождением дозы для каждой. Группа введения дозы 1,0 мг включала одного участника в день в течение 3 дней. Независимый совет по мониторингу безопасности данных (DSMB) рассмотрел данные о безопасности недели 1 и на основании положительной оценки безопасности дал рекомендацию завершить включение дополнительных 17 участников в этой группе дозы. Аналогичным образом впоследствии включали группу введения дозы 2,0 мг. Участников оценивали в отношении безопасности и сопутствующих лекарственных препаратов во все временные точки, включая скрининг, неделю 0 (доза 1), телефонный звонок на следующий день после введения дозы, неделю 1, 4 (доза 2), 6, 8, 12, 28, 40 и 52 после введения дозы 1. Местные и системные АЕ, независимо от связи с вакциной, регистрировались и оценивались исследователем. Лабораторные тесты в отношении безопасности (общий анализ крови, комплексная метаболическая панель и клинический анализ мочи) проводили и будут проводить при скрининге, через 1, 6, 8, 12, 28 и 52 недели после введения дозы 1. Иммунологические образцы получали во все временные точки после введения дозы 1, кроме дня 1 и недели 1. АЕ оценивались в соответствии со шкалой оценки токсичности для здоровых взрослых и подростков-добровольцев, участвующих в клинических испытаниях профилактических вакцин, которые были выпущены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в сентябре 2007 года. DSMB рассмотрел лабораторные данные и данные о нежелательных явлениях для участников до 8 недель, включенных в этот отчет. В протоколе указывали правила безопасного прекращения приема препарата и нежелательные явления, представляющие особый интерес (АЕСИ). Для целей настоящего отчета представлены клинические и лабораторные оценки безопасности в течение 8 недель после введения первой дозы.

Приемлемость протокола. Подходящие участники должны соответствовать следующим критериям: здоровые взрослые в возрасте от 18 до 50 лет; способен и желает соблюдать все процедуры обучения; индекс массы тела 18-30 кг/м² при скрининге; отрицательные серологические тесты на поверхностный антиген гепатита В, антитела к гепатиту С и антитела к вирусу иммунодефицита человека; электрокардиограмма (ЭКГ) при скрининге, которая, по мнению исследователя, не имеет клинически значимых результатов; использование эффективных с медицинской точки зрения средств контрацепции с частотой неудач <1% в год при постоянном использовании, наличие в постменопаузе, хирургически стерильным или имеет бесплодного партнера. Ключевые критерии исключения включали следующее: лица, занимающие текущую должность с высоким риском заражения SARS-CoV-2; известное ранее воздействие SARS-CoV-2 или получение исследуемого препарата для предупреждения или лечения COVID-19; аутоиммунный или иммуносупрессивный в результате основного заболевания или лечения; гиперчувствительность или тяжелые аллергические реакции на вакцины или лекарственные средства; медицинские состояния, которые повышают риск тяжелого течения COVID-19; сообщение о курении, вейпинге или злоупотреблении активными наркотиками, алкоголем или психоактивными веществами или зависимости; и менее двух приемлемых мест, доступных для внутривенной инъекции и электропорации.

Популяция клинического испытания:

Здоровые взрослые добровольцы в возрасте от 18 до 50 лет включительно.

Критерии включения:

Взрослые в возрасте от 18 до 50 лет включительно;

Оценен исследователем как здоровый на основании истории болезни, физического осмотра и показателей жизнедеятельности, проведенных при скрининге;

Способен и желает соблюдать все процедуры исследования;

Результаты скрининговых лабораторных исследований в пределах нормы или признаны исследователем клинически незначимыми;

Отрицательные серологические тесты на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), антитела к гепатиту С и скрининг антител к вирусу иммунодефицита человека (HIV);

Электрокардиограмма (ЭКГ) при скрининге, которая, по мнению исследователя, не имеет клинически значимых результатов (например, синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта).

Использование эффективных с медицинской точки зрения контрацептивов с частотой неудач <1% в год при последовательном и правильном использовании с момента скрининга до 3 месяцев после введения последней дозы, в постменопаузе, при хирургической стерильности или при наличии стерильного партнера.

Критерии исключения:

Беременные или кормящие грудью, или намеревающиеся забеременеть или иметь детей в течение прогнозируемой продолжительности исследования, начиная с визита скрининга и до 3 месяцев после введения последней дозы.

В настоящее время участвует или участвовал в исследовании с использованием исследуемого препарата в течение 30 дней, предшествующих дню 0.

Предыдущий контакт с SARS-CoV-2 (лабораторное тестирование по усмотрению исследователя) или получение исследуемого вакцинного продукта для профилактики COVID-19, MERS или SARS.

Текущие или история следующих заболеваний:

Заболевания дыхательной системы (например, астма, хроническая обструктивная болезнь легких);

Артериальная гипертензия, систолическое артериальное давление в положении сидя >150 мм рт.ст. или диастолическое артериальное давление >95 мм рт.ст.;

Злокачественность в течение 5 лет после скрининга;

Сердечно-сосудистые заболевания (например, инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, кардиомиопатия или клинически значимые аритмии);

Иммуносупрессия в результате основного заболевания или лечения, включая:

Первичные иммунодефициты;

Длительное применение (≥ 7 дней) пероральных или парентеральных глюкокортикоидов;

Текущее или предполагаемое использование доз, модифицирующих заболевание, противоревматических препаратов и биологических препаратов, модифицирующих заболевание;

История трансплантации твердых органов или костного мозга;

В анамнезе другое клинически значимое иммуносупрессивное или клинически диагностированное аутоиммунное заболевание;

Доступно менее двух приемлемых мест для ID инъекции и EP с учетом дельтовидной и переднелатеральной четырехглавой мышц;

Любые результаты медицинского осмотра и/или история любого заболевания, которые, по мнению исследователя, могут исказить результаты исследования или создать дополнительный риск для пациента в связи с их участием в исследовании.

Способы оценки иммуногенности.

Образцы, собранные при скрининге, на неделе 0 (до введения дозы) и на неделе 6 и 8, анализировали. Мононуклеарные клетки периферической крови (ПВМК) выделяли из образцов крови путем стандартного применения Фиколл-Гипак с последующим центрифугированием. Выделенные клетки замораживали в 10% DMSO и 90% эмбриональной телячьей сыворотке. Замороженные ПВМК хранили в жидком азоте для последующего анализа. Образцы сыворотки крови хранили при -80°C до использования для измерения титров связывающих и нейтрализующих антител.

Анализы нейтрализации вируса дикого типа SARS-CoV-2.

Анализы нейтрализации изолята SARS-CoV-2/Australia/ VIC01/2020 проводили в Public Health England (Портон-Даун, Великобритания). Титры нейтрализующих вирусов измеряли в образцах сыворотки крови, которые инактивировали нагреванием при 56°C в течение 30 мин. SARS-CoV-2 (изолят 44 Australia/VIC01/2020) разводили до концентрации 933 pfu/мл и смешивали в пропорции 50:50 с 1% FCS/MEM, содержащим 25 мМ буфера HEPES, с удвоенными разведениями сыворотки крови.

После 1 ч инкубации при 37°C смесь вирус-антитело переносили на конфлюэнтные монослои клеток Vero E6 (ECACC 85020206; PHE, Великобритания). Вирусу давали адсорбироваться на клетках при 37°C в течение еще одного часа в инкубаторе, и монослой клеток покрывали MEM/4% FBS/1,5% СМС. Через 5 дней инкубации при 37°C планшеты фиксировали, окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового (Sigma) в 25% метаноле (об./об.). Бляшки подсчитывали.

Иммуноферментный анализ S1+S2 (ELISA).

Планшеты для ELISA покрывали 2,0 мг/мл рекомбинантного спайкового белка SARS-CoV-2 S1+S2 (Acro Biosystems; SPN-C52H8) и инкубировали в течение ночи при 2-8°C. S1+S2 содержит аминокислотные остатки Val 16-Pro 1213 полноразмерного спайкового белка, GenBank № QHD43416.1. Он содержит две мутации для стабилизации белка до тримерного состояния перед слиянием (R683A, R685A), а также содержит С-концевой 10× His-тэг (SEQ ID NO: 24). Затем планшеты промывали PBS с 0,05% Tween-20 (Sigma; P3563) и блокировали (Starting Block, Thermo Scientific;37,538) на 1-3 ч при комнатной температуре. Образцы серийно разводили блокирующим буфером и добавляли в двух повторностях вместе с приготовленными контролями в промытые и заблокированные аналитические планшеты. Образцы инкубировали на заблокированных планшетах для анализа в течение одного часа при комнатной температуре. После инкубации образца и контроля планшеты промывали, затем в каждую лунку добавляли 1/1000

препарата конъюгированного с HRP антитела к IgG человека (BD Pharmingen; 555 788) в блокирующем буфере и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали, затем добавляли субстрат TMB (KPL; 5120-0077) и оставляли для инкубации при комнатной температуре на примерно 10 мин. Затем добавляли стоп-раствор TMB (KPL; 5150-0021) и планшеты считывали при 450 нм и 650 нм на микропланшет-ридере Synergy HTX (BioTek). Величину реакции анализа выражали в виде титров, которые определяли как наибольший обратный фактор разведения наибольшего серийного разведения, при котором оптическая плотность с поправкой на планшет составляет 3 SD выше фона соответствующей недели 0 субъекта.

Анализ ELISpot спайкового белка SARS-CoV-2.

Периферические мононуклеарные клетки (PBMC) до и после вакцинации стимулировали *in vitro* 15-мерными пептидами (перекрывающимися 9 остатками), охватывающими последовательность полноразмерную консенсусного спайкового белка. Клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с пептидными пулами в концентрации 5 мг на мл в предварительно покрытом планшете ELISpot (Mab-Tech, Human IFN-g ELISpot Plus). На следующий день клетки отмывали и планшеты проявляли с помощью биотинилированного детекторного антитела к IFN- γ , а затем конъюгата стрептавидин-фермент, что приводило к появлению видимых пятен. Каждое пятно соответствует отдельной цитокин-секретирующей клетке. После проявления планшетов пятна сканировали и количественно определяли с помощью микроанализатора CTL S6 (CTL) с программным обеспечением Immuno-Capture и ImmunoSpot. Значения показаны как среднее значение измерений в трех повторностях за вычетом исходного уровня. Квалификация анализа ELISpot определила, что 12 пятнообразующих единиц являются нижним пределом обнаружения. Таким образом, все, что превышает это пороговое значение, считается сигналом антигенспецифического клеточного ответа.

Анализ проточной цитометрии спайковой белка SARS-CoV-2 с использованием INO-4800.

PBMC также использовали для анализа окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS) с использованием проточной цитометрии. Один миллион PMBC в 200 мл полной среды RPMI стимулировали в течение шести часов (37°C, 5% CO₂) с помощью DMSO (отрицательный контроль), PMA и иономицина (положительный контроль, 100 нг/мл и 2 мкг/мл соответственно) или указанных пептидных пулов (225 мкг/мл). Через один час после стимуляции добавляли брэфельдин А и монензин (BD GolgiStop и GolgiPlug, 0,001% и 0,0015% соответственно) для блокирования секреции экспрессируемых цитокинов. После стимуляции клетки переносили в течение ночи при 4°C. Затем клетки промывали в PBS для окрашивания живых/мертвых клеток (краситель Life Technologies Live/Dead aqua fixable для оценки жизнеспособности клеток), а затем ресуспендировали в буфере FACS (0,5% BSA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES). Затем окрашивали внеклеточные маркеры, клетки фиксировали и пермеабилizировали (eBioscience™ Foxp3Kit), а затем окрашивали в отношении указанных цитокинов (табл. 9) с использованием флуоресцентно конъюгированных антител. На фиг. 22А и В показаны репрезентативные стратегии гейтирования для CD4+ и CD8+ Т-клеток, а также примеры положительной экспрессии IFN γ , TNF α , IL-2 и IL-4.

Статистический анализ.

В отношении этого испытания не применяли формальный анализ мощности. Описательную статистику использовали для обобщения конечных точек безопасности: доля АЕ явлений, реакции в месте введения и AESI в течение 8 недель. Для суммирования конечных точек иммуногенности также использовали описательную статистику: медианные ответы (с 95% доверительными интервалами) и процент респондеров для клеточных результатов, а также средние геометрические титры (с 95% доверительными интервалами) и процент респондеров для гуморальных результатов. Выполняли апостериорный анализ парных различий после вакцинации за вычетом довакцинальных парных различий в ответах на нейтрализацию SARS-CoV-2 (по натуральной логарифмической шкале, с парным t-критерием), ответах ELISpot (с ранговыми критериями Вилкоксона) и ответах анализа внутриклеточного потока (с ранговыми критериями Уилкоксона).

Результаты.

Демографическая характеристика исследуемой популяции.

Всего обследовали 55 участников, и 40 участников включали в первые две группы (фиг. 16). Средний возраст составлял 34,5 года (от 18 до 50 лет). Среди участников было 55% (22/40) мужчин (таблица 6). Большинство участников были белыми (82,5%, 33/40).

Безопасность и переносимость вакцины.

Всего 39 из 40 (97,5%) участников завершили введение обеих доз, и один участник в группе введения дозы 2,0 мг прекратил участие в исследовании до получения второй дозы из-за отсутствия транспортировки в клинические центры, и прекращение не было связано с исследованием или введением дозы (фиг. 16). Все 39 оставшихся субъектов завершили визит через 8 недель после введения дозы 1. В общей сложности зарегистрировали 11 местных и системных нежелательных явлений (АЕ) через 8 недель после введения 1-й дозы, шесть из них были сочтены связанными с вакциной (табл. 10). Все АЕ были 1 степени тяжести (легкие). Пять из шести связанных АЕ представляли собой реакции в месте инъекции, включая боль в месте инъекции (3) и эритему (2). Одним системным АЕ 1 степени, связанным с вакциной, была

тошнота. Все связанные АЕ возникали в день введения дозы, когда субъекты получали первую или вторую вакцинацию. Лихорадочных реакций не было, жаропонижающие препараты после вакцинации не применялись. Ни один субъект не прекратил исследование из-за АЕ. О серьезных нежелательных явлениях (SAE) и нежелательных явлениях, представляющих особый интерес (AESI), не сообщалось. В течение начального 8-недельного периода последующего наблюдения аномальные лабораторные показатели, которые исследователи считали клинически значимыми, отсутствовали. Отсутствовало увеличение числа участников, которые испытали АЕ, связанные с вакциной, в группе введения дозы 2,0 мг (10%, 2/20) по сравнению с группой введения дозы 1,0 мг (15%, 3/20) (фиг. 19). Кроме того, отсутствовало увеличение частоты нежелательных явлений со второй дозой по сравнению с первой дозой в обеих группах дозы.

Таблица 10

Количество нежелательных явлений, классифицированных по MedDRA® классу системы органов, степени тяжести и установленной исследователем связи с исследуемой вакцинацией

Системно-органный класс MedDRA®	Тяжесть	Не связано с вакцинацией	Связано с вакцинацией	Общее число
Любая система класса органов	Слабая	5	6	11
	Умеренная	-	-	-
	Тяжелая	-	-	-
Расстройства со стороны желудочно-кишечного тракта	Слабая	1	1	2
	Умеренная	-	-	-
	Тяжелая	-	-	-
	Слабая	-	5	5
Общие нарушения и введение Условия участка	Умеренная	-	-	-
	Тяжелая	-	-	-
Травмы, отравления и осложнения процедур	Слабая	2	-	2
	Умеренная	-	-	-
	Тяжелая	-	-	-
	Слабая	1	-	1
Новообразования доброкачественные, злокачественные и неопределенные	Умеренная	-	-	-
	Тяжелая	-	-	-
Нарушения со стороны нервной системы	Слабая	1	-	1
	Умеренная	-	-	-
	Тяжелая	-	-	-

Иммуногенность.

В анализ иммуногенности включали тридцать восемь субъектов. В дополнение к одному субъекту в группе 2,0 мг, который прекратил прием до завершения введения дозы, один субъект в группе введения дозы 1,0 мг был признан серопозитивным на исходном уровне и был исключен. Данные для этого субъекта можно найти в табл. 11.

Таблица 11

Иммунные ответы для субъекта, который был серопозитивным при включении в исследование, группа введения дозы 1,0 мг INO-4800

Иммунный анализ	Выход на неделе 0	Выход на неделе 6
Нейтрализация, неделя 6	785	1089
Реципрокный титр		
Антитело, связывающее RBD	1	1
Неделя 6, реципрокный титр		
Антитело, связывающее S1+S2	1	14580
Неделя 6, реципрокный титр		
ELISpot IFN-гамма, неделя 6 SFU/10 ⁶ PBMC	55,6	27,8

Гуморальные иммунные ответы.

Сыворотку тестировали в отношении способности связывать спайковый белок S1+S2. У 89% (17/19) участников группы 1,0 мг и у 95% (18/19) участников группы 2,0 мг наблюдали повышение титра сывороточного IgG, связывающего спайковый белок S1+S2, по сравнению с временной точкой до вакцинации (неделя 0), с GMT респондера 655,5 (95% CI: 255,6, 1681,0) и 994,2 (95% CI: 395,3, 2500,3) в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно (фиг. 17В, Фиг. 20 и табл. 13). Сыворотки также тестировали в отношении способности нейтрализовать живой вирус с помощью анализа нейтрализации живого вируса PRNTIC50. Среднее геометрическое кратное увеличение на неделе 6 относительно исходного уровня составило 10,8 с 95% CI (4,4, 27,0) и 11,5 с 95% CI (5,3, 24,9) в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. В каждой группе наблюдали статистически значимое увеличение на неделе 6 по сравнению с исходным уровнем ($P < 0,0001$ парный t-критерий, апостериорный анализ), фиг. 17А. На неделе 6 процент респондеров составил 78% (14/18) и 84% (16/19) в группе введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно (фиг. 17А и табл. 13), а средний геометрический титр (GMT) респондеров составил 102,3 (95% CI: 37,4, 280,3) и 63,5 (95% CI: 39,6, 101,8) в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. Общая сероконверсия (определяемая как количество участников, которые отвечают нейтрализацией и/или связыванием антител к белку S) на неделе 6 в группе введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг составляла 95% (18/19) для каждой группы (табл. 13).

Иммуноферментное иммунное пятно (ELISpot).

Процент респондеров на 8 неделе составил 74% (14/19) в группе с введением дозы 1,0 мг и 100% (19/19) в группе с введением дозы 2,0 мг. Эти данные, взятые вместе с данными о сероконверсии, приводят к 100% (19/19) общему иммунному ответу в каждой группе (табл. 13, фиг. 18А и 21). Медиана SFU на 10⁶ PBMC составила 46 (95% CI: 21,1, 142,2) и 71 (95% CI: 32,2-194,4) для респондеров в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. Среднее изменение на неделе 8 по сравнению с исходным значением составило 22,3 (95% CI: 2,2, 63,4) и 62,8 (95% CI: 22,2, 191,1) в соответствующих группах и в каждой группе наблюдали статистически значимое увеличение по сравнению с исходным уровнем ($P = 0,001$ и $P < 0,0001$ соответственно, ранговый критерий Уилкоксона для сопоставимых пар, апостериорный анализ), фиг. 18А. Также интересно отметить, что 3 образца выздоравливающих (все 3 с симптомами, но не госпитализированные), протестированные с помощью анализа ELISpot, показали более низкие Т-клеточные ответы со средним значением 33, чем группа с введением дозы 2,0 мг на 8 неделе (фиг. 20). Как показано на фиг. 18В и 18G, ответы Т-клеток в группе 2,0 мг сопоставляли с 5 пулами эпитопов. Обнадеживает то, что Т-клеточные ответы наблюдали во всех областях спайкового белка, при этом доминирующий пул охватывал область связывающего рецептор домена, за которым следовали пулы, охватывающие N-концевой домен, а также слитый пептид, гептадный повтор 1 и центральная спираль.

Анализ внутриклеточного потока.

Вклад CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в клеточный иммунный ответ против INO-4800 оценивали с помощью окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS). В группе с дозой 2,0 мг среднее изменение от исходного уровня до недели 6 в CD8⁺Т-клетках, продуцирующих IFN- α , TNF- α и/или IL-2 (любой ответ), составило 0,11 с 95% CI (-0,02, 0,23); изменение было значительно увеличено ($P = 0,0181$, ранговый критерий Уилкоксона для сопоставимых пар, апостериорный анализ) в основном из-за значительного увеличения продуцирования IFN- α , а также TNF- α (фиг. 18С). Также в группе введения дозы 2,0 мг среднее изменение от исходного уровня до недели 6 в CD4⁺Т-клетках, продуцирующих TNF- α , составило 0,02 при 95% CI (0,01-0,09); изменение также было значительно увеличено ($P = 0,0020$, ранговый критерий Уилкоксона для сопоставимых пар, апостериорный анализ, фиг. 18С). Композиция CD4⁺ или CD8⁺Т-

клеток, продуцирующих какой-либо цитокин (IFN- γ , TNF- α или IL-2 после вакцинации), также оценивали в отношении наличия поверхностных маркеров CCR7 и CD45RA для характеристики эффекторных клеток (CCR7-CD45RA+), клеток эффекторной памяти (CCR7-CD45RA-) и клеток центральной памяти (CCR7+CD45RA-) (фиг. 18D). В обеих группах доз CD8+Т-клетки, продуцирующие цитокин в ответ на стимуляцию спайковыми пептидами SARS-CoV-2, в целом были сбалансированы в трех популяциях, тогда как CD4+Т-клетки имели преимущественно фенотип центральной памяти (фиг. 18D). CD4+ и CD8+Т-клетки после вакцинации дополнительно исследовали в отношении их способности продуцировать более одного цитокина за раз, и было рекомендовано отметить, что почти половина (41%) CD8+ Т-клеток в группе введения дозы 2,0 мг были продуцировали IFN- α и TNF- α с двойной направленностью (фиг. 18E). CD8+ Т-клетки, продуцирующие цитокин в группе введения дозы 1,0 мг, были преимущественно монофункциональными клетками, продуцирующими IFN- γ (57%). Компартмент CD4+ Т-клеток также был полифункциональным по своей природе: 6% и 9% в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно, продуцировали все 3 цитокина, IFN- α , TNF- α и IL-2 (табл. 12). Ответы Th2 также измеряли путем оценки продуцирования IL-4, и не наблюдали статистически значимого повышения (ранговый критерий Уилкоксона для сопоставимых пар, апостериорный анализ) ни в одной из групп после вакцинации (фиг. 18F).

INO-4800 хорошо переносилась с частотой связанных с продуктом АЕ 1 степени у 15% (3/20 субъектов) и 10% (2/20 субъектов) участников в группе введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. В исследовании отмечали только АЕ 1 степени, что выгодно отличает их от существующих лицензированных вакцин. Профиль безопасности успешной вакцины против COVID-19 важен и поддерживает широкое развитие INO-4800 в группах риска, которые подвергаются более серьезному риску осложнений от инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, включая пожилых людей и людей с сопутствующими заболеваниями. INO-4800 также вызывала сбалансированные гуморальные и клеточные иммунные ответы, при этом все 38 поддающихся оценке участников демонстрировали один или оба ответа антител или Т-клеток после введения двух доз INO-4800. Гуморальные ответы, измеряемые связывающими или нейтрализующими антителами, наблюдали у 95% (18/19) участников в каждой группе введения дозы. Нейтрализующие антитела, измеренные с помощью анализа нейтрализации живого вируса, обнаруживали у 78% (14/18) и 84% (16/19) участников, а соответствующие GMT составляли 102,3 [95% CI (37,4, 280,3)] и 63,5 [95% CI (39,6, 101,8)] для групп введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. Диапазон перекрывается с титрами PRNT IC50, зарегистрированными у выздоравливающих пациентов, а также с титрами PRNT IC50 у NHP, которые были защищены от стимуляции SARS-CoV-2. Кроме того, наблюдали статистически значимое увеличение титров. Важно отметить, что все реципиенты вакцины, кроме одного, у которых не развились титры нейтрализующих антител, дали положительный ответ в анализе ELISpot Т-клеток, что свидетельствует о том, что иммунные ответы, генерируемые вакциной, регистрируются в этих анализах по-разному. Клеточные иммунные ответы наблюдали в 74% (14/19) и 100% (19/19) групп введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. Важно отметить, что INO-4800 генерировала Т-клеточные ответы, которые были более частыми и с более высокими средними ответами респондеров (46 [95% CI (21,1, 142,2)] против 71 [95% CI (32,2, 194,4)] SFU 106 PBMC) в группах введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг соответственно. Эти Т-клеточные ответы в группе введения дозы 2,0 мг были выше по величине, чем у протестированных образцов выздоравливающих (фиг. 18А). Кроме того, наблюдали статистически значимое увеличение SFU. В анализах с помощью проточной цитометрии группы введения дозы 1,0 мг и 2,0 мг показали увеличение продуцирования цитокинов как CD4+, так и CD8+ Т-клеточными компартментами, особенно в группе с введением дозы 2,0 мг. Группа введения дозы 2,0 мг продемонстрировала ряд статистически значимых выходов цитокинов, включая IFN- γ и TNF- α и "любой цитокин" из CD8+ Т-клеточного компартмента и TNF- α из CD4+ Т-клеточного компартмента (фиг. 18С). Большое значение имеет то, что в ответах CD8+ Т-клеток в группе введения дозы 2,0 мг преобладали клетки, экспрессирующие как IFN- α , так и TNF- α с IL-2 или без него (фиг. 18Е и табл. 12). В целом эти клетки составляли почти половину общего ответа CD8+ Т-клеток (42,7%, табл. 12).

В фазе 1 этого испытания вакцинация INO-4800 приводила к значительным Т-клеточным ответам с повышенным фенотипом Th1, измеренным как с помощью IFN- α ELISpot, так и с помощью многопараметрической проточной цитометрии, о чем свидетельствует повышенная экспрессия цитокинов Th1-типа IFN- γ , TNF- α и IL-2 (фиг. 18С). Оценка клеточных ответов, индуцированных INO-4800, показала наличие специфических для SARS-CoV-2 CD4+ и CD8+ Т-клеток, демонстрирующих признаки дифференцировки как в центральные, так и в эффекторные клетки памяти, что позволяет предположить, что установился устойчивый клеточный ответ (фиг. 18D). Важно отметить, что это было достигнуто при минимизации индукции IL-4, прототипа цитокина Th2 (фиг. 18F), подтверждая, что эта вакцина имеет иммунный фенотип, наряду с индукцией защиты в доклинических моделях, что делает маловероятным риск индукции обострения заболевания.

Таблица 12
Полифункциональность проточной цитометрии

Выход параметра	Когорта введения дозы 1,0 мг		Когорта введения дозы 2,0 мг	
	Цитокин CD4, частота (%)	Цитокин CD8, частота (%)	Цитокин CD4, частота (%)	Цитокин CD8, частота (%)
IFN-гамма	31,2	56,7	29,5	27,1
в отдельности				
TNF-альфа в отдельности	20,4	14	20,9	11,2
IL-2 в отдельности	22,3	16,5	20,1	16,5
IFN-гамма и TNF-альфа в отдельности	8,0	9,7	6,7	40,6
IFN-гамма и IL-2 в отдельности	2,1	0,9	0,6	1,3
IL-2 и TNF-альфа в отдельности	9,6	0,7	13,5	1,2
IFN-гамма и IL-2 и TNF-альфа	6,4	1,5	8,7	2,1

Указанные проценты представляют собой вклад каждого выхода в общий цитокиновый ответ.

Таблица 13

Иммунный анализ	Когорта введения дозы 1,0 мг			Когорта введения дозы 2,0 мг		
	Всего значение	Респондеры, значение	Респондеры [‡] , n (%)	Всего значение	Респондеры, значение	Респондеры [‡] , n (%)
Нейтрализация	44,4	102,3	14/18	34,9	63,5	16/19
Неделя 6, GMT	[14,6,	[37,4,	(78%)	[15,8,	[39,6,	(84%)
Реципрокный титр	134,8]	280,3]		77,2]	101,8]	
[95% CI]	(1,	(13,		(1652)	(13652)	
(диапазон)	11647)	11647)				
связывание S1+S2	331,2	655,5	17/19	691,4	994,2	18/19
Антитело, неделя	[91,2,	[255,6,	(89%)	[217,5,	[395,3,	(95%)

6, GMT	1203,2	168,1]		2197,2]	2500,3]	
Реципрокный титр]	(20,		(1,	(20,	
[95% CI]	(1,	14580)		14580)	14580)	
(диапазон)	14580)					
Всего	н.о.	н.о.	18/19	н.о.	н.о.	18/19
Сероконверсия			(95%)			(95%)
(Ответ в S1+S2 или Нейтрализация)						
IFN-гамма	26,2	45,6	14/19	71	71, SFU	19/19
ELISpot, неделя	SFU	[21,1,	(74%) ^μ	SFU	[32,2-	(100%) ^μ
8, медиана SFU	[10,0-	142,2]		[32,2-	194,4]	
на [95% CI]	64,4]	(16,7,		194,4]	(8,9,	
(диапазон)	(1,	374,4)		(8,9,	615,6)	
	374,4)			615,6)		
Всего	н.о.	н.о.	19/19	н.о.	н.о.	19/19
Иммунный,			(100%)			(100%)
Частота ответа						
(Сероконверсия или ELISpot)						

1,0 мг, за исключением одного субъекта в когорте с исходным положительным результатом NP ELISA.

[‡] Критерии ответа: Живая нейтрализация - неделя 6 PRNT IC₅₀ ≥10 или ≥4, если наблюдается связывающая активность ELISA; связывание S1+S2 - неделя 6, значение >1; связывание RBD - неделя 6, значение >1;

ELISpot - значение ≥12 SFU за неделю 0.

^μ - Респондеры, полученные с использованием данных недели 6 или недели 8.

Расширенное исследование фазы I

Примерно 120 здоровых добровольцев будут оцениваться по трем (3) уровням доз (исследовательские группы). Всего в каждую группу исследования будет включено 40 субъектов. Включение в каждую исследуемую группу будет распределяться по возрасту; n=20 для 18-50 лет, n=10 для 51-64 лет и n=10 ≥65 лет (табл. 14).

Субъекты будут взрослыми в возрасте не менее 18 лет; признан здоровым исследователем на основании истории болезни, физического осмотра и основных показателей жизнедеятельности, проведенных при скрининге; способен и желает соблюдать все процедуры обучения; лабораторные результаты скрининга находятся в нормальных пределах для тестирующей лаборатории или признаны исследователем клинически незначимыми; индекс массы тела 18-30 кг/м² включительно при скрининге; отрицательные серологические тесты на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), антитела к гепатиту С и антитела к вирусу иммунодефицита человека (HIV) при скрининге; ЭКГ при скрининге, которая, по мнению исследователя, не имеет клинически значимых результатов (например, синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта); и должны соответствовать одному из следующих критериев в отношении репродуктивной способности: женщины в постменопаузе, что определяется спонтанной аменореей в течение ≥12 месяцев; хирургически стерильны или имеют бесплодного партнера; использование эффективных с медицинской точки зрения средств контрацепции.

Критерии исключения: беременность или кормление грудью, намерение забеременеть или стать отцом детей в течение прогнозируемой продолжительности исследования, начиная со скринингового визита и до 3 месяцев после последней дозы; положительный результат теста на беременность в сыворотке во время скрининга или положительный тест мочи на беременность до введения дозы; в настоящее время участвует или участвовал в исследовании с исследуемым препаратом в течение 30 дней, предшествующих дню 0; предыдущий контакт с коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) или получение исследуемого препарата для профилактики или лечения COVID-19, ближневосточного респираторного синдрома (MERS) или тяжелого острого респираторного синдрома (SARS); в текущей профессии с высоким риском заражения SARS-CoV-2 (например, медицинские работники или сотрудники службы экстренного реагирования, непосредственно взаимодействующие с пациентами или

оказывающие непосредственную помощь пациентам); заболевания дыхательной системы в настоящее время или в анамнезе, гиперчувствительность или тяжелые аллергические реакции на вакцины или лекарственные средства, диагноз сахарного диабета, гипертонии, злокачественных новообразований в течение 5 лет после скрининга или сердечно-сосудистых заболеваний; иммуносупрессия в результате основного заболевания или лечения, включая первичный иммунодефицит, длительное применение (≥ 7 дней) пероральных или парентеральных глюкокортикоидов, текущее или ожидаемое применение доз противоревматических препаратов, модифицирующих заболевание, и биологических препаратов, модифицирующих заболевание, анамнез трансплантация паренхиматозного органа или костного мозга и наличие в анамнезе других клинически значимых иммуносупрессивных или клинически диагностированных аутоиммунных заболеваний; менее двух приемлемых мест, доступных для интрадермальной и электрофизиологической инъекций с учетом дельтовидной и переднелатеральной четырехглавой мышц; или сообщили о курении, вейпинге или активном злоупотреблении наркотиками, алкоголем или психоактивными веществами или зависимости; или любые результаты медицинского осмотра и/или история любого заболевания, которые, по мнению исследователя, могут исказить результаты исследования или создать дополнительный риск для пациента в связи с их участием в исследовании.

Всем субъектам вводили дозу в день 0 и неделю 4 (табл. 15). Субъекты, дающие согласие на получение бустерной дозы (табл. 16), получат бустерную дозу не ранее чем на неделе 12 в их графике дозирования с той же дозой, которая ранее была получена для их двухдозовой схемы (день 0 и неделя 4). Безопасность и иммуногенность будут оцениваться через 2 недели после бустерной дозы.

Таблица 14

Исследуемая группа	Общее число субъектов	Число субъектов в зависимости от возраста	Возраст (годы)	Введение дозы, недели	INO-4800 Доза на инъекцию	Число инъекций/EP на визит введения дозы	INO-4800 Доза на визит введения дозы	Всего INO-4800 Доза
1	40	20*	18-50	0, 4 (± 5 дней), необязательно бустер ^b	1,0 мг	1	1,0 мг	3,0 мг
		10	51-64					
		10	≥ 65					
2	40	20*	18-50	0, 4 (± 5 дней), Необязательно бустер ^b	1,0 мг	2а	2,0 мг	6,0 мг
		10	51-64					
		10	≥ 65					
3	40	20	18-50	0, 4 (± 5 дней), необязательно бустер ^b	0,5 мг	1	0,5 мг	1,5 мг
		10	51-64					
		10	≥ 65					
Всего	120			* Основное исследование (другие в расширенном исследовании)				

^aINO-4800 будет вводиться внутривенно, а затем EP в приемлемом месте на двух разных конечностях при каждом визите для введения дозы.

^b Необязательная бустерная доза доставляется не ранее недели 12 в их графике дозирования с той же дозой, которая ранее была получена для их двухдозовой схемы.

Субъекты, не получающие необязательную бустерную дозу, будут сопровождаться до визита окончания исследования (EOS) на неделе 52, который будет визитом окончания исследования (EOS) (табл. 15). Для субъектов, получающих необязательную бустерную дозу, визит на неделе 48 после бустерной дозы будет представлять собой визит EOS (табл. 16).

Основные цели.

Оценить переносимость и безопасность INO-4800, вводимого с помощью ID инъекции с последующей EP у здоровых взрослых добровольцев.

Оценить клеточный и гуморальный иммунный ответ на INO-4800, вводимую с помощью ID инъекции с последующей EP.

Основные конечные точки безопасности.

Частота нежелательных явлений по классу систем органов (SOC), предпочтительному термину (PT), тяжести и связи с исследуемым препаратом. Процент участников с нежелательными явлениями

(AE) [временные рамки: исходный уровень до недели 52 (если не проводится необязательная бустерная доза) или до недели 48 визита после бустерной дозы (если проводится необязательная бустерная доза)].

Реакции в месте введения (т.е. инъекции) (описанные с помощью частоты и тяжести).

Процент участников с реакциями в участке введения (инъекции).

[Временные рамки: с дня 0 до недели 52 (если не проводится необязательная бустерная доза) или неделя 48 визита после бустерной дозы (если получают необязательную бустерную дозу)].

Частота нежелательных явлений, представляющих особый интерес. Процент участников с нежелательными явлениями, представляющими особый интерес (AESI). [Временные рамки: исходный уровень до недели 52 (если не проводится необязательная бустерная доза) или до недели 48 визита после бустерной дозы (если проводится необязательная бустерная доза)].

Первичные конечные точки иммуногенности.

Антигенспецифические антитела к спайковому гликопротеину SARS-CoV-2, определенные с помощью анализов связывания. Изменение титров антигенспецифических связывающих антител к спайковому гликопротеину SARS-CoV-2 по сравнению с исходным уровнем [временные рамки: Исходный уровень до недели 52 (если не проводится необязательная бустерная доза) или до недели 48 визита после бустерной дозы (если проводится необязательная бустерная доза)].

Антигенспецифический клеточный иммунный ответ, определенный с помощью IFN-гамма, ELISpot и/или проточной цитометрии. Изменение антигенспецифического клеточного иммунного ответа по сравнению с исходным уровнем [временные рамки: Исходный уровень до недели 52 (если не проводится необязательная бустерная доза) или до недели 48 визита после бустерной дозы (если проводится необязательная бустерная доза)].

Исследовательские цели.

Оценить расширенный иммунологический профиль с помощью оценки Т- и В-клеточного иммунного ответа.

Оценить безопасность и иммуногенность дополнительной бустерной дозы INO-4800, вводимой с помощью ID инъекции с последующей EP после двухдозовой схемы. Исследовательские конечные точки.

Расширенный иммунологический профиль, который может включать (без ограничения) дополнительную оценку количества Т- и В-клеток, реакции нейтрализации и молекулярных изменений Т- и В-клеток путем измерения иммунологических белков и уровней мРНК генов, представляющих интерес, в течение всех недель, что определяется наличием образца.

Частота всех нежелательных явлений после необязательной бустерной дозы INO-4800, вводимой с помощью ID инъекции с последующей EP.

Антигенспецифические нейтрализующие и связывающие антитела к спайковому гликопротеину SARS-CoV-2 после необязательной бустерной дозы INO-4800, вводимой с помощью ID инъекции с последующей EP.

Антигенспецифический клеточный иммунный ответ с помощью IFN- γ ELISpot и/или проточной цитометрии после необязательной бустерной дозы INO-4800, вводимой с помощью ID инъекции с последующей EP.

Оценка безопасности. Субъекты будут находиться под наблюдением в целях безопасности на протяжении всего испытания до EOS или до последнего визита субъекта. Нежелательные явления будут собираться при каждом визите (включая телефонные звонки в день 1 и на неделе 36 после введения бустерной дозы). Лабораторные образцы крови и мочи будут взяты в соответствии с графиком мероприятий (табл. 15 и табл. 16).

Таблица 15
График событий клинического исследования без бустера

Тесты и оценки	Скрининг ^a	День 0		День 1 (± 1 д.)	Неделя 1 (± 3 д.)		Неделя 4 (± 5 д.)		Неделя 6 (± 5 д.)	Неделя 8 (± 5 д.)	Неделя 12 (± 5 д.)	Неделя 28 (± 5 д.)	Неделя 40 (± 5 д.)	Неделя 52 (± 5 д.)
		До	После		До	После	До	После						
Информированное согласие	X													
Критерии включения/исключения	X													
Медицинский анамнез	X	X												
Демографическая информация	X													
Сопутствующие лекарственные препараты	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X	X
Физическое обследование ^b	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X	X
Основные показатели жизнедеятельности	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X	X
Рост и вес	X													
СВС с лейкоцитарной формулой	X				X			X	X	X	X	X	X	X
Биохимический анализ ^c	X				X			X	X	X	X	X	X	X
Серологический тест на HIV, HBV, HCV ^d	X													
Серологический тест на SARS-CoV-2	X													
ЭКГ в 12 отведениях	X													
Клинический анализ мочи ^e	X				X			X	X	X	X	X	X	X
Тест на беременность ^f	X	X				X								
INO-4800+EP ^g		X ^h				X ^h								
Загрузить данные EP ⁱ			X				X							
Нежелательные явления ^j	X	X	X	X ^k	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Иммунологический анализ (лейкоциты) ^l	X	X				X		X	X	X	X	X	X	X
Иммунологический анализ (сыворотка крови) ^m	X	X				X		X	X	X	X	X	X	X

Таблица 15 (продолжение).

Скрининговая оценка проводится от -30 дней до -1 дня до дня 0.

Полное медицинское обследование только при скрининге и на неделе 52 (или при любом другом визите прекращения исследования). Целевой медицинский осмотр во время всех других визитов.

Включает Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, глюкозу, BUN, Cr, AST, ALT и TBil.

Антитело к HIV или экспресс-тест, HBsAg, антитело к HCV.

Индикаторная полоска для определения глюкозы, белка и гематурии. Если индикаторная полоска не соответствует норме, необходимо провести микроскопическое исследование.

Тест сыворотки крови на беременность при скрининге. Анализ мочи на беременность во время других визитов.

Все дозы доставляли посредством внутривенной инъекции с последующей EP.

Для исследуемых групп 1 и 3 одна инъекция в кожу, предпочтительно над дельтовидной мышцей, в день 0 и на неделе 4. Для исследуемой группы 2 две инъекции в кожу, каждая из которых в разные дельтовидные или латеральные четырехглавые мышцы; предпочтительно над дельтовидными мышцами, в день 0 и на неделе 4.

После введения INO-4800+EP данные EP будут загружены с устройства CELLECTRA® 2000 и предоставлены Inovio.

Включает АЕ с момента согласия и все реакции в месте инъекции, которые квалифицируются как АЕ.

Телефонный звонок при последующем наблюдении для сбора АЕ.

4×8,5 мл (34 мл) цельной крови в 10 мл пробирках с кислым цитратом и декстрозой (ACD, с желтой крышкой) на временную точку. Примечание: Соберите в общей сложности 68 мл цельной крови до введения 1-й дозы (скрининг и до введения дозы в день 0).

1×8 мл крови в 10 мл пробирке для сбора сыворотки крови с красной крышкой на временную точку. Примечание: Соберите четыре аликвоты сыворотки по 1 мл каждая (всего 4 мл) в каждой временной точке до введения 1-й дозы (скрининг и до введения дозы в день 0).

Таблица 16
График событий бустерного клинического испытания

Тесты и оценки	Визит для введения бустерной дозы		2 недели после визита для введения бустерной дозы (± 5 дн.)	12 недель после визита для введения бустерной дозы (± 5 дн.)	24 недели после визита для введения бустерной дозы (± 5 дн.)	Телефонный звонок через 36 недель после введения бустерной дозы (± 5 дн.)	48 недель после визита для введения бустерной дозы (± 5 дн.)
	До	После					
Сопутствующие лекарственные препараты	X		X	X	X		X
Физическое обследование ^a	X		X	X	X		X
Основные показатели жизнедеятельности	X		X	X	X		X
СВС с лейкоцитарной формулой	X		X	X	X		X
Биохимический анализ крови ^b	X		X	X	X		X
Клинический анализ мочи ^c	X		X	X	X		X
Тест на беременность ^d	X						
INO-4800+EP ^e	X ^f						
Загрузить данные EP ^e		X					
Нежелательные явления ^h	X	X	X	X	X	X ^g	X
Иммунологический анализ (лейкоциты)	X		X	X	X		X
Иммунологический анализ (сыворотка крови) ^k	X		X	X	X		X

Полное медицинское обследование на неделе 48 после визита для введения бустерной дозы (или при любом другом визите прекращения исследования). Целевой медицинский осмотр во время всех других визитов.

Включает Na, K, Cl, HCO₃, Ca, PO₄, глюкозу, BUN, Cr, AST, ALT и TBil.

Индикаторная полоска для определения глюкозы, белка и гематурии. Если индикаторная полоска не соответствует норме, необходимо провести микроскопическое исследование.

Перед введением бустерной дозы тест мочи на беременность должен быть отрицательным.

Все дозы доставляли посредством внутривенной инъекции с последующей EP.

Для исследуемых групп 1 и 3: одна инъекция в кожу, предпочтительно над дельтовидной мышцей (или, альтернативно, в латеральную четырехглавую мышцу) во время визита для введения бустерной дозы. Для исследуемой группы 2 две инъекции в кожу, каждая из которых в разные дельтовидные или латеральные четырехглавые мышцы; предпочтительно над дельтовидными мышцами, во время визита для введения бустерной дозы.

После введения INO-4800+EP данные EP будут загружены с устройства CELLECTRA® 2000 и предоставлены Inovio.

Включает AE с момента согласия и все реакции в месте инъекции, которые квалифицируются как AE.

Телефонный звонок при последующем наблюдении для сбора AE.

4×8,5 мл (34 мл) цельной крови в 10 мл пробирках с кислым цитратом и декстрозой (ACD, с желтой крышкой) на временную точку.

1×8 мл крови в 10 мл пробирке для сбора сыворотки крови с красной крышкой на временную точку.

Оценка иммуногенности: Образцы крови для иммунологических анализов будут взяты в соответствии с графиком мероприятий (таблица 15 и таблица 16). Определение анализа собранных образцов для иммунологических конечных точек будет определяться на постоянной основе на протяжении всего исследования.

Ожидается, что INO-4800, введенный ID с последующей EP с использованием CELLECTRA® 2000 у здоровых добровольцев, будет хорошо переноситься, продемонстрировать приемлемый профиль безопасности и приводить к возникновению иммунных ответов на спайковый гликопротеин SARS-CoV-2.

Пример 7. Рандомизированное, слепое, плацебо-контролируемое исследование фазы 2/3 для оценки безопасности, иммуногенности и эффективности INO-4800, профилактической вакцины против заболевания COVID-19, вводимой внутривенно с последующей электропорацией (EP) у здоровых серонегативных взрослых с высоким риском воздействия SARS-CoV-2.

Рандомизированное, плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование фазы 2/3 для оценки безопасности, иммуногенности и эффективности INO-4800, вводимой с помощью внутривенной (IV) инъекции с последующей электропорацией (EP) с использованием устройства CELLECTRA® 2000 для предупреждения заболевания COVID-19 у участников с высоким риском воздействия SARS-CoV-2. Сегмент фазы 2 будет оценивать иммуногенность и безопасность примерно у 400 участников при двух уровнях доз в трех возрастных группах. Информация о безопасности и иммуногенности из сегмента фазы 2 будет использоваться для определения уровня дозы для сегмента эффективности фазы 3 исследования с участием примерно 6178 участников.

Таблица 17

Группа	Мероприятие/лечение
<p>Экспериментальная фаза 2: группа введения дозы 1 INO-4800</p> <p>Участники получают одну внутривенную (IV) инъекцию 1,0 миллиграмма (мг) INO-4800 с последующей электропорацией (EP) с использованием устройства CELLECTRA® 2000 в день 0 и день 28.</p>	<p>Лекарственное средство: INO-4800</p> <p>INO-4800 будет введена IV в день 0 и день 28.</p> <p>Устройство: CELLECTRA® 2000</p> <p>EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 будет вводиться после IV доставки INO-4800 в день 0 и день 28.</p>
<p>Экспериментальная часть: Фаза 2: группа введения дозы 2 INO-4800</p>	<p>Лекарственное средство: INO-4800</p> <p>INO-4800 будет вводиться</p>
<p>Участники получают две IV инъекции по 1,0 мг (всего 2,0 мг за визит для введения дозы) INO-4800 с последующей EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 в день 0 и день 28.</p>	<p>IV в день 0 и день 28. Устройство: CELLECTRA® 2000</p> <p>EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 будет вводиться после IV доставки INO-4800 в день 0 и день 28.</p>
<p>Плацебо-компаратор: Фаза 2: Группа введения дозы 1</p> <p>Участники получают одну IV инъекцию плацебо с последующей EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 в день 0 и день 28.</p>	<p>Лекарственное средство: Плацебо</p> <p>Стерильный солевой буфер на основе цитрата натрия (SSC) (SSC-0001) будет вводиться внутривенно в день 0 и день 28.</p> <p>Другие названия: SSC-0001</p> <p>Устройство: CELLECTRA® 2000</p> <p>EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 будет вводиться после интрадермального введения стерильного солевого буфера на основе цитрата натрия (SSC) (SSC-0001) в день 0 и день 28.</p>
<p>Плацебо-компаратор: Фаза 2: Группа введения дозы 2</p> <p>Участники получают две IV инъекции плацебо с последующей EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 в день 0 и день 28.</p>	<p>Лекарственное средство: Плацебо</p> <p>Стерильный солевой буфер на основе цитрата натрия (SSC) (SSC-0001) будет вводиться внутривенно в день 0 и день 28.</p> <p>Другие названия: SSC-0001</p> <p>Устройство: CELLECTRA® 2000</p> <p>EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 будет вводиться после интрадермального введения стерильного солевого буфера на основе цитрата натрия (SSC) (SSC-0001) в день 0 и день 28.</p>
<p>Экспериментальная часть: Фаза 3: Оптимальная доза INO-4800</p> <p>Участники получают одну или две IV инъекции INO-4800 по 1,0 мг в зависимости от результатов сегмента фазы 2, после чего будет проведена электрофизиологическая терапия с использованием устройства CELLECTRA® 2000 в день 0 и день 28.</p>	<p>Лекарственное средство: INO-4800</p> <p>INO-4800 будет введена IV в день 0 и день 28.</p> <p>Устройство: CELLECTRA® 2000</p> <p>EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 будет вводиться после IV доставки INO-4800 в день 0 и день 28.</p>
<p>Плацебо-компаратор: Фаза 3: Оптимальная доза плацебо</p> <p>Участники получают одну или две IV инъекции плацебо в зависимости от результатов сегмента фазы 2, после чего будет проведена</p>	<p>Лекарственное средство: Плацебо</p> <p>Стерильный солевой буфер на основе цитрата натрия (SSC) (SSC-0001) будет вводиться внутривенно в день 0 и день 28.</p>

<p>электрофизиологическая терапия с использованием устройства CELLECTRA® 2000 в день 0 и день 28.</p>	<p>Другие названия: SSC-0001</p> <p>Устройство: CELLECTRA® 2000</p> <p>EP с использованием устройства CELLECTRA® 2000 будет вводиться после интрадермального введения стерильного солевого буфера на основе цитрата натрия (SSC) (SSC-0001) в день 0 и день 28.</p>
---	---

Измерение основного результата.

1. Фаза 2: Изменение антигенспецифического клеточного иммунного ответа по сравнению с исходным уровнем, измеренное с помощью анализа иммуноферментного иммунопятна (ELISpot) с интерфероном-гамма (IFN- γ) [временные рамки: с исходного уровня до дня 393].

2. Фаза 2: Изменение ответа нейтрализующих антител по сравнению с исходным уровнем, измеренное с помощью анализа нейтрализации на основе псевдовирусов [временные рамки: с исходного уровня до дня 393].

3. Процент участников с вирусологически подтвержденным заболеванием COVID-19. [Временные рамки: от 14 дней после завершения 2-дозовой схемы до 12 месяцев после введения дозы 2 (т.е. с дня 42 до дня 393)] Вторичные показатели исхода:

1. фаза 2 и 3: Процент участников с нежелательными и требуемыми реакциями в месте инъекции [временные рамки: с момента согласия до 28 дней после введения дозы 2 (до дня 56)].

2. фаза 2 и 3: Процент участников с запрошенными и незапрошенными системными нежелательными явлениями (AE) [временные рамки: с момента согласия до 28 дней после введения дозы 2 (до дня 56)].

3. фаза 2 и 3: Процент участников с серьезными нежелательными явлениями (SAE) [временные рамки: с исходного уровня до дня 393].

4. фаза 2 и 3: Процент участников с нежелательными явлениями, представляющими особый интерес (AESI) [временные рамки: с исходного уровня до дня 393].

5. Фаза 3: Процент участников со случаем смерти от всех причин [временные рамки: с исходного уровня до дня 393].

6. Фаза 3: Процент участников с нетяжелым заболеванием COVID-19 [временные рамки: от 14 дней после завершения 2-дозовой схемы до 12 месяцев после введения дозы 2 (т.е. с дня 42 до дня 393)].

7. Фаза 3: Процент участников с тяжелым заболеванием COVID-19 [временные рамки: от 14 дней после завершения 2-дозовой схемы до 12 месяцев после введения дозы 2 (т.е. с дня 42 до дня 393)].

8. Фаза 3: Процент участников со случаем смерти от заболевания COVID-19 [временные рамки: от 14 дней после завершения 2-дозовой схемы до 12 месяцев после введения дозы 2 (т.е. с дня 42 до дня 393)].

9. Фаза 3: Процент участников с вирусологически подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 [временные рамки: от 14 дней после завершения 2-дозовой схемы до 12 месяцев после введения дозы 2 (т.е. с дня 42 до дня 393)].

10. Фаза 3: Дни до разрешения симптомов у участников с заболеванием COVID-19 [временные рамки: от 14 дней после завершения 2-дозовой схемы до 12 месяцев после введения дозы 2 (т.е. с дня 42 до дня 393)].

11. Фаза 3: Изменение антигенспецифического клеточного иммунного ответа по сравнению с исходным уровнем, измеренное с помощью анализа ELISpot IFN-гамма [временные рамки: с исходного уровня до дня 393].

12. Фаза 3: Изменение ответа нейтрализующих антител по сравнению с исходным уровнем, измеренное с помощью анализа нейтрализации на основе псевдовирусов [временные рамки: с исходного уровня до дня 393].

Критерии включения:

Возраст, подходящий для исследования: 18 лет и старше;

Пол, пригодный для включения в исследование: все;

По полу: нет;

Допускаются Здоровые добровольцы: да.

Ключевые критерии включения:

Работа или проживание в среде с высоким риском воздействия SARS-CoV-2, для которых воздействие может быть относительно продолжительным или для которых средства индивидуальной защиты (PPE) могут использоваться непоследовательно, особенно в закрытых помещениях.

Результаты скрининговой лаборатории находятся в пределах нормы для тестирующей лаборатории или признаны исследователем клинически незначимыми.

Быть в постменопаузе или быть хирургически стерильным, или иметь бесплодного партнера, или

использовать эффективную с медицинской точки зрения контрацепцию с частотой неудач <1% в год при последовательном и правильном использовании с момента скрининга до 3 месяцев после введения последней дозы.

Ключевые критерии исключения:

Острое лихорадочное заболевание с температурой >100,4°F (38,0°C) или острое начало симптомов со стороны верхних или нижних дыхательных путей (например, кашель, одышка, боль в горле).

Положительный серологический или молекулярный (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией [RT-PCR]) тест на SARS-CoV-2 при скрининге.

Беременные или кормящие грудью, или намеревающиеся забеременеть, или намеревающиеся стать отцами в течение прогнозируемой продолжительности исследования, начиная с визита для скрининга и до 3 месяцев после последней дозы.

Известный анамнез неконтролируемого HIV, основанный на количестве CD4 менее 200 клеток на кубический миллиметр (мм^3) или определяемой вирусной нагрузке в течение последних 3 месяцев.

В настоящее время участвует или участвовал в исследовании с использованием исследуемого препарата в течение 30 дней, предшествующих дню 0.

Предыдущее получение исследуемой вакцины для профилактики или лечения COVID-19, ближневосточного респираторного синдрома (MERS) или тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) (документально подтвержденное получение плацебо в предыдущем испытании допустимо для участия в испытании).

Респираторные заболевания (например, астма, хроническая обструктивная болезнь легких), требующие значительных изменений в терапии или госпитализации в связи с ухудшением состояния в течение 6 недель до включения в исследование.

Иммуносупрессия в результате основного заболевания или лечения.

Отсутствие приемлемых мест для ID инъекции и EP.

Донорство или переливание крови в течение 1 месяца до дня 0.

Сообщается о злоупотреблении алкоголем или психоактивными веществами или зависимости, или незаконном употреблении наркотиков (за исключением употребления марихуаны).

Любое заболевание или состояние, которое, по мнению исследователя, может повлиять на безопасность участника или на оценку любой конечной точки исследования.

Пример 8.

Схема введения одной или двух доз ДНК-вакцины SARS-CoV-2 INO-4800 защищает от груза заболевания дыхательных путей в модели заражения отличных от человека приматов (NHP).

Безопасность, иммуногенность и эффективность внутрикожной доставки INO-4800, синтетической ДНК-вакцины-кандидата, кодирующей спайковый антиген SARS-CoV-2, оценивали в модели макаки-резус. Оценивали схемы однократной и двухдозовой вакцинации. Вакцинация индуцировала как связывающие, так и нейтрализующие антитела, а также Т-клетки, продуцирующие IFN- γ , против SARS-CoV-2. Высокая доза штамма SARS-CoV-2 Victoria01 (5×10^6 pfu) использовалась для конкретной оценки влияния вакцинации INO-4800 на груз легочных заболеваний, чтобы получить данные как о безопасности, так и об эффективности вакцины. Широкий спектр параметров заболеваний нижних дыхательных путей был измерен с применением гистопатологии, метрической системы оценки заболеваний легких, гибридизации *in situ*, вирусной РНК RT-PCR и компьютерной томографии (СТ), чтобы обеспечить понимание влияния вакцин-индуцированного иммунитета на защитный иммунитет, эффективность и потенциальное заболевание, вызванное введением вакцины (VED).

В этом примере описывается оценка иммуногенности, эффективности и безопасности ДНК-вакцины INO-4800 против SARS-CoV-2 в строгой модели заражения высокими дозами отличных от человека приматов. Внутрикожная доставка 1 мг INO-4800 макакам-резус индуцирует гуморальный и Т-клеточный ответы против спайкового антигена SARS-CoV-2 как при 2-дозовой схеме, так и при субоптимальной 1-дозовой схеме. На протяжении всего исследования явных клинических явлений у животных зарегистрировано не было. После введения высокой дозы SARS-CoV-2 наблюдалось снижение вирусных нагрузок и груза легочных заболеваний как в группах с 1, так и 2 дозами вакцины, что подтверждает эффективность INO-4800. Важно отметить, что заболевание, усиленное вакциной (VED), не наблюдалось даже в группе, получавшей 1 дозу.

Методы: вакцина.

Оптимизированную последовательность ДНК, кодирующую IgELs-спайковый белок SARS-CoV-2, создавали с использованием запатентованного Inovio алгоритма оптимизации генов *in silico* для повышения экспрессии и иммуногенности. Синтезировали оптимизированную последовательность ДНК, расщепляли BamHI и XhoI и клонировали в вектор экспрессии pGX0001 под контролем непосредственно раннего промотора цитомегаловируса человека и сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста.

Животные.

В исследовании использовали восемнадцать макак-резус индийского происхождения (Macaca mulatta). Исследуемые группы состояли из трех самцов и трех самок каждого вида, и все они были взрослыми.

ми особями в возрасте от 2,5 до 3,5 лет и весом >4 кг на момент стимуляции. Перед началом эксперимента социально совместимых животных случайным образом распределяли по контрольным группам, чтобы свести к минимуму систематическую ошибку. Животные содержались в совместимых социальных группах в клетках в соответствии со Сводом правил Министерства внутренних дел Великобритании по содержанию и уходу за животными, выращенными, поставленными или используемыми для научных процедур (2014 г.) и Руководством Национального комитета по уточнению, сокращению и замене (NC3Rs) по размещению, уходу и использованию приматов, август 2006 г. Содержание в помещении до стимуляции и на время заражения описано в [Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and *Cynomolgus* macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093.]. Вся экспериментальная работа проводилась в соответствии с лицензией на проект, одобренной Министерством внутренних дел Великобритании (PDC57C033), которая была подвергнута местной этической экспертизе в РНЕ Портон-Дауне Органом по защите животных и этике (AWERB) и одобрена в соответствии с требованиями Министерства внутренних дел (научные методы) в виде Закона о животных, 1986 г. Животным вводили внутримышечную (ИМ) инъекцию гидрохлорида кетамина (кетасет, 100 мг/мл, Fort Dodge Animal Health Ltd, Саутгемптон, Великобритания; 10 мг/кг) для процедур, требующих удаления из их среды обитания. Ни одно из животных ранее не использовалось для экспериментальных процедур.

Введение вакцины.

Животные получали 1 мг ДНК-вакцины SARS-CoV-2, INO-4800, путем внутрикожной инъекции только в день 28 (группа с 1 дозой) или в день 0 и 28 (группа с 2 дозами) с последующей обработкой ЕР с использованием CELLECTRA 2000® Adaptive Constant. Текущее устройство для электропорации с массивом 3Р (Inovio Pharmaceuticals).

Сыворотку и гепаринизированную цельную кровь собирали, в то время как животным вводили седативное средство с двухнедельными интервалами во время фазы вакцинации. Мазки из носа и глотки также собирали в день стимуляции Д56. После контрольной стимуляции мазки из носа, мазки из глотки и сыворотку крови собирали в 1, 3, 5 дрс и при отбраковке (6, 7 или 8 дрс - в шахматном порядке из-за высокого уровня трудоемкости процедур), а гепаринизированную цельную кровь собирали в 3 дрс и при отбраковке. Мазки из носа и глотки получали, как описано [Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and *Cynomolgus* macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093.].

Клинические наблюдения. За животными наблюдали несколько раз в день в отношении поведенческих и клинических изменений. Поведение оценивали по противопоказаниям, включая депрессию, выход из группы, агрессию, изменения в режиме кормления, характере дыхания, частоте дыхания и кашле. На протяжении всего исследования за животными наблюдали и оценивали их активность и здоровье следующим образом. Пояснение: Обозначение: А0=активен и бодр; А1=активен только при стимуляции оператором; А2=неактивен даже при стимуляции/неподвижен; Н=здоровый; S=чихание, С=кашель, Nd=выделения из носовой полости, Od=выделения из глаз, Rn=респираторные шумы, Lb=затрудненное дыхание, L=вялость, Di=диарея, Ах=потеря аппетита, Dx=обезвоживание, RD=респираторный дистресс. Массу тела животного, температуру и уровень гемоглобина измеряли и регистрировали на протяжении всего исследования.

Вирусы и клетки.

SARS-CoV-2 Victoria/01/2020 [Caly, L., et al., Isolation and rapid sharing of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) from the first patient diagnosed with COVID-19 in Australia. Med J Aust, 2020. 212(10): p. 459-462] был любезно предоставлен Институтом Доэрти, Мельбурн, Австралия, на Р1 после первичного выращивания в клетках Vero/hSLAM и впоследствии дважды пассирован в РНЕ Портон-Дауна в клетках Vero/hSLAM [ECACC 04091501]. Инфицирование клеток происходило с ~0,0005 MOI вируса, и их собирали в день 4 день путем диссоциации оставшихся прикрепленных клеток путем осторожного встряхивания со стерильными боросиликатными шариками диаметром 5 мм с последующим осветлением центрифугированием при 1000×g в течение 10 минут. Полногеномное секвенирование проводили на контрольном материале Р3 с использованием как Nanopore, так и Illumina, как описано в Lewandowski, K., et al., Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. J Clin Microbiol, 2019. 58(1). Титр вируса контрольных образцов определяли с помощью анализа бляшек на клетках Vero/E6 [ECACC 85020206]. Клеточные линии получали из Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC) РНЕ, Портон-Даун, Великобритания. Культуры клеток поддерживали при 37°C в минимально необходимой среде (MEM) (Life Technologies, Калифорния, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Sigma, Дорсет, Великобритания) и 25 мМ НЕPES (Life Technologies, Калифорния, США). Кроме того, в культуры Vero/hSLAM добавляли 0,4 мг/мл генетицина (Invitrogen) для поддержания экспрессионной плазмиды. Разведения контрольного вещества проводили в фосфатно-солевом буфере (PBS). Инокулят (5×10^6 PFU) вводили интратрахеально (2 мл) и интраназально (всего 1,0 мл, 0,5 мл на ноздрю).

Клинические признаки и визуализация при жизни с помощью компьютерной томографии.

СТ выполняли за две недели до и через пять дней после стимуляции SARS-CoV2. СТ визуализацию проводили на седативных животных с использованием 16-срезового СТ-сканера Lightspeed (General Elec-

tric Healthcare, Милуоки, Висконсин, США) как в положении лежа, так и на спине, и сканирование оценивали врачом-радиологом, экспертом по респираторным заболеваниям (как описано ранее [Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. 2020: p. 2020.09.17.301093.]). Чтобы обеспечить возможность разграничивать различия между отдельными НРП с небольшим объемом заболевания (т.е. <25% вовлечения легких), была разработана усовершенствованная система оценок, в которой индексы приписывались обладанию аномальными признаками, характерными для COVID у пациентов-людей (оценка паттерна COVID) и для распределения признаков по легкому (оценка зоны). Оценку паттерна COVID рассчитывали как сумму баллов, присвоенных количеству выявленных узелков, а также наличию и степени GGO и консолидации в соответствии со следующей системой: Узелок (узелки): балл 1 за 1, 2 за 2 или 3, 3 за 4 и более; GGO: каждой пораженной области был присвоен индекс в соответствии со следующим: балл 1, если измеренная площадь <1 см, 2, если от 1 до 2 см, 3, если 2-3 см, 4, если >3 см, и баллы для каждой области GGO суммировались для получения общего индекса GGO; Консолидация: каждой пораженной области был присвоен балл в соответствии со следующим: 1, если измеренная площадь <1 см, 2, если от 1 до 2 см, 3, если 2-3 см, 4, если >3 см. Баллы по каждой области консолидации суммируются для получения общего индекса консолидации. Чтобы учесть предполагаемое дополнительное влияние заболевания на хозяина консолидации по сравнению с GGO, систему индексов взвешивали путем удвоения индекса, назначенного для консолидации. Для определения индекса зоны легкое разделяли на 12 зон, а каждую сторону легкого разделяли (сверху вниз) на три зоны: верхнюю зону (над килям), среднюю зону (от килей до нижней легочной вены) и нижнюю зону (ниже нижней легочной вены). Каждую зону далее разделяли на две области: переднюю область (область до вертикальной линии середины диафрагмы в сагиттальном положении) и заднюю область (область после вертикальной линии средней точки диафрагмы в сагиттальном положении). В результате получается 12 зон, где каждой зоне, содержащей структурные изменения, присваивается один балл. Индекс паттерна COVID и зона суммируются для получения общего индекса СТ.

Посмертное исследование и гистопатологический анализ.

Животных подвергали эвтаназии в 3 различных временных точках в группах по шесть особей (включая по одному животному каждого вида и пола) в 6, 7 и 8 дpc. Жидкость бронхиального альвеолярного лаважа (BAL) собирали при вскрытии правого легкого. Левое легкое рассекали перед сбором BAL и использовали для последующих процедур гистопатологического анализа и вирусологического анализа. При вскрытии брали мазки из носа и глотки, гепаринизированную цельную кровь и сыворотку крови, а также образцы тканей для гистопатологического анализа. Образцы левой краниальной и левой каудальной долей легкого вместе с селезенкой, почкой, печенью, медиастинальными и подмышечными лимфатическими узлами, тонкой кишкой (двенадцатиперстной кишкой), толстой кишкой (ободочной кишкой), трахеей, местом инокуляции гортани и дренирующим лимфатическим узлом фиксировали путем погружения в 10% нейтральном забуференном формалине и обрабатывали обычным образом в парафине. Делали срезы размером четыре мкм, окрашивали гематоксилином и эозином (H и E) и исследовали под микроскопом. Систему оценки гистопатологического анализа легких [Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. bioRxiv, 2020: p. 2020.09.17.301093] использовали для оценки поражений дыхательных путей и паренхимы. Три среза ткани из каждой доли левого легкого использовали для оценки гистопатологического анализа легких. Кроме того, образцы окрашивали с использованием методики RNAscope для идентификации РНК вируса SARS-CoV-2 в срезах легочной ткани. Вкратце, ткани предварительно обрабатывали перекисью водорода в течение 10 минут (к.т.), извлечением мишени в течение 15 минут (98-102°C) и протеазой плюс в течение 30 минут (40°C) (Advanced Cell Diagnostics). Зонд V-nCoV2019-S (специфический для гена спайкового белка SARS-CoV-2) инкубировали на тканях в течение двух часов при 40°C. Кроме того, образцы окрашивали с использованием метода RNAscope для идентификации РНК вируса SARS-CoV-2. Амплификацию сигнала проводили по протоколу RNAscope с использованием набора RNAscope 2.5 HD Detection - Red (Advanced Cell Diagnostics, Biotechne). Все покровные стекла, окрашенные H и E и ISH, сканировали в цифровом виде с использованием сканера Panogamic 3D-Histech и просматривали с помощью программного обеспечения CaseViewer v2.4. Наличие вирусной РНК с помощью ISH оценивали с использованием предметных стекол цельных срезов легочной ткани. Анализ цифровых изображений выполняли на предметных стеклах, помеченных RNAscope, для определения процента окрашенных клеток в поражениях с использованием программного пакета Nikon-NIS-Arg.

Количественная оценка вирусной нагрузки с помощью RT-qPCR. РНК выделяли из мазков из носовой полости и глотки. Образцы инактивировали в AVL (Qiagen) и этаноле. Далее проводили экстракцию с использованием ветеринарного набора BioSprint™96 One-For-All (Indical) и платформы Kingfisher Flex в соответствии с инструкциями производителя. Ткани гомогенизировали в буфере RLT+бета-меркаптоэтанол (Qiagen). Затем гомогенат ткани центрифугировали через гомогенизатор QIAshredder (Qiagen) и добавляли этанол в соответствии с инструкциями производителя. Далее проводили экстракцию из ткани образцов с использованием ветеринарного набора BioSprint™96 One-For-All (Indical) и платформы Kingfisher Flex в соответствии с инструкциями производителя.

Количественную полимеразную цепную реакцию с последующей транскрипцией (RT-qPCR), направленную на область гена нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2, использовали для определения вирусной нагрузки и проводимую с помощью TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (Applied Biosystems™), набор 2019-nCoV CDC RUO (интегрированные ДНК-технологии) и системы ПЦР в реальном времени QuantStudio™ 7 Flex. Последовательности праймеров и зонда N1 были следующими: 2019-nCoV_N1-forward, 5' GACCCCAAAATCAGCGAAAT 3' (SEQ ID NO: 18) ; 2019-nCoV_N1-reverse, 5' TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG 3'(SEQ ID NO: 19); 2019-nCoV_N1-probe, 5' FAM-ACCCCGCATTCAGTTTGGTGGACC-BHQ1 3'(SEQ ID NO: 20). Условия циклирования были следующие: 25°C в течение 2 минут, 50°C в течение 15 минут, 95°C в течение 2 минут, затем 45 циклов 95°C в течение 3 секунд, 55°C в течение 30 секунд. Стандартом количественного определения была транскрибированная *in vitro* РНК N ORF SARS-CoV-2 (номер доступа NC_045512.2) с количественным определением от 1 до 6 логарифмических копий/мкл. Положительным образцам мазка и жидкостей, обнаруженным ниже предела количественного определения (LoQ) 4,11 log копий/мл, присваивали значение 5 копий/мкл, что соответствует 3,81 log копий/мл, в то время как необнаруженным образцам присваивали значение <2,3 копий/мкл, что эквивалентно нижнему пределу обнаружения анализа (LoD), который равен 3,47 log копий/мл. Положительным образцам тканей, обнаруженным ниже предела количественного определения (LoQ) 4,76 log копий/мл, присваивали значение 5 копий/мкл, что соответствует 4,46 log копий/г, в то время как необнаруженным образцам присваивали значение <2,3 копий/мкл, что эквивалентно нижнему пределу обнаружения анализа (LoD), который равен 4,76 log копий/г.

Субгеномную RT-qPCR проводили в системе ПЦР в реальном времени QuantStudio™ 7 Flex с использованием 1-стадийного мастер-микса TaqMan™ Fast Virus (Thermo Fisher Scientific) и олигонуклеотидов, как указано Wölfel, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465-469 (2020), с прямым праймером, зондом и обратным праймером в конечной концентрации 250 нМ, 125 нМ и 500 нМ соответственно. Последовательности праймеров и зонда sgE были следующими:

2019-nCoV_sgE-forward, 5' CGATCTCTTGATAGATCTGTTCTC 3' (SEQ ID NO: 21);

2019-nCoV_sgE-reverse, 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3' (SEQ ID NO: 22);

2019-nCoV_sgE-probe, 5' FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3' (SEQ ID NO: 23).

Условиями циклирования были 50°C в течение 10 минут, 95°C в течение 2 минут, затем следовали 45 циклов при 95°C в течение 10 секунд и 60°C в течение 30 секунд. Ампликоны RT-qPCR количественно оценивали по транскрибируемому *in vitro* стандарту РНК полноразмерной ORF SARS-CoV-2 E (номер доступа NC_045512.2), которому предшествовала лидерная последовательность UTR и предполагаемая регуляторная последовательность транскрипции гена E, описанная Wolfel et al [Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 581, 465-469 (2020)]. Положительным образцам, обнаруженным ниже нижнего предела количественного определения (LLOQ), присваивалось значение 5 копий/мкл, в то время как необнаруженным образцам присваивалось значение ≤0,9 копий/мкл, что эквивалентно нижнему пределу обнаружения анализа (LLOD). Для выделенных образцов мазков из носовой полости, мазков из глотки и образцов BAL это соответствует LLOQ, равному 4,11 log копий/мл, и LLOD, равному 3,06 log копий/мл. Для образцов ткани это соответствует LLOQ, равному 4,76 log копий/г, и LLOD, равному 3,71 log копий/г.

Тест нейтрализации для уменьшения бляшек. Титры нейтрализующих вирусов измеряли в образцах сыворотки крови, инактивированных нагреванием (56°C в течение 30 минут). SARS-CoV-2 разводили до концентрации $1,4 \times 10^3$ pfu/мл (70 pfu/50 мкл) и смешивали 50:50 в 1% FCS/MEM с удвоенными разведениями сыворотки крови от 1:10 до 1:320 в 96-луночном планшете с V-образным дном. Планшет инкубировали при 37°C во влажном боксе в течение одного часа, чтобы позволить антителам в образцах сыворотки крови нейтрализовать вирус. Нейтрализованный вирус переносили в лунки промытого 24-луночного планшета для анализа бляшек (см. метод анализа бляшек), оставляли для адсорбции при 37°C еще на час и покрывали слоем среды для анализа бляшек. После пяти дней инкубации при 37°C в увлажненном боксе планшеты фиксировали, окрашивали и подсчитывали бляшки.

ELISA связывания антигена.

Рекомбинантные ответы IgG, специфические для спайкового белка и RBD SARS-CoV-2, определяли с помощью ELISA. Полноразмерная тримерная и стабилизированная версия спайкового белка SARS-CoV-2 была предоставлена компанией Lake Pharma (№ 46328). Рекомбинантный домен связывания рецептора SARS-CoV-2 (319-541) Мус-His был разработан и любезно предоставлен компанией Mass-Biologics. 96-луночные планшеты с высоким связыванием (Nunc Maxisorp, 442404) покрывали 50 мкл на лунку 2 мкг/мл спайкового тримера (S1+S2) или RBD в 1× PBS (Gibco) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты для ELISA промывали и блокировали 5% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Sigma, F9665) в 1× PBS/0,1% Tween 20 в течение 1 часа при комнатной температуре. Сыворотка крови, собранная у животных после вакцинации, имела начальное разведение 1/50, за которым последовали 8 двукратных серийных разведений. Образцы после стимуляции инактивировали 0,5% Triton и имели начальное разведение 1/100, за которым последовали 8 трехкратных серийных разведений. Серийные раз-

ведения проводили в 10% FBS в 1× PBS/0,1% Tween 20. После промывания планшетов 50 мкл/лунка каждого разведения сыворотки крови добавляли в планшеты, покрытые антигеном, в двух повторностях и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После промывания конъюгированное с HRP антитело к IgG (Invitrogen, PA1-84631) разводили (1:10000) в 10% FBS в 1X PBS/0,1% Tween 20 и 100 мкл/лунка добавляли в планшет. Затем планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки готовили раствор дигидрохлорида О-фенилендиамина с концентрацией 1 мг/мл (Sigma P9187) и добавляли по 100 мкл на лунку. Проявление останавливали добавлением 50 мкл на лунку 1M соляной кислоты (Fisher Chemical, J/4320/15) и измеряли оптическую плотность при 490 нм на планшет-ридере Molecular Devices Versamax с использованием Softmax (версия 7.0). Титры определяли методом определения конечного титра. Для каждого образца конечный титр определяется как величина, обратная наибольшему разведению образца, при котором значение (OD) превышает пороговое значение. Пороговое значение определяли для каждой экспериментальной группы как среднее значение OD+3SD для наивных образцов.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови и восстановление. PBMC выделяли из цельной крови, антикоагулированной гепарином (132 ЕД на 8 720 мл крови) (BD Biosciences, Оксфорд, Великобритания) с использованием стандартных методов. PBMC, выделенные из тканей, хранили при температуре -180°C. Для восстановления PBMC размораживали, промывали в среде R10 (состоящей из RPMI 1640 с добавлением 2 mM L-глутамин, 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10% термоинактивированной FBS) с 1 ЕД/мл ДНКазы (Sigma), ресуспендировали в среде R10 и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂.

ELISpot. Анализ ELISpot IFN γ использовали для оценки частоты и способности продуцировать IFN γ специфичными для SARS-CoV-2 Т-клетками в PBMC с использованием набора человеческого/обезьяньего IFN γ (MabTech, Nacka, Швеция), как описано ранее [Sibley, L.S., et al., ELISPOT Refinement Using Spot Morphology for Assessing Host Responses to Tuberculosis. *Cells*, 2012. 1(1): p. 5-14.]. Клетки анализировали при 2×10⁵ клеток на лунку. Клетки стимулировали в течение ночи пулами пептидов SARS-CoV-2, включающими спайковый белок ECD. Пять пулов пептидов представляли собой 748 используемых, состоящих из 15-мерных пептидов, перекрывающихся 9 аминокислотами. В качестве положительного контроля использовали форбол-12-миристан (Sigma) (100 нг/мл) и иономицин (CN Biosciences, 753, Ноттингем, Великобритания) (1 мг/мл). Результаты рассчитывали и сообщали в виде пятнообразующих единиц (SFU) на миллион клеток. Все пептиды SARS-CoV-2 анализировали в двух повторностях, а лунки только со средой вычитали для получения антигенспецифических SFU. Планшеты ELISPOT анализировали с помощью сканера CTL и программного обеспечения (CTL, Германия), а дальнейший анализ проводили с помощью GraphPad Prism (GraphPad Software, США).

Статистика.

Все статистические анализы проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 или 8 (Ла Хойя, Калифорния). Эти данные считались значимыми, если $p < 0,05$. Тип выполненного статистического анализа подробно описан в пояснении к фигуре. Никакие образцы или животные не были исключены из анализа.

Результаты.

Иммуногенность одно- и двухдозовых схем введения INO-4800. Двенадцать (6 самцов и 6 самок) макак-резус вакцинировали 1 дозой (6 животных) или 2 дозами (6 животных) INO-4800 в день 28 или день 0 и день 28 соответственно (фиг. 22A). Для каждой обработки внутривенно вводили 1 мг INO-4800 с последующим введением CELLECTRA-ID EP. Еще шесть животных того же возраста и пола не вакцинировали и они составляли контрольную группу. Животных наблюдали и оценивали как бодрствующих и здоровых на протяжении всего исследования, и у животных не было зарегистрировано никаких нежелательных явлений или клинических аномалий (фиг. 23). Титры сывороточных антител на основе IgG, реагирующих со спайковым антигеном SARS-CoV-2, у всех животных измеряли раз в две недели между днями 0 и 56. В группе, получавшей однократную дозу (INO-4800 X1), средний конечный титр 467 против тримерной формы ECD S1+S2 спайкового антигена SARS-CoV-2 и 442 против антигена RBD и живого вируса (Victoria/01/2020, сопоставимого с контрольным штаммом) титр нейтрализации 239 через 14 дней после вакцинации (фиг. 22B-D). В группе с 2 дозами (INO-4800 X2) средний конечный титр 2,142 против ECD S1+S2 и 1,538 против антигена RBD, а титр нейтрализации живого вируса 2,199 измеряли через 14 дней после 2-й вакцинации (фиг. 22B-D). Вакцинация INO-4800 индуцировала пиковые антигенспецифические Th1 Т-клеточные ответы SARS-CoV-2 в популяции PBMC, измеренные с помощью IFN- γ ELISpot (фиг. 22E). Таким образом, внутривенная доставка INO-4800 индуцировала функциональный гуморальный и Т-клеточный ответ против спайкового белка SARS-CoV-2, который проявлял бустерный эффект после второй дозы. В день стимуляции вирусом (день 56) уровень нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови был значительно выше в вакцинированных группах по сравнению с контрольной группой ($p=0,015$). После стимуляции вирусом наблюдалось небольшое увеличение титров связывающих и нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 во всех группах между днями 56 и 62-64 (фиг. 22B-D). В контрольной группе наблюдали усиление клеточного иммунного ответа на пептиды, ох-

ватывающие спайковый антиген SARS-CoV-2, после стимуляции вирусом, но небольшие изменения в вакцинированных группах, вероятно, из-за контроля вирусной инфекции гуморальным звеном иммунной системы хозяина (фиг. 22F).

Вирусная нагрузка в верхних и нижних дыхательных путях после стимуляции SARS-CoV-2.

В день 56 всех животных стимулировали в общей сложности 5×10^6 pfu SARS-CoV-2, доставленными как в верхние, так и в нижние дыхательные пути. Никаких явных клинических симптомов не наблюдали в течение всего времени (6-8 дней) стимуляции ни у одного из животных (фиг. 23A-23C). В указанные временные точки у животных брали мазки из носа и глотки. Геномный (вирусная РНК) и субгеномный (sgmRNA) вирус SARS-CoV-2, который представляет собой реплицирующийся вирус, измеряли с помощью RT-qPCR (фиг. 24A и 25A). Анализ уровней площади вирусной РНК под кривой (AUC) в глотке выявил значительно сниженные уровни в вакцинированных группах (фиг. 24B). Кроме того, пиковый уровень вирусной нагрузки, измеренный в группе INO-4800 X2, был значительно снижен по сравнению с контрольной группой (фиг. 24C). Анализ выявил значительную отрицательную корреляцию между вирусной нагрузкой в глотке и титрами нейтрализующих и антител на основе IgG к RBD (фиг. 15A-15D). Данные sgmRNA SARS-CoV-2 выявили аналогичную тенденцию к снижению вирусной нагрузки в вакцинированных группах по сравнению с контрольной группой (фиг. 25A-C). Анализ в носовом отделе выявил тенденцию к снижению и ускоренному клиренсу вирусной РНК и sgmRNA в вакцинированных группах по сравнению с контролем, но не достиг уровня значимости (фиг. 24D-F и 25D-F). Анализ выявил значимую отрицательную корреляцию между назальной вирусной нагрузкой и титрами нейтрализующих и антитела на основе IgG к RBD в день 3, но не в день 1 (фиг. 15E-15H).

Во время вскрытия (6-8 дней после контрольной стимуляции) у каждого животного собирали BAL. Измерение уровней вирусной РНК SARS-CoV-2 и sgmRNA выявило снижение средней концентрации вируса в вакцинированных группах, хотя уровни различались в каждой группе в зависимости от дня вскрытия (фиг. 26A, 26B). RT-qPCR также проводили на тканях, собранных при вскрытии. В эти временные точки после стимуляции уровни обнаруженной вирусной РНК SARS-CoV-2 были ниже предела количественного определения в большинстве тканей, кроме легких (фиг. 27). Измерения уровня мРНК вируса SARS-CoV-2 и sgmRNA, обнаруженных в образцах легочной ткани, показали снижение средней вирусной нагрузки у вакцинированных животных (фиг. 26C и 26D).

Суммарные данные показали значительное снижение вирусной нагрузки в глотке и тенденцию к снижению вирусной нагрузки в легких вакцинированных групп. Сбор образцов BAL и легочной ткани в разные временные точки (дни 6, 7 или 8) после контрольной стимуляции, вероятно, способствовал наблюдаемой внутригрупповой изменчивости, влияющей на статистический анализ. Данные RT-qPCR о вирусной нагрузке показывают, что вакцинация INO-4800 оказывает положительное влияние на снижение вирусной нагрузки у макаков-резус, стимулированных высокой дозой SARS-CoV-2, в целом более низкие уровни вируса измеряли в группе с 2 дозами вакцины по сравнению с группой с одной дозой вакцины.

Груз заболевания в легких после стимуляции SARS-CoV-2.

Груз легочного заболевания оценивали на собранных легочных тканях, собранных при вскрытии через 6-8 дней после контрольной стимуляции. Анализ проводили на всех животных в исследовании двойным слепым методом. Гистопатологический анализ легочной ткани проводили на тканях нескольких органов, но только в легких были обнаружены заметные поражения, совместимые с инфекцией SARS-CoV-2. Легочные поражения, соответствующие инфекции SARS-CoV-2, наблюдали в легких животных из невакцинированного контроля и при сниженном уровне в вакцинированных группах. Репрезентативные гистопатологические изображения представлены на Фиг. 28. Вкратце, паренхима легкого состояла из мультифокальных или сливающихся участков пневмонии, окруженных непораженной паренхимой. Альвеолярное повреждение с некрозом пневмоцитов было характерным признаком пораженных участков. Альвеолярные пространства и межальвеолярные перегородки содержали смешанные воспалительные клетки (включая макрофаги, лимфоциты, жизнеспособные и дегенерированные нейтрофилы и иногда эозинофилы) и отек. Гиперплазию пневмоцитов II типа также наблюдали в дистальных бронхиолах и бронхиоло-альвеолярных соединениях. В крупных дыхательных путях иногда наблюдали очаговую эпителиальную дегенерацию и отторжение дыхательного эпителия. Небольшое количество смешанных воспалительных клеток представляли собой нейтрофилы, лимфоидные клетки и иногда эозинофилы, инфильтрирующие стенки бронхов и бронхиол. В просвете некоторых дыхательных путей обнаружена слизь с примесью дегенеративных клеток, преимущественно нейтрофилов и эпителиоцитов. В паренхиме также наблюдали периваскулярные и перибронхиолярные инфильтраты, в основном лимфоидные клетки, составляющие инфильтраты.

Для количественной оценки груза заболевания применяли гистопатологическую оценку и процент площади ткани с положительной РНК SARS-CoV-2. Невакцинированная группа показала самые высокие гистопатологические оценки в легких по сравнению с вакцинированными группами (фиг. 29A и 29C). У животных из вакцинированных групп наблюдали меньшее количество патологии по сравнению с невакцинированными животными, за исключением животного № 10A из группы INO-4800X1, у которого гистопатологические индексы были сходны с таковыми у невакцинированных животных. Для обнаружения

присутствия РНК SARS-CoV-2 в легочной ткани проводили гибридизацию *in situ* (ISH). Вирусную РНК наблюдали в пневмоцитах и воспалительных клетках в пределах гистопатологических поражений с пониженной частотой у вакцинированных животных (фиг. 29B).

СТ сканирование выполняли, чтобы обеспечить прижизненный, несмещенный и поддающийся количественной оценке показатель заболевания легких. Результаты СТ визуализации легких, выполненной через 5 дней после стимуляции SARS-CoV-2, оценивали в отношении предмет наличия признаков заболевания COVID-19: помутнение по типу матового стекла (GGO), консолидация, нечеткое покрытие, узелки, перилобулярная консолидация; распределение - верхнее, среднее, нижнее, центральное 2/3, периферическое, бронхоцентрическое, а также при легочной эмболии. Медицинский радиолог не был осведомлен об обработке и клиническом состоянии животного. Степень поражения легких оценивали и количественно определяли с помощью системы оценки, разработанной для заболевания COVID. Параметры балльной системы приведены в разделе материалов и методов. Легочные аномалии, характерные для заболевания COVID-19, наблюдали у 3 из 6 и 2 из 6 животных в группах с одной или двумя дозами INO-4800 соответственно и у 5 из 6 невакцинированных животных в контрольной группе (репрезентативные СТ изображения представлены на Фиг. 30). Степень поражения легких у животных с вовлечением в заболевание составляла менее 25% и считали заболеванием низкого уровня (фиг. 29D). Наблюдали тенденцию к тому, что показатели заболевания были наиболее высокими в невакцинированной контрольной группе со снижением в группах, получавших одну и две дозы INO-4800 (фиг. 29E-29G). Сравнение показателей между группами не выявило статистической разницы ($p=0,0584$ между группой с двумя дозами INO-4800 и группой без вакцины, критерий Манна-Уитни). Одно выпадающее животное (10A) в группе INO-4800 X1 набрало больше баллов, чем другие животные. Тем не менее, уровень заболевания по-прежнему считался низким, и сопоставимый груз заболевания наблюдали в других исследованиях стимуляции NHP с использованием SARS-CoV-2, проведенных в тех же условиях. Таким образом, СТ обеспечивает пригодную меру заболевания, вызванного SARS-CoV-2, у макак-резус. В день 5 после стимуляции SARS-CoV-2 аномалии, если они присутствовали, регистрировали при низких уровнях (вовлечено <25% легких). Данные СТ свидетельствуют о тенденциях различий в грузе легочных заболеваний между группами, при этом грузе заболевания является наиболее высоким в невакцинированной контрольной группе.

Таким образом, после стимуляции высокой дозой SARS-CoV-2 отличных от человека приматов, груз заболевания снижался у животных, получавших одну или две дозы вакцины INO-4800. Какое-либо показание на заболевание, усиленное вакциной, даже у животных, получавших субоптимальную схему вакцинации одной дозой, отсутствовало.

Обсуждение.

В этом примере описываются оценки безопасности, иммуногенности и эффективности ДНК-вакцины SARS-CoV-2 INO-4800 в строгой модели стимуляции высокими дозами отличных от человека приматов. Внутрикожная доставка 1 мг INO-4800 макакам-резус индуцирует как гуморальный, так и Т-клеточный ответы против спайкового антигена SARS-CoV-2 как при 2-дозовой схеме, так и при 1-дозовой схеме. На протяжении всего исследования явных клинических явлений у животных зарегистрировано не было. После введения высокой дозы SARS-CoV-2 наблюдалось снижение вирусных нагрузок и груза легочных заболеваний как в группах с 1, так и 2 дозами вакцины, что подтверждает эффективность INO-4800. Важно отметить, что заболевание, усиленное вакциной (VED), не наблюдалось даже в группе, получавшей 1 дозу.

Модель макаки-резус стала широко используемой моделью для оценки медицинских контрамер против SARS-CoV-2. Важно отметить, что неадаптированный SARS-CoV-2 дикого типа реплицируется в дыхательных путях макак-резус, и животное проявляет некоторые характеристики, наблюдаемые у людей с легкими симптомами COVID-19 [Salguero, F.J., et al., Comparison of Rhesus and Cynomolgus macaques as an authentic model for COVID-19. 2020: p. 2020.09.17.301093.; Muñoz-Fontela, C, et al., Animal models for COVID-19. Nature, 2020. 586(7830): p. 509-515]. В данном документе основное внимание было уделено грузу заболевания легких у стимулированных SARS-CoV-2 макак-резус, которых вакцинировали INO-4800. В то время как уровень груза заболевания легких, измеренный у животных, был легким, наблюдали значительное снижение гистопатологических индексов и индексов обнаружения вируса в легких вакцинированных животных (фиг. 29). Это говорит о потенциальном положительном влиянии на заболевание LRT, которое наблюдается у пациентов с COVID-19, которые прогрессируют до тяжелой формы заболевания. Интересно, что также наблюдали значительное снижение вирусной нагрузки в глоточном отделе верхних дыхательных путей, но только тенденцию к снижению в носовом отделе. Возможно, существует дифференциальная индукция иммунитета слизистых оболочек между глоткой и носовым отделом. Интересно, что значительная отрицательная корреляция между нацеленными на RBD и нейтрализующими антителами в сыворотке крови с глоточной, но не назальной вирусной нагрузкой наблюдали в день 1 после стимуляции (фиг. 15). Однако уровни этих антител в любом из этих отделов URT не анализировали, чтобы предоставить дополнительные доказательства наличия повышенных уровней функциональных антител в глотке по сравнению с носовым проходом. Другая возможность может заключаться в том, что вирусный контроль в носовом отделе, куда непосредственно была инстиллирована

обширная (5×10^6 pfu) контрольная доза SARS-CoV-2, может быть более высоким, чем в других отделах слизистой оболочки. В подтверждение этого данные по контрольным животным показали, что мазки из носовой полости давали более высокие титры вируса, чем мазки из глотки, при этом аналогичные наблюдения регистрировали у пациентов с COVID-19 [Mohammadi, A., et al., SARS-CoV-2 detection in different respiratory sites: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine*, 2020. 59: p. 102903].

Важно отметить, что данные показали, что значительное респираторное заболевание (ERD) не было ассоциировано с иммунизацией INO-4800 ни по схеме с 1 дозой, ни по схеме с 2 дозами. В группе, получившей дозу INO-4800 X1, одно животное (10A) действительно имело наиболее высокий гистопатологический индекс легких и показатель СТ-сканирования. Однако многоочаговые поражения у животного 10A показали гистопатологический паттерн, аналогичный таковому у животных из невакцинированной группы, без явного притока различных субпопуляций воспалительных клеток в инфильтраты. Потенциальным признаком заболевания, усиленного вакциной, является повышенный приток воспалительных клеток, таких как эозинофилы [Bolles, M., et al., A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J Virol*, 2011. 85(23): p. 12201-15; Yasui, F., et al., Prior Immunization with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Associated Coronavirus (SARS-CoV) Nucleocapsid Protein Causes Severe Pneumonia in Mice Infected with SARS-CoV. *The Journal of Immunology*, 2008. 181(9): p. 6337-6348]. Считается, что данные СТ сканирования и гистопатологического анализа для животного 10A не ассоциированы с ERD, а скорее с индексом и паттерном заболевания, сходными с таковыми у невакцинированных животных. Сходные гистопатологические индексы воспаления легких, варьирующие от минимально-легких до легких и средних, были зарегистрированы в образцах, проанализированных через 7 или 8 дней после стимуляции у макак-резус, получивших другие вакцины-кандидаты [Corbett, K.S., et al., Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *New England Journal of Medicine*, 2020. 383(16): p. 1544-1555]. В настоящее время VED остается теоретической проблемой вакцинации против SARS-CoV-2, и попытки вызвать усиленное заболевание с использованием препарата цельного вируса SARS-CoV-2, инактивированного формалином, не смогли воспроизвести патологию легких, о которой ранее сообщалось для других инактивированных респираторных вирусных вакцин [Bewley, K.R., et al., Immunological and pathological outcomes of SARS-CoV-2 challenge after formalin-inactivated vaccine immunization of ferrets and rhesus macaques. 2020: p. 2020.12.21.423746].

Эти данные дополняют исследование заражения NHP SARS-CoV-2, которое продемонстрировало снижение вирусной нагрузки LRT через несколько месяцев после иммунизации INO-4800 (пример 9). Однако между исследованиями имеются явные различия, в том числе разные дозы и варианты, используемые для контрольного теста, а также время проведения контрольной стимуляции. В исследовании, описанном в этом примере, животное подвергали контрольной стимуляции через четыре недели после последней вакцинации во временной точке, когда присутствовали высокие уровни циркулирующих нейтрализующих антител. В другом исследовании уровень сывороточных нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 был низким во время стимуляции, защита, по-видимому, зависела от воспроизведения реакции памяти с сильным гуморальным и клеточным ответом против спайкового антигена SARS-CoV-2, обнаруженного у животных. В данном документе анamnестический ответ аналогичной величины не наблюдали, что позволяет предположить, что защита могла быть опосредована антителами, присутствующими в кровотоке во время стимуляции, что подтверждается корреляцией между уровнями антител, нацеленных на SARS-CoV-2, и снижением вирусной нагрузки. (фиг. 15).

В заключение, полученные в данном документе результаты на строгой доклинической животной модели SARS-CoV-2 обеспечивают дополнительное подтверждение эффективности и безопасности ДНК-вакцины INO-4800 в качестве профилактической контрмеры против COVID-19. Важно отметить, что при тестировании в качестве однократной иммунизации мы наблюдали положительное влияние на груз заболевания легких и отсутствие VED. В сочетании с клиническими данными INO-4800, INO-4800 обладает многими атрибутами с точки зрения безопасности, эффективности и логистической осуществимости благодаря своей высокой стабильности, что устраняет необходимость сложных требований к распределению холодной цепи для глобального доступа. Кроме того, технология синтетических ДНК-вакцин поддается значительному ускорению сроков разработки, что позволяет быстро разрабатывать и тестировать кандидатов против новых вариантов SARS-CoV-2, которые демонстрируют потенциал ускользания от иммунного ответа [Wibmer, C.K., et al., SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. 2021: p. 2021.01.18.427166.; Moore, J.P. and P.A. Offit, SARS-CoV-2 Vaccines and the Growing Threat of Viral Variants. *JAMA*, 2021].

Пример 9.

ДНК-вакцина SARS-COV-2 индуцирует гуморальный и клеточный иммунитет, приводя к реакциям памяти, которые обеспечивают амнестическую защиту при стимуляции макак-резус.

Иммуногенность синтетической ДНК-вакцины, кодирующей спайковый белок SARS-CoV-2, ранее была продемонстрирована как на мышах, так и на морских свинках (пример 1). В этом примере продемонстрирована устойчивость индуцированных INO-4800 иммунных ответов у макак-резус. Введение ID-EP у макак-резус индуцировало клеточные и гуморальные ответы на белок S SARS-Cov-2 с дополни-

тельной перекрестной реактивностью с белком S SARS-CoV-1. Защитная эффективность продемонстрирована более чем через 3 месяца после последней иммунизации, что свидетельствует об установлении амнестических иммунных ответов и снижении вирусной нагрузки у вакцинированных макаков. После заражения вирусом наблюдалось снижение вирусной нагрузки субгеномной матричной РНК (sgmRNA) BAL по сравнению с контрольными животными при введении 1 мг (1/5 дозы ДНК) посредством внутрикожной (ID) доставки. Это было связано с индукцией быстрого ответного ответа как в клеточном, так и в гуморальном иммунитете, что подтверждает потенциал кандидата INO-4800 для умеренного заболевания. Никаких нежелательных явлений или признаков болезни, вызванной вакциной (VED), у животных в вакцинированной группе не наблюдалось. Наблюдалось сниженные нагрузки вирусной субгеномной РНК в нижних отделах легких и нижних отделах VL. В носовой полости наблюдалась тенденция к снижению VL. Эти данные подтверждают, что иммунизация этой кандидатной ДНК-вакциной ограничивает активную репликацию вируса и потенциально может снизить тяжесть заболевания, а также уменьшить выделение вируса в носовой полости.

Важно отметить, что исходные вирусные нагрузки, обнаруженные у контрольных животных в этом исследовании, были в среднем на 1-2 log выше (10^9 PFU/мазок в 4/5 NHP в день 1 после стимуляции), чем в аналогичных опубликованных исследованиях, проводимых в идентичных условиях ($\sim 10^7$ PFU/мазок) (Yu et al., 2020, Science, eabc6284). Только два из ранее опубликованных исследований NHP включали интраназальную доставку в качестве пути введения при стимуляции (van Doremalen et al., 2020, bioRxiv 2020.05.13.093195; Yu et al., 2020, Science, eabc6284). Для обеспечения передачи инфекции часто используются высокие дозы контрольного инокулята, однако нелетальные системы, такие как эта модель макаки-резус SARS-CoV-2, могут искусственно снижать воздействие потенциально защитных вакцин и вмешательств (Durudas et al., 2011, Curr HIV Res 9, 276-288; Innis et al., 2019, Vaccine 37, 4830-4834). Несмотря на эти ограничения, это исследование продемонстрировало значительное снижение пика sgmRNA в BAL и общей вирусной РНК, вероятно, вызванное быстрой индукцией иммунологической памяти, опосредованной как В-, так и Т-клеточными компартментами. Wolfel et al. сообщили о назальных титрах у пациентов в среднем $6,5 \times 10^5$ копий/мазок через 1-5 дней после появления симптомов (Wolfel et al., 2020, Nature 557, 465-469). Эти титры значительно ниже, чем контрольная доза, и поддерживают потенциал вакцины-кандидата для контроля на ранних стадиях инфекции SARS-CoV-2.

Это исследование показывает, что ДНК-вакцинация вакциной-кандидатом, нацеленной на полно-размерный спайковый белок SARS-CoV-2, вероятно, повышает доступность иммунодоминантных эпитопов Т-клеток, что приводит к более широкому и более мощному иммунному ответу по сравнению с частичными доменами и усеченными иммуногенами. В этом исследовании наблюдалась перекрестная реактивность Т-клеток к SARS-CoV-1.

Помимо Т-клеток, INO-4800 индуцировал устойчивые ответы антител, которые быстро усиливались после стимуляции SARS-CoV-2. Также продемонстрировано, что INO-4800 индуцирует сильные ответы нейтрализующих антител против вариантов D614 и G614 SARS-CoV-2. Хотя сайт D/G 614 находится за пределами RBD, было высказано предположение, что этот сдвиг потенциально может влиять на антитела, вызванные вакциной (Korber B et al., 2020, Cell 182:1-16). В других исследованиях сообщается, что вариант G614 проявляет повышенную инфекционность SARS-CoV-2 (Hu et al., 2020, bioRxiv 2020.06.20.161323; Ozono S, 2020, bioRxiv 2020.06.15.151779). Данные показывают индукцию сопоставимых титров нейтрализации между вариантами D614 и G614 и то, что эти ответы сходным образом восстанавливаются после стимуляции SARS-CoV-2.

Материалы и методы.

Иммунизация приматов, отличных от человека, ELISpot и ELISA IFN γ .

ДНК-вакцина, INO-4800:

Высокооптимизированную последовательность ДНК, кодирующую IgE-спайковый белок SARS-CoV-2, создавали с использованием запатентованного Inovio алгоритма оптимизации генов *in silico* для повышения экспрессии и иммуногенности (Smith et al., 2020, Nat Commun 77, 2601). Синтезировали оптимизированную последовательность ДНК, расщепляли BamHI и XhoI и клонировали в вектор экспрессии pGX0001 под контролем непосредственно раннего промотора цитомегаловируса человека и сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста.

Животные:

Все эксперименты с макаками-резус были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию в Bioqual (Роквилл, Мэриленд), международной аккредитованной ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными (AAALAC). Забирали кровь для биохимического анализа крови, выделения РВМС, серологического анализа. BAL собирали на неделе 8 для анализа уровней антител в легких и в дни 1, 2, 4, 7 после контрольной стимуляции для анализа вирусной нагрузки в легких.

Иммунизации, сбор образцов и контрольная стимуляция вирусом. Десять китайских макаков-резус (весом от 4,55 кг до 5,55 кг) были случайным образом иммунизированы (3 самца и 2 самки) или наивными (2 самца и 3 самки). Иммунизированные макаки получили две инъекции по 1 мг ДНК-вакцины SARS-

CoV-2, INO-4800, на неделе 0 и 4 путем введения ID-EP с использованием устройства для адаптивной электропорации постоянным током CELLECTRA 2000® с массивом 3P (Inovio Pharmaceuticals). Кровь собирали в указанные временные точки для анализа химического состава крови, выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и собирали сыворотку крови для серологического анализа. На неделе 8 собирали бронхоальвеолярный лаваж для определения уровня легочных антител. BAL от наивных животных использовали в качестве контроля. На неделе 17 всех животных стимулировали $1,2 \times 10^8$ VP ($1,1 \times 10^4$ PFU) SARS-CoV-2. Вирус вводили по 1 мл интраназально (IN) (по 0,5 мл в каждую ноздрю) и по 1 мл интратрахеально (IT).

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови. Кровь собирали у каждой макаки в пробирки для приготовления клеток с цитратом натрия (CPT, BD Biosciences). Пробирки центрифугировали для разделения плазмы крови и лимфоцитов в соответствии с протоколом производителя. Образцы доставляли в тот же день в холодильных упаковках из Bioqual в Институт Wistar для выделения PBMC. PBMC промывали и удаляли остаточные эритроциты с использованием буфера для лизиса на основе хлорида аммония и калия (ACK). Клетки подсчитывали с использованием счетчика ViCell (Beckman Coulter) и ресуспендировали в среде RPMI 1640 (Corning), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Atlas) и 1% пенициллином/стрептомицином (Gibco). Затем свежие клетки высевали для анализа ELISpot IFN γ и проточной цитометрии.

Иммуноферментное иммунное пятно IFN- γ (ELISpot). Анализ интерферона гамма обезьяны (IFN- γ) ELISpot проводили для выявления клеточных ответов. Планшеты для ELISpotPro IFN- γ обезьян (щелочная фосфатаза) (Mabtech, Швеция, кат. № 3421M-2APW-10) блокировали в течение как минимум 2 часов с помощью RPMI 1640 (Corning) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина (R10). После выделения PBMC в каждую лунку добавляли 200000 клеток макак в присутствии 1) пулов перекрывающихся пептидов (15-меры с 9-мерами перекрываются), соответствующих спайковым белкам SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 или MERS-CoV (конечная концентрация 5 мкг/мл на лунка), 2) R10 с DMSO (отрицательный контроль) или 3) положительный контроль к CD3 (Mabtech, разведение 1:1000). Все образцы высевали в трех повторностях. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO $_2$. Через 18-20 часов планшеты промывали в PBS и проявляли пятна в соответствии с протоколом производителя. Пятна визуализировали с использованием планшет-ридера CTL Immunospot, и определяли антигенспецифические ответы путем вычитания числа пятен в лунке R10+DMSO с отрицательным контролем из лунок, стимулированных пулами пептидов.

ELISA связывания антигена.

Сыворотку крови и BAL собирали в каждой временной точке и оценивали титры связывания, как указано. Девяноста-шести-луночные иммуносорбентные планшеты (NUNC) покрывали 1 мкг/мл рекомбинантного белка ECD S1+S2 SARS-CoV-2 (Sino Biological 40589-V08B1), белка S1 (Sino Biological 40591-V08H), белка S2 (Sino Biological 40590-V08B) или белка рецептор-связывающего домена (RBD) (Sino Biological 40595-V05H) в DPBS в течение ночи при 4°C. Планшеты для ELISA также покрывали 1 мкг/мл рекомбинантного белка SARS-CoV S1 (Sino Biological 40150-V08B1) и белка RBD (Sino Biological 40592-V08B) или спайкового белка MERS-CoV (Sino Biological 40069-V08B). Планшеты промывали четыре раза PBS+0,05% Tween20 (PBS-T) и блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS-T (5% SM) в течение 90 минут при 37°C. Сыворотку или BAL от вакцинированных INO-4800 макак серийно разводили в 5% SM, добавляли в промытые планшеты для ELISA и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После инкубации планшеты промывали 4 раза PBS-T и конъюгированным с пероксидазой хрена антителом к IgG обезьян (Southern Biotech 4700-5). Планшеты промывали 4 раза PBS-T и добавляли к планшетам одностадийный раствор TMB (Sigma). Реакцию останавливали равным объемом 2 н. серной кислоты. Планшеты считывали при 450 нм и 570 нм в течение 30 минут после проявления с использованием планшет-ридера Biotek Synergy2.

ELISA конкуренции за ACE2, отличные от человека приматы. 96-луночные планшеты половинной площади (Corning) покрывали при комнатной температуре в течение 3 часов 1 мкг/мл антитела PolyRab к His (ThermoFisher, PA1-983B) с последующим блокированием в течение ночи блокирующим буфером, содержащим 1xPBS, 5% обезжиренного молока, 1% FBS и 0,2% Tween-20. Затем планшеты инкубировали с 10 мкг/мл His6x-меченого SARS-CoV-2 ("His6x", раскрытого как SEQ ID NO: 25), S1+S2 ECD (Sino Biological, 40589-V08B1) при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Сыворотку крови NHP (день 0 или неделя 6) серийно разводили в 3 раза 1X PBS, содержащей 1% FBS и 0,2% Tween, и предварительно смешивали с huACE2-IgMu при постоянной концентрации 0,4 мкг/мл. Затем в планшет добавляли премикс и инкубировали при к.т. в течение 1-2 часов. Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа с конъюгированным с HRP козьим антителом к IgG H+L (A90-116P, Beethyl Laboratories) в разведении 1:20000 с последующим добавлением одноэтапного ультрасубстрата TMB (ThermoFisher) и затем гасили 1M H $_2$ SO $_4$. Поглощение при 450 нм и 570 нм регистрировали с помощью планшет-ридера BioTEK.

Анализ ингибирования связывания рецептора ACE2 на основе проточной цитометрии. Клетки НЕК-293T, стабильно экспрессирующие ACE2-GFP, получали с использованием ретровирусной трансдукции.

После трансдукции клетки подвергали потоковой сортировке на основе экспрессии GFP для выделения GFP-положительных клеток. На этих клетках было выполнено клонирование отдельных клеток для создания клеточных линий с эквивалентной экспрессией ACE2-GFP. Для обнаружения ингибирования связывания спайков с ACE2 меченные S1+S2 ECD-his (Sino Biological, кат. № 40589-V08B1) инкубировали с сывороткой крови, собранной у вакцинированных животных в указанные временные точки, и разведениями в концентрации 2,5 мкг/мл на льду в течение 60 минут. Затем эту смесь переносили на 150000 клеток 293T-ACE2-GFP и инкубировали на льду в течение 90 минут. После этого клетки 2× промывали PBS с последующим окрашиванием конъюгированными антителом к his surelight® APC (Abcam, ab72579) в течение 30 минут на льду. В качестве положительного контроля спайковый белок предварительно инкубировали с рекомбинантным ACE2 человека перед переносом в клетки 293T-Ace2-GFP. Данные получали с помощью BD LSR II и анализировали с помощью FlowJo (версия 10).

Анализ нейтрализации псевдовирюсов. Псевдовирюс SARS-CoV-2 получали с использованием клеток HEK293T, трансфицированных GeneJammer (Agilent) с использованием плазмиды S IgE-SARS-CoV-2 (Genscript) и плазмиды pNL4-3.Luc.R-E-(реагент NIH AIDS) при соотношении 1:1. Через сорок восемь часов после трансфекции супернатант трансфекции собирали, обогащали FBS до конечного объема 12%, подвергали стерилизующей фильтрации (Millipore Sigma) и разделяли на аликвоты для хранения при -80°C. Анализ нейтрализации псевдовирюса SARS-Cov-2 проводили с использованием среды D10 (DMEM с добавлением 10% FBS и 1X пенициллина-стрептомицина) в 96-луночном формате. Клетки CHO, стабильно экспрессирующие Ace2, использовали в качестве клеточ-мишеней (Creative Biolabs, кат. № VCeL-Wyb019). Псевдовирюс SARS-Cov-2 титровали с получением более чем в 20 раз больше клеток, контролируемых только относительные единицы люминесценции (RLU) через 72 часа после стимуляции. Для проведения анализа нейтрализации 10000 клеток CHO-ACE2 помещали в 96-луночные планшеты в 100 мкл среды D10 и оставляли на ночь при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов. На следующий день сыворотки крови обезьян и кроликов из вакцинированных INO-4800 и контрольных групп инактивировали нагреванием и серийно разводили, при необходимости. Сыворотки крови инкубировали с фиксированным количеством псевдовирюса SARS-Cov-2 в течение 90 минут при к.т.. 50 мкл среды удаляли из лунок, содержащих клетки CHO-Ace2. Через 90 минут смесь добавляли к высевным клеткам CHO-Ace2 и инкубировали в стандартном инкубаторе (37% влажности, 5% CO₂) в течение 72 часов. Через 72 часа клетки лизировали с использованием системы анализа Britelite plus люминесценции репортерного гена (Perkin Elmer, кат. № 6066769) и измеряли RLU с помощью планшет-ридера Biotek. Титры нейтрализации (ID50) рассчитывали с помощью GraphPad Prism 8 и рассчитывали как обратное разведение сыворотки, при котором RLU снижались на 50% по сравнению с RLU в лунках с контролем вируса после вычитания фонового RLU в лунках с клеточным контролем.

Анализ вирусной РНК.

Анализ RT-PCR использовали для мониторинга вирусной нагрузки, по сути, как описано ранее (Abnink P et al 2019 Science). Вкратце, РНК экстрагировали с использованием QIAcube HT (Qiagen, Germany) и набора Cadog для патогенных НТ из супернатанта бронхоальвеолярного лаважа (BAL) и мазков из носовой полости. РНК подвергали обратной транскрипции с использованием Superscript VILO (Invitrogen) и проводили в двух повторностях с использованием системы ПНР в реальном времени QuantStudio 6 и 7 Flex (Applied Biosystems) в соответствии со спецификациями производителя. Вирусную нагрузку рассчитывали по копиям вирусной РНК на мл или на мазок, чувствительность анализа составляла 50 копий. Мишенью для амплификации был ген N SARS-CoV2 (нуклеокапсид). Праймеры и зонды для мишеней представляли собой: 2019-nCoV_N1-F:5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3' (SEQ ID NO: 18); 2019-nCoV_N1-R: 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3' (SEQ ID NO:19); 2019- nCoV_N1-P: 5'-FAM-ACCCCGCATTCGTTTGGTGGACC-BHQ1-3' (SEQ ID NO:20).

Анализ субгеномной мРНК. Субгеномную мРНК гена E SARS-CoV-2 (sgmRNA) оценивали с помощью RT-PCR с использованием подхода, аналогичного ранее описанному (Wolfel R et al. 2020, Nature, 581, 465-469). Для получения стандартной кривой sgmRNA гена E SARS-CoV-2 клонировали в экспрессирующую плазмиду pcDNA3.1; эту вставку транскрибировали с использованием набора для создания сообщений AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker Kit (Cellscript) для получения РНК для стандартов. Перед проведением RT-PCR образцы, взятые у стимулированных животных, или стандарты подвергали обратной транскрипции с использованием Superscript III VILO (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Разрабатывали специальный анализ экспрессии генов Taqman (ThermoFisher Scientific) с использованием последовательностей, нацеленных на sgmRNA гена E (18). Реакции проводили в системах ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 и 7 Flex (Applied Biosystems) в соответствии со спецификациями производителя. Стандартные кривые использовали для расчета sgmRNA в копиях на мл или на мазок; чувствительность количественного анализа составляла 50 копий на мл или на мазок.

Результаты.

Индукция гуморальных и клеточных иммунных ответов памяти у иммунизированных INO-4800 отличных от человека приматов. Отличные от человека приматы (NHP) являются ценной моделью для разработки вакцин и терапевтических средств против COVID-19, поскольку они могут быть инфицированы

SARS-CoV-2 дикого типа и иметь патологию, аналогичную человеческой (Chandrashekar et al., 2020, Science, eabc4776; Qin et al., 2005, J Pathol 206, 251-259; Yao et al., 2014, J Infect Dis 209, 236-242; Yu et al., 2020, Science, eabc6284). Макаки-резусы (n=5) получили две иммунизации INO-4800 (1 мг) на неделе 0 и неделе 4 (фиг. 33A). Наивные контрольные животные (n=5) не получали вакцину. Гуморальный и клеточный иммунный ответ отслеживали в течение 15 недель (~4 месяцев) после первичной иммунизации в отношении ответов памяти. У всех животных происходила сероконверсия после однократной иммунизации INO-4800, при этом титры IgG в сыворотке крови обнаруживали против полноразмерного внеклеточного домена (ECD) S1+S2, областей S1, S2 и RBD S-белка SARS-CoV-2 (фиг. 33B и Фиг. 33C). Также были обнаружены перекрестно-реактивные антитела к белку S1 SARS-CoV и RBD, но не к MERS-CoV (фиг. 34). SARS-CoV-2-реактивные IgG против ECD и RBD обнаруживали в смывах бронхоальвеолярного лаважа (BAL) на неделе 8 после иммунизации (фиг. 34).

В образцах сыворотки крови животных нейтрализующую активность псевдовirusа SARS-CoV-2 обнаруживали в течение >4 месяцев после иммунизации (фиг. 33D), демонстрируя титры памяти, сопоставимые с теми, которые наблюдали в других опубликованных исследованиях острой защиты у макак (Gao et al., 2020, Science 369, 77-81; Tian et al., 2020, Emerg Microbes Infect, 9:382-385; van Doremalen et al., 2020, bioRxiv 2020.05.13.093195; Yu et al., 2020, Science, eabc6284), и сообщалось о выздоравливающих людях (Ni et al., 2020, Immunity 52, 971-977 e973; Robbiani et al., 2020, Nature, s41586-020-2456-9). В ходе пандемии COVID-19 появился спайковый вариант D614G SARS-CoV-2, который имеет потенциально большую инфекционность, и в настоящее время на его долю приходится >80% новых изолятов (Korber B et al., 2020, Cell 182:1-16). Есть опасения, что вакцины, разработанные до появления этого варианта, могут не нейтрализовать вирус D614G. Поэтому нейтрализацию против этого нового варианта оценивали с использованием модифицированного псевдовirusа, экспрессирующего спайковый белок G614 (фиг. 33E). Сходные титры нейтрализации ID50 наблюдали в отношении пиков D614 и G614, что подтверждает индукцию INO-4800 функциональных ответов антител против преобладающего в настоящее время варианта SARS-CoV-2.

Для дальнейшего исследования нейтрализующей активности сыворотки крови также тестировали с использованием конкурентного ELISA ACE2, где сыворотки крови от 80% иммунизированных NHP ингибировали взаимодействие SARS-CoV-2 Spike-ACE2 (фиг. 33F). 100% макак отвечали в анализе ингибирования ACE2-293T с помощью проточной цитометрии, с 53-96% ингибированием взаимодействия спайковый белок-ACE2 при разведении 1:10 и 24-53% ингибированием при разведении 1:30 (фиг. 33G).

Иммунизация INO-4800 также индуцировала ответы Т-клеток, реагирующих с антигеном S SARS-CoV-2, против всех 5 пулов пептидов, при этом Т-клеточные ответы достигали пика на неделе 6, через две недели после второй иммунизации (0-518 SFU/миллион клеток) (фиг. 33H). Отчетливые иммуногенные эпитопные ответы обнаруживали в отношении областей RBD и S2 (фиг. 33B). Перекрестно-реактивные Т-клетки также были обнаружены против спайкового белка SARS-CoV (фиг. 36A). Однако перекрестная реактивность не наблюдали в отношении спайковых пептидов MERS-CoV, что подтверждает более низкую гомологию последовательностей между SARS-CoV-2 и MERS-CoV (фиг. 36B).

Индукционные вакциной ответы восстановления памяти при стимуляции SARS-CoV-2 у отличных от человека приматов. Макак, иммунизированных вакциной, вместе с невакцинированными контрольными животными стимулировали SARS-CoV-2 через 13 недель (~3 месяца) после последней иммунизации (неделя исследования 17, фиг. 37A). NHP получили контрольную дозу $1,1 \times 10^4$ PFU изолята SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 путем интраназальной и внутритрахеальной инокуляции, как описано ранее (Chandrashekar et al., 2020; Yu et al., 2020). После стимуляции вирусом у 3/5 вакцинированных INO-4800 животных наблюдали немедленное увеличение титра антител к полноразмерному ECD SARS-CoV-2. К дню 7 у 5/5 животных наблюдали увеличение титра антител как к полноразмерному ECD, так и к RBD (фиг. 37B). Через семь дней после стимуляции у иммунизированных животных наблюдали устойчивые средние геометрические конечные титры в диапазоне от 409600 до 1638400 по сравнению с наивной группой, в которой сероконверсию наблюдали только у 1/5 животных (GMT 100) (фиг. 37B). Значительное увеличение титров псевдонейтрализации наблюдали у всех животных, иммунизированных INO-4800 как против вариантов спайкового белка D614, так и G614 в день 7 после стимуляции (фиг. 37C).

Клеточные ответы оценивали до и после стимуляции. На неделе 15 ответы ELISpot IFN- γ значительно сократились по сравнению с пиковыми ответами, наблюдаемыми на неделе 6. Т-клеточные ответы увеличились в вакцинированной группе после стимуляции (~218,36 SFU/миллион клеток), что указывает на восстановление иммунологической Т-клеточной памяти (фиг. 38 и фиг. 39).

Защитная эффективность после стимуляции SARS-CoV-2. В более ранние временные точки после введения вируса при контрольной стимуляции обнаружение вирусной мРНК не позволяет провести различие между вводной стимуляцией инокулятом и активной инфекцией, в то время как уровни sgmRNA более вероятно отражают активную клеточную репликацию SARS-CoV-2 (Wolfel et al., 2020, Nature, 581, 465-469; Yu et al., 2020, Science, eabc6284). Субгеномную мРНК SARS-CoV-2 (sgmRNA) измеряли у невакцинированных контрольных и вакцинированных INO-4800 макак после стимуляции $1,1 \times 10^4$ PFU изолята SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 (фиг. 40). Пиковые нагрузки вирусной sgmRNA в BAL были значи-

тельно ниже в группе, вакцинированной INO-4800 (фиг. 40А и Фиг. 40В), наряду со значительно более низкими нагрузками вирусной РНК на в день 7 после стимуляции (фиг. 40С), что указывает на защиту от заболеваний нижних дыхательных путей. В то время как sgRNA обнаруживали в мазках из носовой полости как контрольных, так и вакцинированных INO-4800 животных (фиг. 40D-40F), уровни вирусной РНК имели тенденцию к снижению у животных, вакцинированных INO-4800, более чем на 2 log (фиг. 40F). В целом, снижение вирусной нагрузки, обеспечиваемое вакцинацией INO-4800, вероятно, связано с анamnестическими В- и Т-клеточными ответами, которые быстро возникают непосредственно после контакта с инфекцией SARS-CoV-2.

Следует понимать, что вышеизложенное подробное описание и прилагаемые примеры являются исключительно иллюстративными и их не следует воспринимать в качестве ограничений объема данного изобретения, которое определяется исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Различные изменения и модификации в пределах объема настоящего изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники. Такие изменения и модификации, в том числе, не ограничиваясь таковыми, относящимися к химическим структурам, заместителям, производным, посредникам, видам синтеза, композициям, составам или способам применения по настоящему изобретению, могут быть выполнены без отклонения от его сути и объема.

Иллюстративные варианты осуществления

Вариант осуществления 1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая спайковый антиген коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит:

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в нуклеотидах 55-3837 SEQ ID NO: 2;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 2;

последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 2; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 3;

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 5;

последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 6; или

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 2. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая спайковый антиген SARS-CoV-2, при этом спайковый антиген SARS-CoV-2 содержит:

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4;

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 4;

аминокислотную последовательность, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4; или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 3. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2.

Вариант осуществления 4. Вектор экспрессии по варианту осуществления 3, отличающийся тем, что указанная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторным элементом, выбранным из промотора и сигнала полиаденилирования.

Вариант осуществления 5. Вектор экспрессии по варианту осуществления 3 или варианту осуществления 4, отличающийся тем, что указанный вектор представляет собой плазмидный или вирусный вектор.

Вариант осуществления 6. Иммуногенная композиция, содержащая эффективное количество вектора экспрессии по любому из вариантов осуществления 3-5.

Вариант осуществления 7. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 6, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый наполнитель.

Вариант осуществления 8. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 7, отличающаяся тем, что указанный фармацевтически приемлемый наполнитель содержит буфер, необязательно солевой буфер на основе цитрата натрия.

Вариант осуществления 9. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 8, отличающаяся тем, что указанная композиция составлена в концентрации 10 мг на миллилитр буфера на основе цитрата натрия.

Вариант осуществления 10. Иммуногенная композиция по любому из вариантов осуществления 6-9, дополнительно содержащая адъювант.

Вариант осуществления 11. Спайковый антиген SARS-CoV-2, содержащий:

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4;

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 4;

аминокислотную последовательность, указанную в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4; или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 12. Вакцина для предупреждения или лечения инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), содержащая эффективное количество молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектор по любому из вариантов осуществления 3-5 или антиген по варианту осуществления 11.

Вариант осуществления 13. Вакцина по варианту осуществления 12, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый наполнитель.

Вариант осуществления 14. Вакцина по варианту осуществления 13, отличающаяся тем, что указанный фармацевтически приемлемый наполнитель содержит буфер, необязательно солевой буфер на основе цитрата натрия.

Вариант осуществления 15. Вакцина по варианту осуществления 14, составленная в концентрации 10 мг нуклеиновой кислоты на миллилитр солевого буфера на основе цитрата натрия.

Вариант осуществления 16. Вакцина по любому из вариантов осуществления 12-15, дополнительно содержащая адъювант.

Вариант осуществления 17. Способ индукции иммунного ответа против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по одному из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16.

Вариант осуществления 18. Способ защиты субъекта, нуждающегося в этом, от инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), включающий введение субъекту эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16.

Вариант осуществления 19. Способ защиты субъекта, нуждающегося в этом, от заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), включающий введение субъекту эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16.

Вариант осуществления 20. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, от инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), включающий введение субъекту эффективного количества молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16, при этом субъект устойчив к одному или несколь-

ким штаммам SARS-CoV-2.

Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов осуществления 17-20, отличающийся тем, что указанное введение включает по меньшей мере одно из электропорации и инъекции.

Вариант осуществления 22. Способ по любому из вариантов осуществления 17-20, отличающийся тем, что указанное введение включает парентеральное введение с последующей электропорацией.

Вариант осуществления 23. Способ по любому из вариантов осуществления 17-22, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят начальную дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг нуклеиновой кислоты, необязательно при этом начальная доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 24. Способ по варианту осуществления 23, отличающийся тем, что указанную последующую дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг нуклеиновой кислоты вводят субъекту через приблизительно четыре недели после введения начальной дозы, необязательно при этом последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 25. Способ по варианту осуществления 24, отличающийся тем, что одну или несколько указанных дополнительных последующих доз от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг нуклеиновой кислоты вводят субъекту через по меньшей мере двенадцать недель после введения начальной дозы, необязательно при этом дополнительная последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 26. Способ по любому из вариантов осуществления 17-25, включающий введение субъекту INO-4800 или его биосимиляра.

Вариант осуществления 27. Способ по любому из вариантов осуществления 17-26, дополнительно включающий введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного средства для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией SARS-CoV-2.

Вариант осуществления 28. Способ по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что указанную молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, иммуногенную композицию, антиген или вакцину вводят субъекту до введения дополнительного средства, одновременно с ним или после него.

Вариант осуществления 29. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16 в способе индукции иммунного ответа против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) у субъекта, нуждающегося в этом.

Вариант осуществления 30. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16 в способе защиты субъекта от инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2).

Вариант осуществления 31. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16 в способе защиты субъекта от заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2).

Вариант осуществления 32. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5, иммуногенной композиции по любому из вариантов осуществления 6-10, антигена по варианту осуществления 11 или вакцины по любому из вариантов осуществления 12-16 в способе лечения субъекта, нуждающегося в этом, от инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2).

Вариант осуществления 33. Применение по любому из вариантов осуществления 29-32 в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным средством для лечения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, или лечения или предупреждения заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией SARS-CoV-2.

Вариант осуществления 34. Применение по любому из вариантов осуществления 29-33, отличающееся тем, что указанную молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, иммуногенную композицию, антиген или вакцину вводят субъекту с помощью по меньшей мере одного из электропорации и инъекции.

Вариант осуществления 35. Применение по варианту осуществления 34, отличающееся тем, что указанную молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, иммуногенную композицию, антиген или вакцину вводят субъекту парентерально с последующей электропорацией.

Вариант осуществления 36. Применение по любому из вариантов осуществления 29-35, отличающееся тем, что указанному субъекту вводят начальную дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно

2,0 мг нуклеиновой кислоты, необязательно при этом начальная доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 37. Применение по варианту осуществления 36, отличающееся тем, что указанную последующую дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг нуклеиновой кислоты вводят субъекту через приблизительно четыре недели после введения начальной дозы, необязательно при этом последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 38. Применение по варианту осуществления 37, отличающееся тем, что указанную дополнительную последующую дозу от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 2,0 мг нуклеиновой кислоты вводят субъекту через по меньшей мере двенадцать недель после введения начальной дозы, необязательно при этом дополнительная последующая доза составляет 0,5 мг, 1,0 мг или 2,0 мг нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления 39. Применение по любому из вариантов осуществления 29-38, отличающееся тем, что указанная иммуногенная композиция представляет собой INO-4800 или ее биосимиляр.

Вариант осуществления 40. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по варианту осуществления 3-5 или антигена по варианту осуществления 11 при получении лекарственного препарата.

Вариант осуществления 41. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5 или антигена по варианту осуществления 11 в получении лекарственного препарата для лечения инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), или защиты от нее.

Вариант осуществления 42. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, вектора по любому из вариантов осуществления 3-5 или антигена по варианту осуществления 11 в получении лекарственного препарата для защиты субъекта, нуждающегося в этом, от заболевания или нарушения, ассоциированных с инфекцией, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2).

Вариант осуществления 43. Способ обнаружения устойчивого клеточного иммунного ответа у субъекта, при этом указанный способ включает стадии:

введения иммуногенной композиции для индукции иммунного ответа против антигена SARS-CoV-2 субъекту, нуждающемуся в этом;

выделения периферических мононуклеарных клеток (PBMC) у субъекта;

стимуляции выделенных PBMC с помощью спайкового антигена SARS-CoV-2, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичной по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности, указанной в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичной по всей длине SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичной по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичной по всей длине SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, указанной в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, их фрагмента, содержащего по меньшей мере 20 аминокислот; и обнаружения по меньшей мере одного из числа клеток, экспрессирующих цитокин, и уровня экспрессии цитокина.

Вариант осуществления 44. Способ по варианту осуществления 43, отличающийся тем, что указанную стадию обнаружения по меньшей мере одного из числа клеток, экспрессирующих цитокины, и уровня экспрессии цитокинов выполняют с использованием анализа, выбранного из группы, состоящей из метода иммуноферментных пятен (ELISpot) и анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием проточной цитометрии.

Вариант осуществления 45. Способ по варианту осуществления 43, отличающийся тем, что указанному субъекту вводят иммуногенную композицию, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в нуклеотидах 55-3837 SEQ ID NO: 2;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 2;

последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 2; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 3;

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную

по всей длине нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 5;

последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 5; последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5;

последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 6; и

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6.

Перечень последовательностей

Последовательность аминокислотной вставки pGX9501 консенсусного спайкового антигена SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) (лидерная последовательность IgE подчеркнута):

1 MDWTWILFLV AAATRVHSSQ CVNLTTRTQL PPAYTNSFTR GVYYDPKVFRR
 SSVLHSTQDL
 61 FLPFFSNVTW FHAIHVSGTN GTKRFDNPVL PFNDGVYFAS TEKSNIIRGW
 IFGTTLDLSDT
 121 QSLIVNAT NVVIKVCEFQ FCNDPFLGVY YHKNNKSWME SEFRVYSSAN
 NCTFEYVSSQ
 181 FLMDLEGKQG NFKNLREFVF KNIDGYFKIY SKHTPINLVR DLPQGFSALE
 PLVDLPIGIN
 241 ITRFQTLAL HRSYLTPGDS SSGWTAGAAA YYVGYLQPRF FLLKYNENGT
 ITDAVDCALD
 301 PLSEKCTLK SFTVEKGIYQ TSNFRVQPTF SIVRFPNITN LCPFGEVFNA
 TRFASVYAWN
 361 RKRISNCVAD YSVLYNSASF STFKCYGVSP TKLNDLCFTN VYADSFVIRG
 DEVRQIAPGQ
 421 TGKIADYNYK LPDDFTGCVI AWNSNNLDSK VGGNYNYLYR LFRKSNLKP
 ERDISTEIQ
 481 AGSTPCNGVE GFNCYFPLQS YGFQPTNGVG YQPYRVVLS FELLHAPATV
 CGPKKSTNLV
 541 KNKCVNFNFN GLTGTGVLTE SNKKFLPFQQ FGRDIADTTD AVRDPQTLEI
 LDITPCSFSG
 601 VSVITPGTNT SNQVAVLYQD VNCTEVPVAI HADQLTPTWR VYSTGSNVFQ
 TRAGCLIGAE
 661 HVNNSYECDI PIGAGICASY QTQTNSPRRA RSVASQSHH YTMSLGAENS
 VAYSNSIAI
 721 PTNFTISVTT EILPVSMTKT SVDCTMYICG DSTECSNLLL QYGSFCTQLN
 RALTGIAVEQ
 781 DKNTQEVFAQ VKQIYKTPPI KDFGGFNFSQ ILPDPSKPSK RSFIEDLLFN
 KVTLADAGFI
 841 KQYGDCLGDI AARDLICAQK FNGLTVLPLP LTDEMIAQYT SALLAGTITS
 GWTFGAGAAL
 901 QIPFAMQMAY RFNGIGVTQN VLYENQKLIH NQFNSAIGKI QDLSSTASA
 LGKLQDVVNQ
 961 NAQALNTLVK QLSSNFGAIS SVLNDILSRL DKVEAEVQID RLITGRLQSL
 QTYVTQQLIR
 1021 AAEIRASANL AATKMSECVL GQSKRVDFCG KGYHLMSFPQ
 SAPHGVVFLH VTYVPAQEKD
 1081 FTTAPAICHG GKAHFPREGV FVSNGTHWFV TQRNFYEPQI ITTDNTFVSG
 NCDVVIGIVN
 1141 NTVYDPLQPE LDSFKEELDK YFKNHTSPDV DLGDISGINA SVVNIQKEID
 RLNEVAKNLN
 1201 ESLIDLQELG KYEQYIKWPW YIWLGFIAGL IAIVMVTIML CCMTSCCSCL
 KGCCSCGSCC
 1261 KFEDEDDSEPV LKGVKLYHT

Последовательности вставки ДНК pGX9501 (SEQ ID NO: 2) (лидерная последовательность IgE подчеркнута):

1 ATGGATTGGA CTGGATTCT CTTTCTCGTT GCTGCAGCCA CACGCGTTCA
TAGCAGCCAG
 61 TGTGTGAACC TGACCACCAG AACACAGCTG CCTCCTGCCT
 ACACCAACAG CTTCACCAGA
 121 GGAGTCTACT ACCCAGACAA AGTCTTCAGA AGCTCTGTGC
 TGCACAGCAC CCAGGACCTG
 181 TTCCTGCCTT TCTTCAGCAA CGTGACCTGG TTCCACGCCA
 TCCACGTGTC TGGACCAAC
 241 GGCACCAAGA GATTTGACAA CCCTGTTCTT CCTTTCAATG
 ATGGCGTGTA CTTTGCCAGC
 301 ACAGAGAAGA GCAACATCAT CCGAGGCTGG ATCTTTGGCA
 CCACCCTGGA CAGCAAAACC
 361 CAGAGCCTGC TGATCGTGAA CAACGCCACC AACGTGGTCA
 TCAAGGTGTG TGAGTTCCAG
 421 TTCTGCAATG ACCCTTTCCT GGGCGTGTAC TACCACAAGA
 ACAACAAGTC CTGGATGGAG
 481 TCTGAGTTCA GAGTCTACAG CTCTGCCAAC AACTGCACAT
 TTGAATATGT GTCCCAGCCT
 541 TCCTGATGG ACCTGGAGGG CAAGCAGGGC AACTTTAAGA
 ACCTGAGAGA ATTTGTGTTT

601	AAGAACATCG	ATGGCTACTT	CAAGATCTAC	AGCAAGCACA
	CACCCATCAA	CCTGGTGAGA		
661	GACCTGCCTC	AGGGCTTCTC	TGCCCTGGAG	CCTCTGGTGG
	ACCTGCCCAT	CGGCATCAAC		
721	ATCACCAGAT	TCCAGACCCT	GCTGGCCCTG	CACAGAAGCT
	ACCTGACCCC	AGGAGACAGC		
781	AGCAGCGGCT	GGACAGCTGG	AGCTGCTGCC	TACTACGTGG
	GCTACCTGCA	GCCCAGGACC		
841	TTCCTGCTGA	AGTACAACGA	AAATGGCACC	ATCACAGATG
	CTGTTGACTG	TGCCCTGGAC		
901	CCTCTTAGCG	AGACCAAGTG	CACCCTGAAG	TCCTTCACAG
	TGGAGAAAGG	CATCTACCAG		
961	ACCAGCAACT	TCCGAGTGCA	GCCAACAGAG	AGCATCGTGA
	GATTTCAAA	CATCACCAAC		
1021	CTGTGCCCTT	TTGGAGAAGT	CTTCAATGCC	ACCAGATTTG
	CTTCTGTGTA	CGCCTGGAAC		
1081	AGAAAAAGAA	TCAGCAACTG	TGTGGCTGAC	TACTCTGTGC
	TGTACAATC	TGCCTCCTTC		
1141	TCCACCTTCA	AGTGCTATGG	AGTCTCTCCA	ACCAAGCTGA
	ATGACCTGTG	CTTCACCAAC		
1201	GTGTATGCTG	ACAGCTTTGT	GATCAGAGGA	GATGAAGTGC
	GGCAGATTGC	TCCTGGCCAG		
1261	ACAGGCAAGA	TTGCTGACTA	CAACTACAAG	CTGCCTGATG
	ACTTCACAGG	CTGTGTCATC		
1321	GCCTGGAACA	GCAACAACCT	GGACAGCAAG	GTGGGCGGCA
	ACTACAATA	CCTGTACAGA		
1381	CTTTTCAGGA	AGAGCAACCT	GAAGCCTTTT	GAAAGAGACA
	TCTCCACAGA	GATCTACCAG		
1441	GCTGGCAGCA	CACCCTGCAA	TGGTGTGGAA	GGCTTCAACT
	GCTACTTCCC	TCTGCAGAGC		
1501	TACGGCTTCC	AGCCAACAAA	TGGCGTGGGC	TACCAGCCTT
	ACAGAGTGGT	GGTGCTGTCC		
1561	TTTGAGCTGC	TGCACGCCCC	TGCCACAGTG	TGTGGCCCCA
	AGAAGAGCAC	CAACCTGGTG		
1621	AAGAACAAAT	GTGTGAACTT	CAATTTCAAT	GGCCTGACAG
	GCACAGGAGT	GCTGACAGAG		
1681	AGCAACAAGA	AGTTTCTTCC	TTTCCAGCAG	TTTGGAAGAG
	ACATTGCTGA	CACCACAGAT		
1741	GCTGTGAGAG	ATCCTCAGAC	CCTGGAGATC	CTGGATATCA
	CACCCTGCTC	CTTTGGAGGA		

1801	GTTTCTGTCA	TCACACCTGG	CACCAATACC	AGCAACCAAG
	TGGCTGTGCT	GTACCAAGAT		
1861	GTGAATTGCA	CAGAAGTGCC	TGTGGCCATC	CACGCTGACC
	AGCTGACACC	CACCTGGAGA		
1921	GTGTACAGCA	CAGGCAGCAA	TGTTTTCCAG	ACAAGAGCTG
	GCTGCCTGAT	TGGAGCAGAG		
1981	CACGTGAACA	ACAGCTATGA	ATGTGACATC	CCTATTGGAG
	CTGGCATCTG	TGCCAGCTAC		
2041	CAGACCCAAA	CCAACAGCCC	AAGAAGAGCC	AGATCTGTGG
	CCAGCCAGAG	CATCATCGCC		
2101	TACACCATGA	GCCTGGGAGC	TGAGAACTCT	GTGGCCTACA
	GCAACAACAG	CATCGCCATC		
2161	CCCACCAACT	TCACCATCTC	TGTGACCACA	GAGATCCTGC
	CTGTGTCCAT	GACCAAGACA		
2221	TCTGTGGACT	GCACCATGTA	CATCTGTGGA	GACAGCACAG
	AATGCAGCAA	CCTGCTGCTG		
2281	CAGTACGGCT	CCTTCTGCAC	CCAGCTGAAC	AGAGCCCTGA
	CAGGCATCGC	TGTGGAGCAG		
2341	GACAAGAACA	CACAGGAAGT	GTTTGCCCAG	GTGAAGCAGA
	TCTACAAAAC	ACCACCCATC		
2401	AAGACTTTG	GAGGCTTCAA	TTTCTCCCAA	ATCCTGCCTG
	ACCCAGCAA	GCCTTCCAAG		
2461	AGAAGCTTCA	TTGAAGACCT	GCTGTTCAAC	AAAGTGACCC
	TGGCTGATGC	TGGCTTCATC		
2521	AAGCAGTATG	GAGACTGCCT	GGGAGACATT	GCTGCCAGAG
	ACCTGATCTG	TGCCAGAAG		
2581	TTTAATGGCC	TGACTGTGCT	GCCTCCTCTG	CTGACAGATG
	AAATGATCGC	CCAGTACACA		
2641	TCTGCCCTGC	TGGCTGGCAC	CATCACCAGT	GGCTGGACAT
	TTGGAGCTGG	AGCTGCCCTG		
2701	CAGATCCCTT	TTGCCATGCA	GATGGCCTAC	AGATTTAATG
	GCATCGGCGT	GACCCAGAAC		
2761	GTGCTGTACG	AGAACCAGAA	GCTGATCGCC	AACCAGTTCA
	ACTCTGCCAT	CGGCAAGATC		
2821	CAGGACAGCC	TGAGCAGCAC	AGCCTCTGCC	CTGGGCAAGC
	TGCAGGATGT	GGTGAACCAA		
2881	AACGCCCAGG	CCCTGAACAC	CCTGGTGAAG	CAGCTGAGCA
	GCAACTTTGG	AGCCATCTCC		
2941	TCTGTGCTGA	ATGACATCCT	GAGCCGGCTG	GACAAGGTGG
	AAGCAGAAGT	GCAGATCGAC		

3001	AGACTCATCA	CAGGCCGCCT	GCAGAGCCTG	CAGACCTACG
	TGACCCAGCA	GCTGATCAGA		
3061	GCTGCTGAGA	TCCGGGCCTC	TGCCAACCTG	GCTGCCACCA
	AGATGTCAGA	ATGTGTGCTG		
3121	GGCCAGAGCA	AAAGAGTGGA	CTTCTGTGGC	AAAGGCTACC
	ACCTGATGTC	CTTCCCTCAG		
3181	TCTGCTCCTC	ACGGCGTGGT	GTTCTGCAC	GTGACCTACG
	TGCCTGCCCA	GGAGAAGAAC		
3241	TTCACCACAG	CTCCTGCCAT	CTGCCACGAT	GGCAAGGCC
	ACTTCCCAAG	AGAAGGTGTC		
3301	TTTGTGTCCA	ATGGCACCCA	CTGGTTCGTG	ACCCAGAGAA
	ACTTCTACGA	GCCTCAGATC		
3361	ATCACCACAG	ACAACACATT	TGTGTCTGGC	AACTGTGATG
	TGGTCATCGG	CATCGTGAAC		
3421	AACACAGTTT	ATGACCCTCT	GCAGCCTGAG	CTGGACAGCT
	TCAAAGAAGA	GCTGGACAAG		
3481	TACTTCAAGA	ACCACACATC	TCCAGATGTG	GACCTGGGAG
	ACATCTCTGG	CATCAATGCC		
3541	TCTGTGGTGA	ACATCCAGAA	GGAAATTGAC	AGGCTGAACG
	AAGTGCCAA	GAACCTGAAC		
3601	GAAAGCCTCA	TCGACCTGCA	GGAGCTGGGC	AAGTACGAGC
	AGTACATCAA	GTGGCCTTGG		
3661	TACATCTGGC	TGGGCTTCAT	CGCTGGCCTC	ATCGCCATCG
	TGATGGTGAC	CATCATGCTG		
3721	TGCTGCATGA	CCAGCTGCTG	CTCTGCCTG	AAGGGCTGCT
	GCAGCTGTGG	CAGCTGCTGC		
3781	AAGTTTGATG	AAGATGACTC	TGAGCCTGTG	CTGAAGGGCG
	TGAAGCTGCA	CTACACA		

Последовательность одонитевой ДНК pGX9501 (SEQ ID NO: 3):

```

1 gctgctcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagtatta
61 atagtaatca attacggggt cattagtca tagcccatat atggagtcc gcgttacata
121 acttacgta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgccat tgacgtcaat
181 aatgacgtat gttccatag taacccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga
241 gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc
301 ccctattgac gteaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt
361 atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtat
421 gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag
481 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaatcaac gggactttcc
541 aaaatgtcgt aacaactccg ccccaatgac gcaaatgggc ggttagcctg tacggtggga
601 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgctfact ggcttatcga

```

661 aattaatacg actactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttgg
 721 accgagctcg gatccggccac catggattgg acttggattc tcttctcgt tgctgcagcc
 781 acacgcgttc atagcagcca gtgtgtgaac ctgaccacca gaacacagct gcctcctgcc
 841 tacaccaaca gcttcaccag aggagtctac taccagaca aagtctcag aagctctgtg
 901 ctgcagaca cccaggacct gttctgcct tcttcagca acgtgacctg gttccacgcc
 961 atccacgtgt ctggaccaaa cggcaccaag agattgaca accctgtct tctttcaat
 1021 gatggcgtgt acttggccag cacagagaag agcaacatca tccgaggctg gatcttggc
 1081 accaccctgg acagcaaaaac ccagagcctg ctgacgtga acaacggccac caactgggtc
 1141 atcaagggtg gtgagttcca gttctgcaat gacccttcc tgggcgtga ctaccacaag
 1201 aacaacaagt cctggatgga gtctgagttc agagtctaca gctctgcca caactgcaca
 1261 ttgaaatag tgcccagcc tttcctgatg gacctggagg gcaagcaggg caactttaa
 1321 aactgagag aattgtgtt caagaacatc gatggctact tcaagatca cagcaagcac
 1381 acaccatca acctggtgag agacctgcct cagggtctt ctgcctgga gcctctgtg
 1441 gacctgcca tcggatcaa catcaccaga ttccagacc tgctggcct gcacagaagc
 1501 tacctgacc caggagacag cagcagcggc tggacagctg gagctgctg ctactactg
 1561 ggctacctg agcccaggac ctctctgctg aagtacaacg aaaatggac catcacagat
 1621 gctgttact gtgccctgga ccctcttagc gagaccaagt gcaccctgaa gtccttaca
 1681 gtggagaaag gcatctacca gaccagcaac ttccgagtgc agccaacaga gagcatcgtg
 1741 agattccaa acatcacaa cctgtgccct ttggagaag tcttcaatgc caccagatt
 1801 gcttctgtg acgctggaa cagaaaaaga atcagcaact gtgtggctga ctactctgtg
 1861 ctgtacaact ctgcctcct ctccacctc aagtctatg gagtctctc aaccaagctg
 1921 aatgacctgt gcttaccaa cgtgtatgct gacagcttg tgatcagagg agatgaagtg
 1981 cggcagattg ctctggcca gacagcaag attgctgact acaactaca gctgcctgat
 2041 gacttcacag gctgtgcat cgcctggaac agcaacaacc tggacagcaa ggtggcggc
 2101 aactacaact acctgtacag actttcagg aagagcaacc tgaagcctt tgaagagac
 2161 atctccacag agatctacca ggctggcagc acacctgca atgggtgga aggcttcaac
 2221 tgtacttcc ctctcagag ctacggctc cagccaacaa atggcgtggg ctaccagct
 2281 tacagagtg tggtgctgct cttgagctg ctgacgccc ctgccacagt gttggcccc
 2341 aagaagagca ccaacctggt gaagaacaaa tgttgaact tcaattcaa tggcctgaca
 2401 ggcacaggag tgctgacaga gagcaacaag aagttcttc ctctccagca gtttgaaga
 2461 gacattgctg acaccacaga tctgtgaga gatcctcaga ccctggagat cctggatc
 2521 acacctgct ctttggagg agtttctgct atcacctg gcaccaatac cagcaacaa
 2581 gtggctgtg ctaccaaga tgtgaattgc acagaagtgc ctgtggccat ccacgtgac
 2641 cagctgacac ccacctggag agtgtacagc acaggcagca atgtttcca gacaagagct
 2701 ggctgcctga ttggagcaga gcagtgaaac aacagctatg aatgtgacat ccctattgga
 2761 gctgcatct gtgccagcta ccagaccaa accaacagcc caagaagagc cagatctgtg
 2821 gccagccaga gcatcctgc ctacacctg agcctgggag ctgagaactc tgtggcctac
 2881 agcaacaaca gcatcggcat cccaccaac ttaccatct ctgtgaccac agagatcctg
 2941 cctgttcca tgaccaagac atctgtggac tgcacctgt acatctgtg agacagcaca
 3001 gaatgcagca acctgctgct gcagtacggc tcttctgca cccagctgaa cagagccctg

3061 acaggcatcg ctgtggagca ggacaagaac acacaggaag tgtttgccca ggtgaagcag
 3121 atctacaaaa caccacccat caaggacttt ggaggcttca atttctcca aatcctgct
 3181 gaccccagca agccttcaa gagaagcttc attgaagacc tgctgttcaa caaagtgacc
 3241 ctggctgatg ctggcttcat caagcagtat ggagactgcc tgggagacat tgctccaga
 3301 gacctgatct gtgccagaa gttaatggc ctgactgtgc tgccctctct gctgacagat
 3361 gaaatgatcg cccagtacac atctgccctg ctggctggca ccatcaccag tggctggaca
 3421 ttggagctg gagctgccct gcagatccct ttgcatgc agatggccta cagattaat
 3481 ggcatcggcg tgaccagaa cgtgctgtac gagaaccaga agctgatcgc caaccagttc
 3541 aactctgcca tcggcaagat ccaggacagc ctgagcagca cagcctctgc cctgggcaag
 3601 ctgcaggatg tgggaaacca aaacgccag gcctgaaca cctggtgaa gcagctgagc
 3661 agcaactttg gagccatctc ctctgtctg aatgacatcc tgagccgct ggacaagtg
 3721 gaagcagaag tgcagatcga cagactcacc acaggccgcc tgagagcct gcagacctac
 3781 gtgaccagc agctgatcag agctgctgag atccgggct ctgccaacct ggtgccacc
 3841 aagatgtcag aatgtgtct gggccagagc aaaagagtgg acttctgtg caaaggctac
 3901 cacctgatgt ccttccctca gtctgtctc cacggcgtgg ttttctgca cgtgacctac
 3961 gtgcctgccc aggagaagaa cttaccaca gctcctgcca tctgccacga tggcaaggcc
 4021 cactcccaa gagaaggtgt cttgtgtcc aatggcacc actggtcgt gaccagaga
 4081 aactctacg agcctcagat catcaccaca gacaacacat ttgtgtctgg caactgtgat
 4141 gtggtcatcg gcatcgtgaa caacacagtt tatgacctc tgacagctga gctggacagc
 4201 ttcaagaag agctggaca gtactcaag aaccacacat ctccagatgt ggacctggga
 4261 gacatctctg gcatcaatgc ctctgtgtg aacatccaga aggaattga caggctgaac
 4321 gaagtggcca agaactgaa cgaaagcctc atcgacctgc aggagctggg caagtacgag
 4381 cagtacatca agtggccttg gtacatctgg ctggctca tcgctgctc catgccatc
 4441 gtgatgggta ccatcatgct gtgctgcatg accagctgct gctcttgcct gaaggctgc
 4501 tgacagctg gcagctgctg caagtgtgat gaagatgact ctgagcctgt gctgaagggc
 4561 gtgaagctgc actacacatg ataactcgag tctagagggc ccgttfaac ccgctgatca
 4621 gcctcactg tgcctttag ttgccagcca tctgtgtt gccctcccc cgtccttcc
 4681 ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc cttcctaataaaaatgagga aattgcatcg
 4741 cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tgggacagga cagcaagggg
 4801 gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgagg tggctctat ggcttctact
 4861 gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tgggagcggc tctgtaagg
 4921 ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttctgccc gccaaaggatc tgatggcga
 4981 ggggatcaag ctctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg
 5041 gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggac
 5101 aacagacaat cggctgctct gatgccgccc tgttccggct gtcagcgag gggcgccgg
 5161 ttctttgt caagaccgac ctgtccgggt ccctgaatga actgcaagac gaggcagcg
 5221 ggctatctg gctggccacg acggcggttc cttgcgcagc tgtgctgac gttgctactg
 5281 aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc
 5341 acctgtctcc tggcgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcg ctgcatacgc
 5401 ttgatccggc tacctccca ttcgaccacc aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta

5461 ctcgatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg
 5521 cgccagccga actgttcgcc aggcctcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg
 5581 tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aatggccgc ttttctggat
 5641 tcatgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctacc
 5701 gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctctg ctttacggta
 5761 tcgccgtcc cgattcgag cgcatgcct tctatcgct tctgacgag tttctgaa
 5821 ttattaacgc ttacaattc ctgatcggt atttctcct tacgcatctg tgcggtatt
 5881 cacaccgcat caggtggcac tttcgggga aatgtcgcg gaaccctat ttgtttatt
 5941 tttaaatat attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgctcaa
 6001 taatagcagc tgcataaact tcattttaa tttaaagga tctagtgaa gatcctttt
 6061 gataatctca tgacaaaat cccttaactg gagtttctg tccactgagc gtcagacccc
 6121 gtataaaaga tcaagatc tcttgagat cttttttc tgcgcgtaat ctgctgctg
 6181 caaacaataa aaccaccgt accagcggg gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact
 6241 cttttccga agtaactgg ctccagcaga gcgagatac caaatactg tctttagtg
 6301 tagccgtagt tagccacca ctcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg
 6361 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtctac cgggtggac
 6421 tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cgtcgggct gaacggggg tctgtgcaca
 6481 cagcccagct tggagcgaac gacctacac gaactgagat acctacagc tgagctatga
 6541 gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaa cggcagggg
 6601 ggaacaggag agcgcacgag ggagctcca ggggaaacg cctggtatct ttatagctc
 6661 gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgc agggggcgg
 6721 agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacggt tctggcctt ttgctgcct
 6781 tttgctaca tgttctt

Последовательность аминокислотной вставки рGX9503 постороннего спайкового антигена SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 4) (лидерная последовательность IgE подчеркнута):

1 MDWTWILFLV AAATRVHSSQ CVNLTTRTQL PPAYTNSFTR GVYYDPKVFR
 SSVLHSTQDL
 61 FLPFFSNVTW FHAIHVSQTN GTKRFDNPVL PFNDGVYFAS TEKSNIIRGW
 IFGTTLDST
 121 QSLIVNAT NVVIKVEFQ FCNDPFLGVY YHKNNKSWME SEFRVYSSAN
 NCTFEYVSP
 181 FLMDEGKQG NFKNLREFVF KNIDGYFKIY SKHTPINLVR DLPQGFSALE
 PLVDLPIGIN
 241 ITRFQTLAL HRSYLTPGDS SSGWTAGAAA YYVGYLQPRF FLLKYNENGT
 ITVAVACALD
 301 PLSETKCTLK SFTVEKGIYQ TSNFRVQPTF SIVRFPNITN LCPFGEVFNA
 TRFASVYAWN
 361 RKRISNCVAD YSVLYNSASF STFKCYGVSP TKLNDLCFTN VYADSFVIRG
 DEVRQIAPGQ
 421 TGKIADYNYK LPDDFTGCVI AWNSNNLDSK VGGNYNYLYR LFRKSNLKP

ERDISTEIQ
 481 AGSTPCNGVE GFNCYFPLQS YGFQPTNGVG YQPYRVVVLV FELLHAPATV
 CGPKKSTNLV
 541 KNKCVNFNFN GLTGTGVLTE SNKKFLPFQQ FGRDIADTTD AVRDPQTLEI
 LDITPCSFEGG
 601 VSVITPGANT SNQVTVLYQD VNCTEVPVAI HADQLTPTWR VYSTGSNVFK
 TRAGCLIGAE
 661 HVNNSYECDI PIGAGICASY QTQNSPRRA RSTASQSIIA YTMSLGAENS
 VAYSNNSIVI
 721 PTNFTISVTT EILPVSMTKT SVDCTMYICS DSTECSNPLL QYGSFCTQLN
 RALTGIAVEQ
 781 DKNTQEVEFAQ VKQIYKTPPI KDFGGFNFSQ ILPDPSKPSK RSFIEDLLFN
 KVTLADAGFI
 841 KQYGDCLGDI AARDLICAQK ENGLTVLPLP LTDEMIAQYT SALLAGTITS
 GWTFGAGAAL
 901 QIPFAMQMAY RFNGIRVTQN VLYENQKLIQ NQFNSAIGKI QDLSSTASA
 LGKLQDVVNQ
 961 NAQALNTLVK QLSSTFSTIS SVLNDILSRL DKVEAEVQID RLITGRLQSL
 QTYVVTQQLIR
 1021 AAEIRASANL KATKMSECVL GQSKRVDFCG KGYHLMSPFQ
 SAPHGVVFLH VTYVPAQEKV
 1081 FTTAPATCHD GKAFHPREGV FVSNGTHWFV TQRNFDEPQI ITTDNTFVSG
 NCDVVIGIVN
 1141 NTVYDPLQPE LDSFKEELDK YFKNHTSPDV DLGDISGINA SVVNIQKEID
 RLNEVAKNLN
 1201 ESLIDLQELG KYEQYIKWPW YIWLGFIAGL IAIVMVTIML CCMTSCCSCL
 KGCCSCGSCC
 1261 KFDEDDSEPV LKGVKLHYT

Последовательности вставки ДНК рGX9503 (SEQ ID NO: 5) (лидерная последовательность IgE подчеркнута):

1 ATGGATTGGA CCTGGATTCT TTTTCTCGTT GCAGCTGCTA CACGCGTTCA
TAGCAGCCAG
 61 TGTGTGAACC TGACCACCAG AACACAGCTG CCTCCTGCCT
 ACACCAACAG CTCACCAGA
 121 GGAGTCTACT ACCCAGACAA GGTGTTGAGA AGCTCTGTGC
 TGCACAGCAC CCAGGACCTC
 181 TTCCTGCCTT TCTCAGCAA CGTGACCTGG TTCCACGCCA
 TCCACGTGTC TGGACCAAC
 241 GGCACCAAGA GATTTGACAA CCCTGTGCTG CCTTTCAATG
 ATGGTGTGTA CTTTGCCAGC

301	ACAGAGAAGA	GCAACATCAT	CCGAGGCTGG	ATCTTTGGCA
	CCACCCTGGA	CAGCAAAACA		
361	CAGAGCCTGC	TGATCGTGAA	TAATGCCACC	AACGTGGTCA
	TCAAGGTGTG	TGAGTTCCAG		
421	TTCTGCAATG	ACCCTTTCCT	GGGCGTGTAC	TACCACAAGA
	ACAACAAGTC	CTGGATGGAG		
481	TCTGAGTTCC	GAGTGTACAG	CTCTGCCAAC	AACTGCACAT
	TTGAATATGT	GTCCCAGCCT		
541	TTCTGATGG	ACCTGGAGGG	CAAGCAGGGC	AATTTCAAGA
	ACCTGAGAGA	ATTTGTGTTT		
601	AAGAACATCG	ATGGCTACTT	CAAGATCTAC	AGCAAGCACA
	CACCCATCAA	CCTGGTGAGA		
661	GATCTTCCTC	AGGGCTTCTC	TGCCCTGGAG	CCTCTGGTGG
	ACCTGCCCCA	CGGCATCAAC		
721	ATCACCCGCT	TTCAGACCCT	GCTGGCCCTG	CACAGAAGCT
	ACCTGACCCC	AGGAGACAGC		
781	AGCAGCGGCT	GGACAGCTGG	AGCTGCTGCC	TACTACGTGG
	GCTACCTGCA	GCCAAGAACC		
841	TTCCTGCTGA	AGTACAACGA	AAATGGCACC	ATCACTGTGG
	CTGTGGCCTG	TGCCCTGGAC		
901	CCTCTTTCTG	AGACCAAGTG	CACCCTGAAG	TCCTTCACAG
	TGGAGAAAGG	CATCTACCAG		
961	ACCAGCAACT	TCAGAGTTCA	GCCAACAGAG	AGCATCGTGA
	GATTTCCAAA	CATCACCAAC		
1021	CTGTGTCCTT	TTGGAGAAGT	CTTCAATGCC	ACCAGATTTG
	CTTCTGTGTA	CGCCTGGAAC		
1081	AGAAAAAGAA	TCAGCAACTG	TGTGGCTGAC	TACTCTGTGC
	TGTACAACCT	TGCCTCCTTC		
1141	TCCACCTTCA	AGTGCTACGG	TGTGTCTCCT	ACCAAGCTGA
	ATGACCTGTG	CTTCACCAAC		
1201	GTGTATGCTG	ACAGCTTTGT	CATCAGAGGA	GATGAAGTGC
	GGCAGATCGC	CCCTGGCCAG		
1261	ACAGGCAAGA	TTGCTGACTA	CAACTACAAG	CTGCCTGATG
	ACTTCACAGG	CTGTGTCATC		
1321	GCCTGGAACA	GCAACAACCT	GGACAGCAAG	GTGGGCGGCA
	ACTACAACCTA	CCTGTACAGA		
1381	CTTTTCAGGA	AGAGCAACCT	GAAGCCTTTT	GAAAGAGACA
	TCTCCACAGA	GATCTACCAG		
1441	GCTGGCAGCA	CACCCTGCAA	TGGAGTGGAA	GGCTTCAACT
	GCTACTTCCC	TCTGCAGAGC		

1501	TACGGCTTCC	AGCCCACCAA	TGGCGTGGGC	TACCAGCCTT
	ACAGAGTGGT	GGTGCTGTCC		
1561	TTTGAGCTGC	TGCACGCCCC	TGCCACAGTG	TGTGGCCCCA
	AGAAGAGCAC	CAACCTGGTG		
1621	AAGAACAAAT	GTGTGAACTT	CAATTTCAAT	GGCCTGACAG
	GCACAGGAGT	GCTGACAGAG		
1681	AGCAACAAGA	AGTTCCTGCC	TTCCAGCAG	TTGGGAAGAG
	ACATTGCTGA	CACCACAGAT		
1741	GCTGTGAGAG	ATCCTCAGAC	CCTGGAGATC	CTGGACATCA
	CACCCTGCTC	CTTTGGAGGA		
1801	GTTTCTGTCA	TCACACCTGG	AGCCAACACC	AGCAACCAAG
	TGACAGTGCT	GTACCAAGAT		
1861	GTGAACTGCA	CAGAAGTTCC	TGTGGCCATC	CACGCTGACC
	AGCTGACCCC	AACCTGGAGA		
1921	GTCTACAGCA	CAGGCAGCAA	CGTGTTTAAA	ACAAGAGCTG
	GCTGCCTGAT	TGGAGCAGAG		
1981	CACGTGAACA	ACAGCTATGA	ATGTGACATC	CCTATTGGAG
	CTGGCATCTG	TGCCAGCTAC		
2041	CAGACCCAAA	CCAACAGCCC	AAGAAGAGCC	AGGAGCACAG
	CCAGCCAGAG	CATCATCGCC		
2101	TACACCATGA	GCCTGGGAGC	AGAGAACTCT	GTGGCCTACA
	GCAACAACAG	CATCGTCATC		
2161	CCCACCAACT	TCACCATCTC	TGTGACCACA	GAGATCCTGC
	CTGTGTCCAT	GACCAAGACA		
2221	TCTGTGGACT	GCACCATGTA	CATCTGCAGT	GACAGCACAG
	AATGCAGCAA	CCCTCTGCTG		
2281	CAGTACGGCT	CCTTCTGCAC	CCAGCTGAAC	AGAGCCCTGA
	CAGGCATCGC	TGTGGAGCAG		
2341	GACAAGAACA	CACAGGAAGT	GTTTGCCCAG	GTGAAGCAGA
	TCTACAAAAC	ACCACCCATC		
2401	AAGGACTTTG	GAGGCTTCAA	CTTCTCCCAG	ATCCTGCCTG
	ACCCCAGCAA	GCCCAGCAAG		
2461	AGAAGCTTCA	TTGAAGACCT	GCTGTTCAAC	AAAGTGACCC
	TGGCTGATGC	TGGCTTCATC		
2521	AAACAATATG	GAGACTGCCT	GGGAGACATT	GCTGCCAGAG
	ACCTGATCTG	TGCCAGAAG		
2581	TTTAATGGCC	TGACTGTGCT	GCCTCCTCTG	CTGACAGATG
	AAATGATCGC	CCAGTACACA		
2641	TCTGCCCTGC	TGGCTGGCAC	CATCACATCT	GGCTGGACAT
	TTGGAGCTGG	AGCTGCCCTG		

2701	CAGATCCCTT	TTGCCATGCA	GATGGCCTAC	AGATTTAATG
	GCATCAGAGT	GACCCAGAAC		
2761	GTGCTGTATG	AAAACCAGAA	GCTGATCGCC	AACCAGTTCA
	ACTCTGCCAT	CGGCAAGATC		
2821	CAGGACAGCC	TGAGCAGCAC	AGCCTCTGCC	CTGGGCAAGC
	TGCAGGATGT	GGTGAACCAA		
2881	AATGCCCAGG	CCCTGAACAC	CCTGGTGAAG	CAGCTGAGCA
	GCACCTTCTC	CACCATCTCC		
2941	AGCGTGCTGA	ATGACATCCT	GAGCCGGCTG	GACAAGGTGG
	AAGCTGAGGT	GCAGATCGAC		
3001	AGACTCATCA	CAGGCCGGCT	GCAGAGCCTG	CAGACCTACG
	TGACCCAGCA	GCTGATCAGA		
3061	GCTGCTGAGA	TCAGAGCTTC	TGCCAACCTG	AAGGCCACCA
	AGATGTCAGA	ATGTGTGCTG		
3121	GGCCAGAGCA	AGAGAGTGGA	CTTCTGTGGC	AAAGGCTACC
	ACCTGATGTC	CTTCCCTCAG		
3181	TCTGCTCCTC	ACGGCGTGGT	GTTCTGCAC	GTGACCTACG
	TGCCTGCCCA	GGAGAAGAAC		
3241	TTCACCACAG	CTCCTGCCAC	CTGCCACGAT	GGCAAAGCCC
	ACTTCCCAAG	AGAAGGCGTC		
3301	TTTGTGTCCA	ATGGCACCCA	CTGGTTCGTG	ACCCAGAGAA
	ACTTTGATGA	GCCTCAGATC		
3361	ATCACCACAG	ACAACACATT	TGTTTCTGGC	AACTGTGATG
	TGGTCATCGG	CATCGTGAAC		
3421	AACACAGTTT	ATGACCCTCT	GCAGCCTGAG	CTGGACAGCT
	TCAAAGAAGA	GCTGGACAAG		
3481	TACTTCAAGA	ACCACACATC	TCCAGATGTG	GACCTGGGAG
	ACATCTCTGG	CATCAATGCC		
3541	TCTGTGGTGA	ACATCCAGAA	GGAAATTGAC	AGGCTGAACG
	AAGTGCCAA	GAACCTGAAC		
3601	GAAAGCCTCA	TCGACCTGCA	GGAGCTGGGC	AAGTACGAGC
	AGTACATCAA	GTGGCCTTGG		
3661	TACATCTGGC	TGGGCTTCAT	TGCTGGCCTC	ATCGCCATCG
	TGATGGTGAC	CATCATGCTG		
3721	TGCTGCATGA	CCAGCTGCTG	CTCTTGCCTG	AAGGGCTGCT
	GCAGCTGTGG	CAGCTGCTGC		
3781	AAGTTTGATG	AAGATGACTC	TGAGCCTGTG	CTGAAGGGCG
	TGAAGCTGCA	CTACACA		

Последовательность односторонней ДНК pGX9503 (SEQ ID NO: 6):

1 gctgcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagtatta

61 atagtaatca attacggggt cattagtca tagccatat atggagtcc gcgtacata
 121 acttacgta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgccat tgacgtcaat
 181 aatgacgtat gttccatag taacccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggtgga
 241 gtattacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc
 301 ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagt acatgacct
 361 atgggacttt cctactggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat
 421 gcggttttg cagfacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag
 481 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gtttggcac caaatcaac gggactttcc
 541 aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga
 601 ggtctatata agcagagctc tctgctaac tagagaaccc actgcttact gcttatcga
 661 aattaatcg actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttgg
 721 accgagctcg gatcccccac catggattgg acctggattc ttttctctg tgcagctgct
 781 acacgcgttc atagcagcca gtgtgtgaac ctgaccacca gaacacagct gcctcctgcc
 841 tacaccaaca gttcaccag aggagtctac taccagaca aggtgttcag aagctctgtg
 901 ctgcacagca cccaggacct cttctgcct ttctcagca acgtgacctg gttccacgcc
 961 atccacgtgt ctggcaccia cggcacciaag agattgaca acctgtgct gccttcaat
 1021 gatgggtgt actttgccag cacagagaag agcaacatca tccaggcctg gatctttggc
 1081 accacctgg acagcaaac acagagcctg ctgactgta ataatgccac caacgtggc
 1141 atcaagggtg gtgagtcca gttctgcaat gacctttcc tgggcgtgta ctaccacaag
 1201 aacaacaagt cctggatgga gtctgagttc cgagtgtaca gctctgcaa caactgcaca
 1261 tttgaatag tgtccagcc ttctctgat gacctggagg gcaagcaggg caattcaag
 1321 aactgagag aatttgtgt caagaacatc gatggctact tcaagatcta cagcaagcac
 1381 acaccatca acctggtgag agatcttct caggccttct ctgccctgga gcctctggtg
 1441 gacctgcca tggcatcaa catcacccgc tttagacc ctgctggcct gcacagaagc
 1501 tacctgacc caggagacag cagcagcggc tggacagctg gagctgtgc ctactacgtg
 1561 ggctactgc agccaagaac cttctgctg aagtacaacg aaaatggcac catcactgtg
 1621 gctgtggcct gtgccctgga ccctcttct gagaccaagt gcacctgaa gtccttaca
 1681 gtggagaaa gcatctacca gaccagcaac tttagagttc agccaacaga gagcatcgtg
 1741 agatttcaa acataccaa cctgtctct tttggagaag tctcaatgc caccagatt
 1801 gctctgtgt acgcctgga cagaaaaaga atcagcaact gtgtggctga ctactctgtg
 1861 ctgtacaact ctgcctcct ctccacctc aagtgtacg gtgtgtctcc taccaagctg
 1921 aatgacctgt gttcaccia cgtgtatgct gacagcttg tcatcagagg agatgaagtg
 1981 cggcagatcg ccctggcca gacaggaag attgtgact acaactaca gctgctgat
 2041 gacttcacag gctgtgcat cgcctggaac agcaacaacc tggacagcaa ggtgggaggc
 2101 aactacaact acctgtacag actttcagg aagagcaacc tgaagcctt tgaagagac
 2161 atctccacag agatctacca ggctggcagc acacctgca atggagtgga aggttcaac
 2221 tgctacttcc ctctgagag ctacggcttc cagcccacca atggcgtgg ctaccagcct
 2281 tacagagtgg tgggtgtgc cttttagctg ctgcacgcc ctgccacagt gtgtgcccc
 2341 aagaagagca ccaacctggt gaagaacaaa tgtgtgaact tcaattcaa tggcctgaca
 2401 ggcacaggag tgctgacaga gagcaacaag aagtctctgc cttccagca gtttgaaga

2461 gacattgctg acaccacaga tgctgtgaga gatcctcaga ccctggagat cctggacatc
 2521 acaccctgct cctftggagg agtttctgtc atcacacctg gagccaacac cagcaaccaa
 2581 gtgacagtgc tgtaccaaga tgtgaactgc acagaagttc ctgtggccat ccacgctgac
 2641 cagctgacct caacctggag agtctacagc acaggcagca acgtgtttaa aacaagagct
 2701 ggctgcctga ttggagcaga gcacgtgaac aacagctatg aatgtgacat ccctattgga
 2761 gctggcatct gtgacagcta ccagacccaa accaacagcc caagaagagc caggagcaca
 2821 gccagccaga gcatcatcgc ctacacatg agcctgggag cagagaactc tgtggcctac
 2881 agcaacaaca gcatcgtcat cccaccaac ttcacatct ctgtgaccac agagatcctg
 2941 cctgtgtcca tgaccaagac atctgtggac tgcacatgt acatctgacg tgacagcaca
 3001 gaatgcagca accctctgct gcagtacggc tcctctgca cccagctgaa cagagccctg
 3061 acaggcatcg ctgtggagca ggacaagaac acacaggaag tgtttgccca ggtgaagcag
 3121 atctacaaa caccacccat caaggacttt ggaggcttca acttctcca gatcctgctc
 3181 gacccagca agccagcaa gagaagcttc attgaagacc tgctgttaa caaagtgacc
 3241 ctggctgatg ctggcttcat caaacaatat ggagactgcc tgggagacat tgctgccaga
 3301 gacctgatct gtgccagaa gtttaattggc ctgactgtgc tgcctcctct gctgacagat
 3361 gaaatgatcg cccagtacac atctgccctg ctggctggca ccatcacatc tggctggaca
 3421 tttggagctg gagctgcctt gcagatcctt tttccatgc agatggccta cagattaat
 3481 ggcatcagag tgaccagaa cgtgctgtat gaaaaccaga agctgatcgc caaccagttc
 3541 aactctgcca tcggcaagat ccaggacagc ctgagcagca cagcctctgc cctgggcaag
 3601 ctgcaggatg tggtaacca aatgccag gccctgaaca ccctggtgaa gcagctgagc
 3661 agcacctct ccaccatctc cagcgtgctg aatgacatcc tgagccggct ggacaaggtg
 3721 gaagctgagg tgcagatcga cagactcgc acagccggc tgcagagcct gcagacctac
 3781 gtgaccagc agctgatcag agctctgag atcagagctt ctgccaacct gaagggcacc
 3841 aagatgtcag aatgtgtct gggccagagc aagagatgg acttctgtg caaaggctac
 3901 cacctgatgt ccttccctca gtctgctct cacggcgtgg tgttctgca cgtgacctac
 3961 gtgcctgccc aggagaagaa cttaccaca gctcctgcca cctgccagca tggcaaaagg
 4021 cacttcccaa gagaaggcgt cttgtgtcc aatggcacc actggttctg gaccagaga
 4081 aactttgatg agcctcagat catcaccaca gacaacacat ttttctgg caactgtgat
 4141 gtgtcatcg gcatcgtgaa caacacagtt tatgacctc tgcagcctga gctggacagc
 4201 ttcaagaag agctggacaa gtactcaag aaccacacat ctccagatgt ggacctggga
 4261 gacatctctg gcatcaatgc ctctgtgtg aacatccaga aggaaattga caggctgaac
 4321 gaagtggcca agaacctgaa cgaagcctc atcgacctgc aggagctggg caagtacgag
 4381 cagtacatca agtggcctt gtacatctgg ctgggcttca ttgctggcct catgccatc
 4441 gtgatgtgga ccatcatgct gtgctgcatg accagctgct gctcttgcct gaagggctgc
 4501 tgcagctgtg gcagctgctg caagttgat gaagatgact ctgacacctg gctgaagggc
 4561 gtgaagctgc actacacatg ataactcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgata
 4621 gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgtgttt gccctcccc cgtgccttcc
 4681 ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc ctttctaataaaaatgagga aattgcatcg
 4741 catgtctga gtagggtca ttctattctg gggggggggg tggggcagga cagcaagggg
 4801 gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgagg tgggctctat ggcttact

4861 gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc tggggcgccc tctgtaagg
 4921 ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttctgcc gccaaaggatc tgatggcgca
 4981 ggggatcaag cctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg
 5041 gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct atcggctat gactgggcac
 5101 aacgacaaat cggctgctct gatgccgccc tgttccggct gtcagcgagc gggcgcccgg
 5161 ttcttttgt caagaccgac ctgtccggcg ccctgaatga actgcaagac gaggcagcgc
 5221 ggctatcgtg gctggccacg acggcgcttc ctgcccagc tgtgctcgac gttgtcactg
 5281 aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc
 5341 accttctcc tggcgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc
 5401 ttgatccggc tacctgcca ttcgaccacc aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta
 5461 ctcgatgga agccggctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg
 5521 cgccagccga actgttccg aggcctcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg
 5581 tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccc ttttctggt
 5641 tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctacc
 5701 gtgatattgc tgaagagctt gggggcgaat gggctgacc cttctctgt cttacggta
 5761 tcgccgctcc cgattcgag cgcatcgct tctatcgct tctgacgag ttcttctgaa
 5821 ttattaacgc ttacaattc ctgatcggt atttctcct tacgcatctg tgcggtatt
 5881 cacaccgcat caggtgccac tttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatt
 5941 ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgctcaa
 6001 taatagcacg tgctaaaact tcatitttaa ttaaaagga tctagtgaa gatcctttt
 6061 gataatctca tgacaaaat ccttaactg gattttctg tccactgagc gtcagacccc
 6121 gtgaaaaaga tcaaaagatc tcttgagat cttttttc tgcgcgtaat ctgctgctg
 6181 caaacaacaa aaccaccgct accagcggcg gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact
 6241 tttttccga aggtaactgg ctcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt
 6301 tagccgtagt taggccacca ctcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg
 6361 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac
 6421 tcaagacgat agttaccgga taaggcgagc cggctgggct gaacgggggg ttcgtgcaca
 6481 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga
 6541 gaaagcgcca cgttcccga agggagaaag gcggacaggt atccgtaag cggcagggtc
 6601 ggaacaggag agcgcacgag ggagctcca ggggaaacg cctggtatct ttatgtct
 6661 gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc agggggcg
 6721 agcctatgga aaaacgccag caacgggccc ttttacggt tctggcctt ttgctgcct
 6781 tttgctcaca tgttct

SEQ ID NO: 7, pGX9501, прямой праймер

CAGGACAAGAACACACAGGAA

SEQ ID NO: 8, pGX9501, обратный праймер

CAGGCAGGATTTGGGAGAAA

SEQ ID NO: 9, pGX9501, зонд

ACCCATCAAGGACTTTGGAGG

SEQ ID NO: 10, pGX9503, прямой праймер

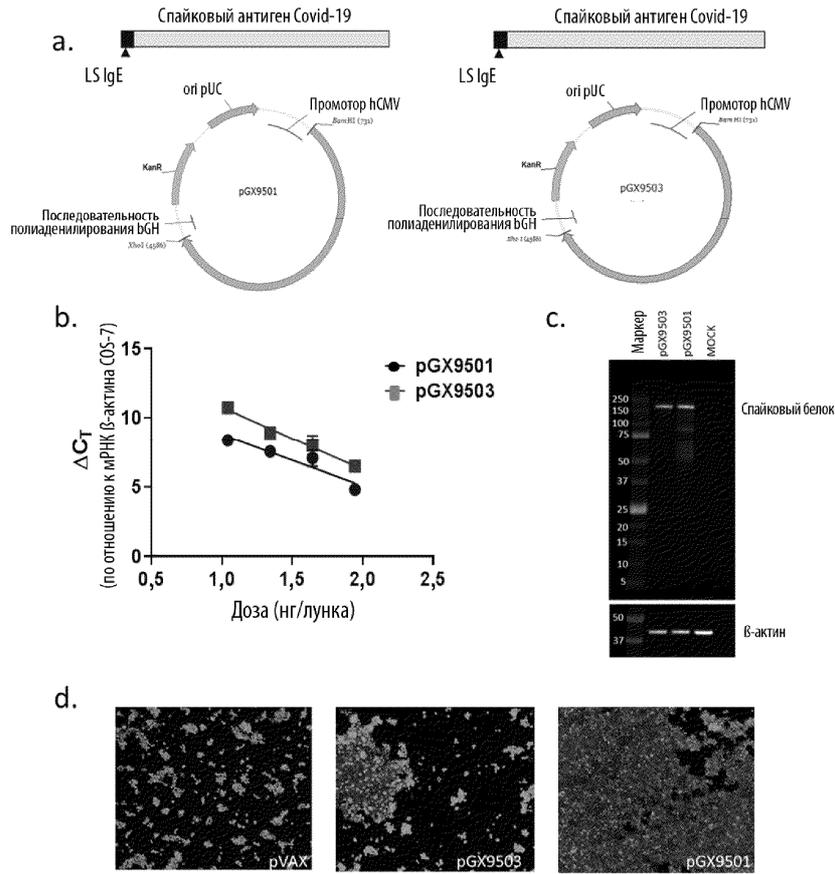
AGGACAAGAACACACAGGAAG;
 SEQ ID NO: 11, pGX9503, обратный праймер
 CAGGATCTGGGAGAAGTTGAAG
 SEQ ID NO: 12, pGX9503, зонд
 ACACCACCCATCAAGGACTTTGGA
 SEQ ID NO: 13 β-актин, прямой праймер
 GTGACGTGGACATCCGTAАА
 SEQ ID NO: 14, β-актин, обратный праймер
 CAGGGCAGTAATCTCCTTCTG
 SEQ ID NO: 15, β-актин, зонд
 TACCCTGGCATTGCTGACAGGATG
 SEQ ID NO: 16
 PHGVVFLHV
 SEQ ID NO: 17
 VVFLHVTVYV
 SEQ ID NO:18: 2019-nCoV_N1-F
 5'-GACCCCAAАATCAGCGAAAT-3'
 SEQ ID NO:19: 2019-nCoV_N1-R
 5'-TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG-3'
 SEQ ID NO:20: 2019-nCoV_N1-P
 5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3'
 SEQ ID NO:21: 2019-nCoV_sgE-forward
 5' CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC 3'
 SEQ ID NO:22: 2019-nCoV_sgE-reverse
 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACA 3'
 SEQ ID NO:23: 2019-nCoV_sgE-probe
 5' FAM- AСACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 3'

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

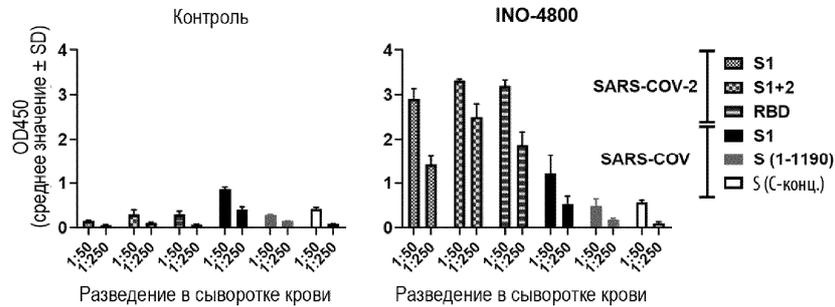
1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая спайковый антиген коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит:
 - последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в нуклеотидах 55-3837 SEQ ID NO: 2;
 - последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере приблизительно 99% идентичную по всей длине SEQ ID NO: 2;
 - последовательность нуклеиновой кислоты из нуклеотидов 55-3837 SEQ ID NO: 2; или последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2.
2. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.
3. Вектор экспрессии по п.2, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3.
4. Иммуногенная композиция, содержащая эффективное количество вектора экспрессии по п.2 и фармацевтически приемлемый наполнитель.
5. Иммуногенная композиция по п.4, отличающаяся тем, что указанный фармацевтически приемлемый наполнитель содержит буфер, необязательно солевой буфер на основе цитрата натрия.
6. Иммуногенная композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит 10 мг вектора на миллилитр солевого буфера на основе цитрата натрия.
7. Иммуногенная композиция по любому из пп.4-6, дополнительно содержащая адъювант.
8. Способ индукции иммунного ответа против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.4-7.
9. Способ защиты субъекта, нуждающегося в этом, от инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.4-7.
10. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, от инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), включающий введение субъекту эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп.4-7, при этом субъект за счет этого устойчив к одному или нескольким штаммам SARS-CoV-2.
11. Способ по любому из пп.8-10, отличающийся тем, что указанное введение включает по меньшей

шей мере приблизительно 90% идентичной по всей длине остатков 19-1279 SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичной по всей длине SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, указанной в остатках 19-1279 SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, их фрагмента, содержащего по меньшей мере 20 аминокислот; и обнаружения по меньшей мере одного из числа клеток, экспрессирующих цитокин, и уровня экспрессии цитокина.

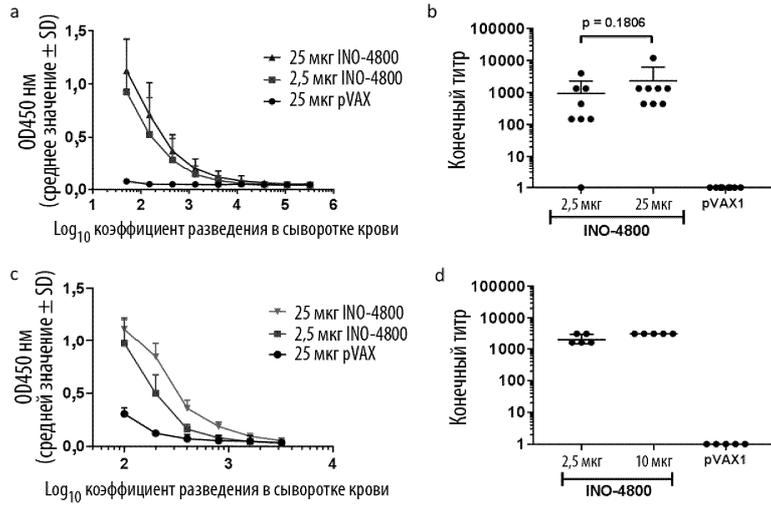
31. Способ по п.30, отличающийся тем, что указанную стадию обнаружения по меньшей мере одного из числа клеток, экспрессирующих цитокины, и уровня экспрессии цитокинов выполняют с использованием анализа, выбранного из группы, состоящей из метода иммуноферментных пятен (ELISpot) и анализа внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием проточной цитометрии.



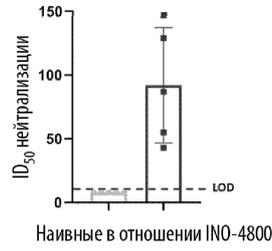
Фиг. 1



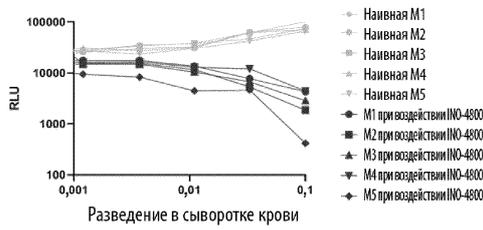
Фиг. 2



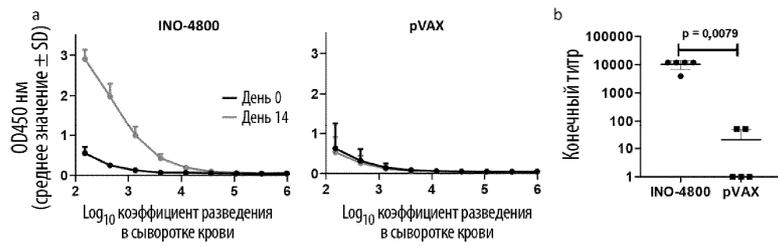
Фиг. 3



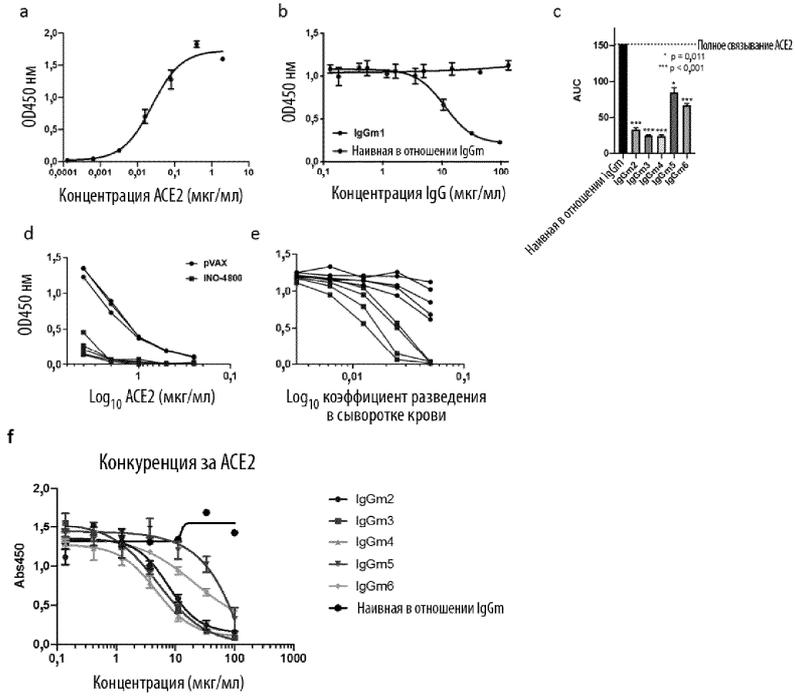
Фиг. 4А



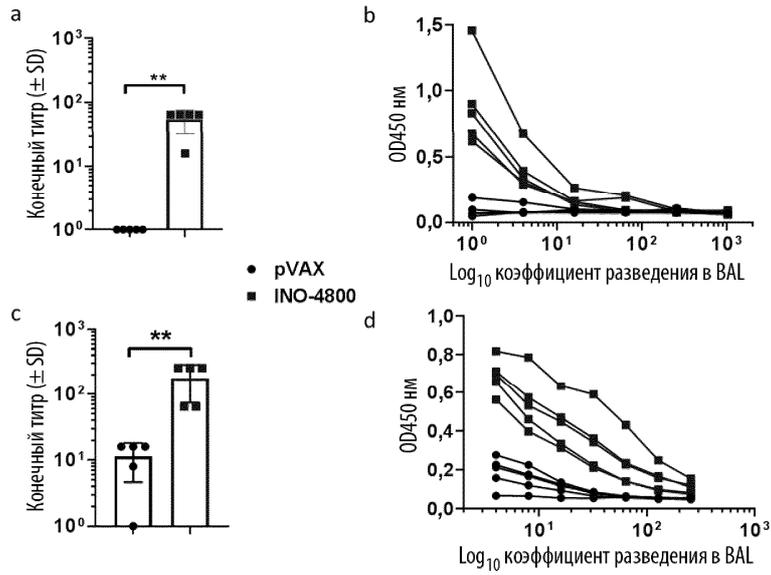
Фиг. 4В



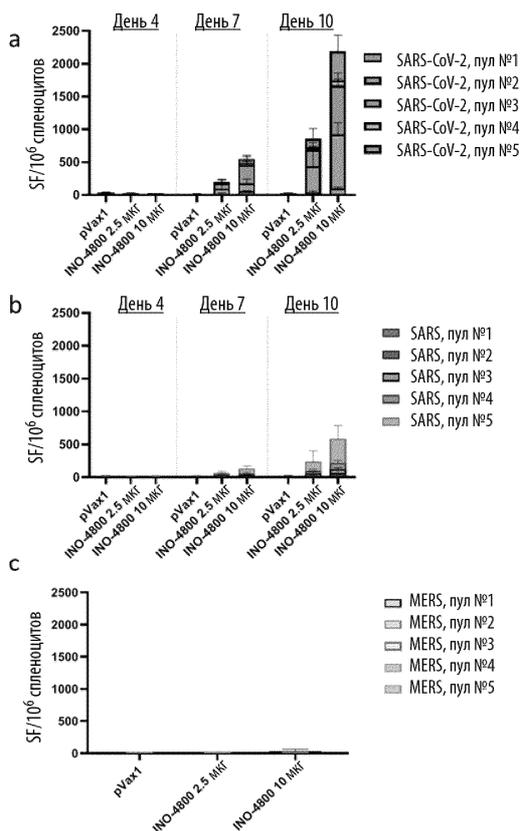
Фиг. 5



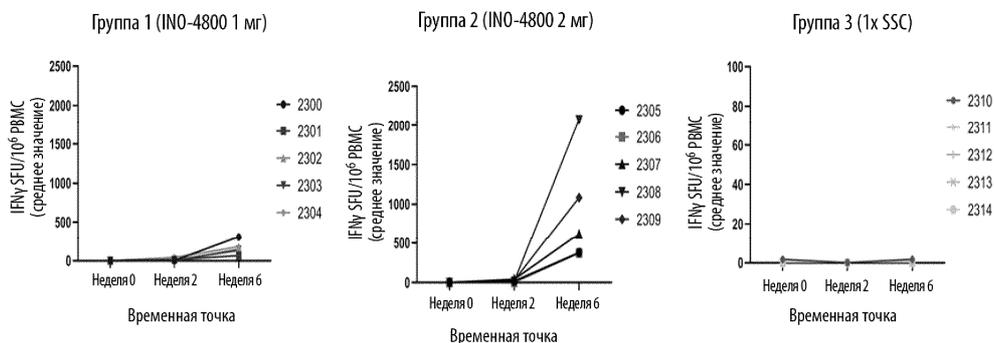
Фиг. 6



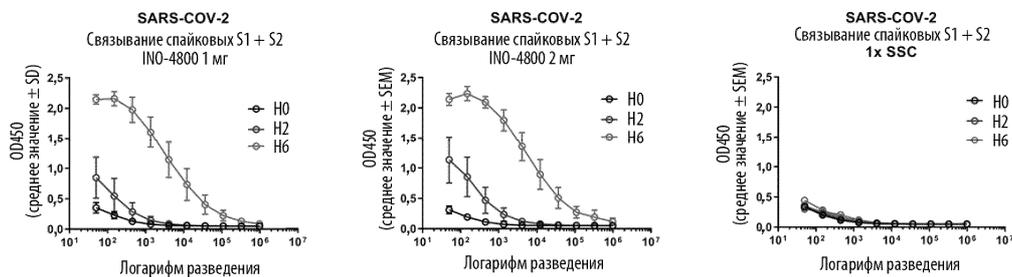
Фиг. 7



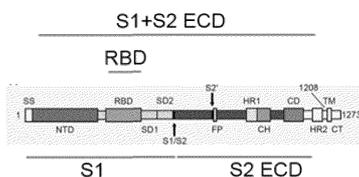
Фиг. 8



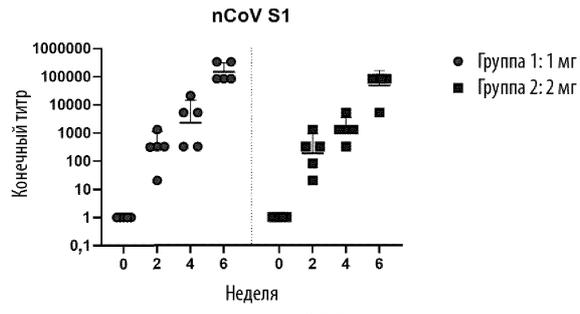
Фиг. 9



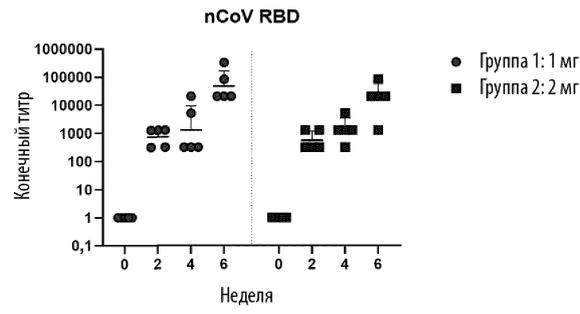
Фиг. 10



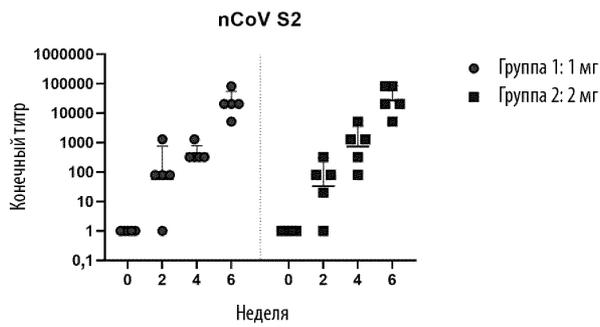
Фиг. 11А



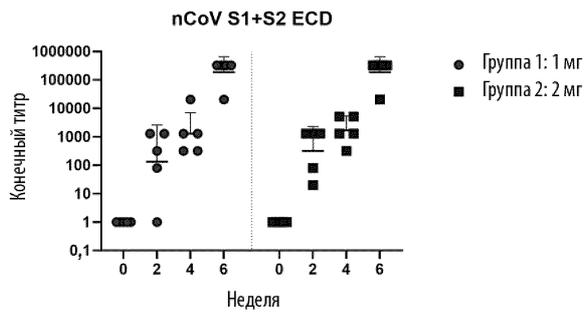
Фиг. 11В



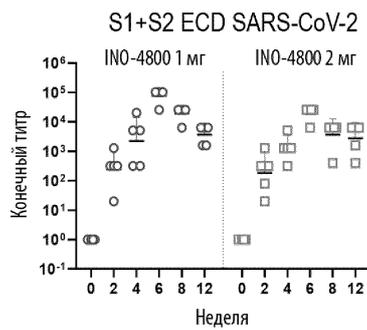
Фиг. 11С



Фиг. 11D

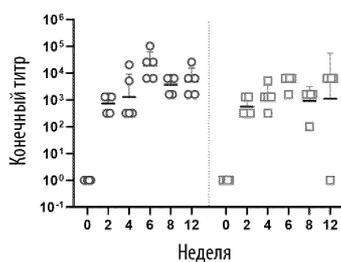


Фиг. 11E



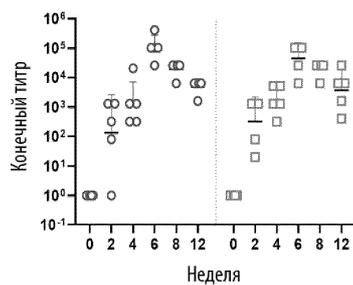
Фиг. 12А

RBD SARS-CoV-2



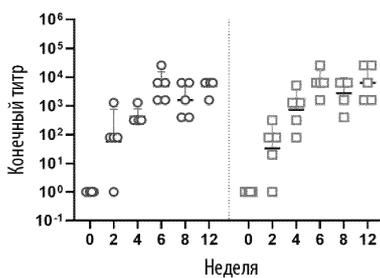
Фиг. 12В

S1 SARS-CoV-2



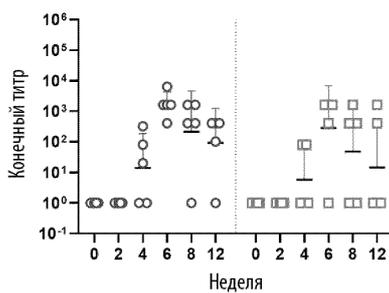
Фиг. 12С

S2 SARS-CoV-2



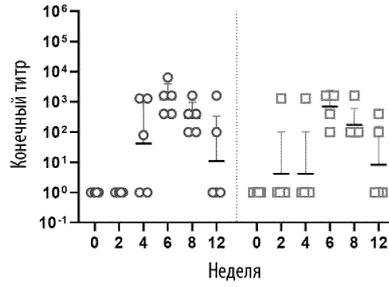
Фиг. 12D

RBD SARS-CoV-2



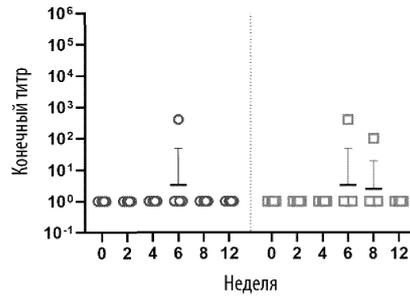
Фиг. 12Е

S1 SARS-CoV-1

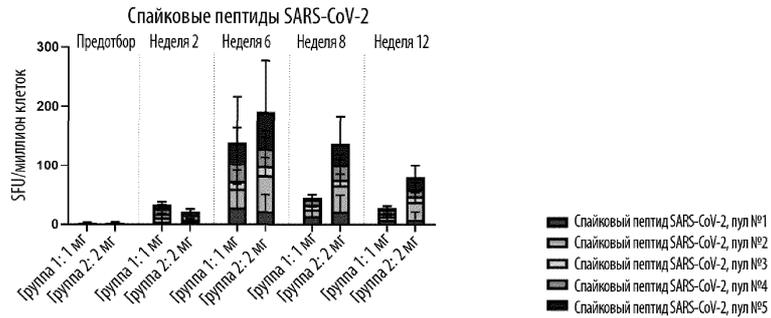


Фиг. 12F

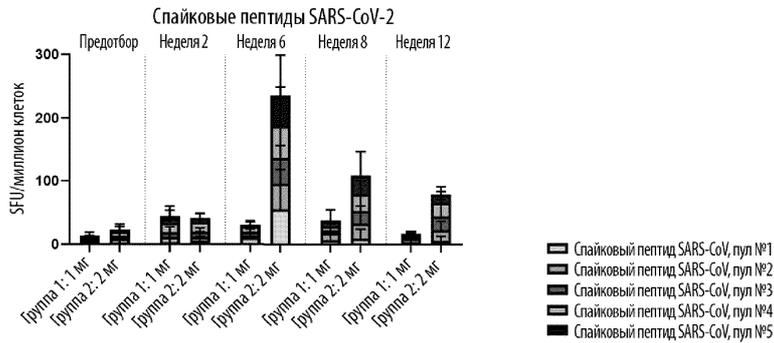
S MERS-CoV



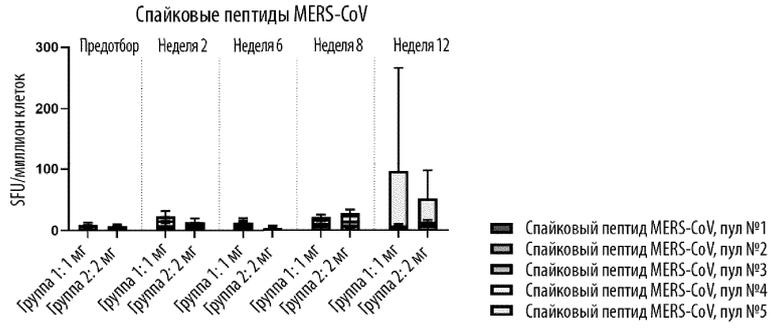
Фиг. 12G



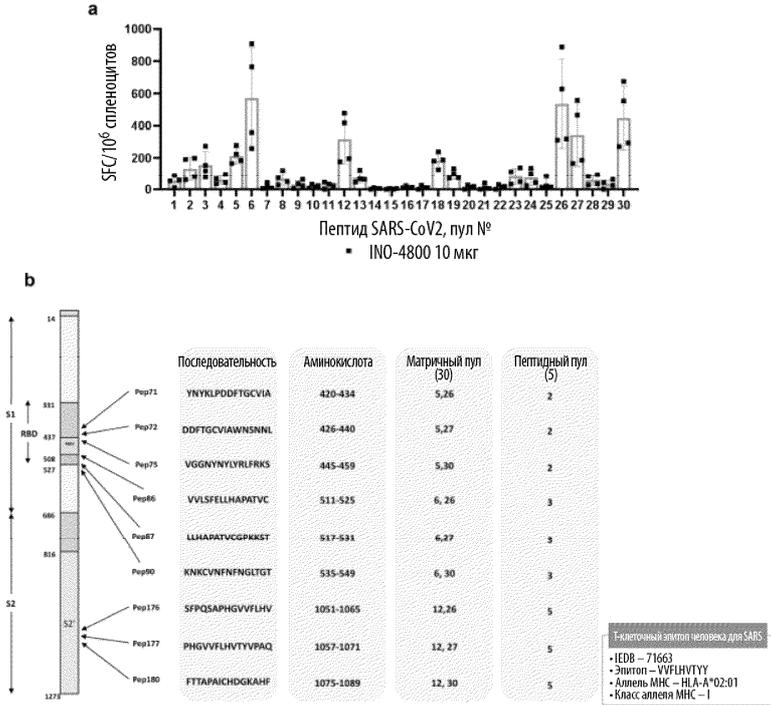
Фиг. 13А



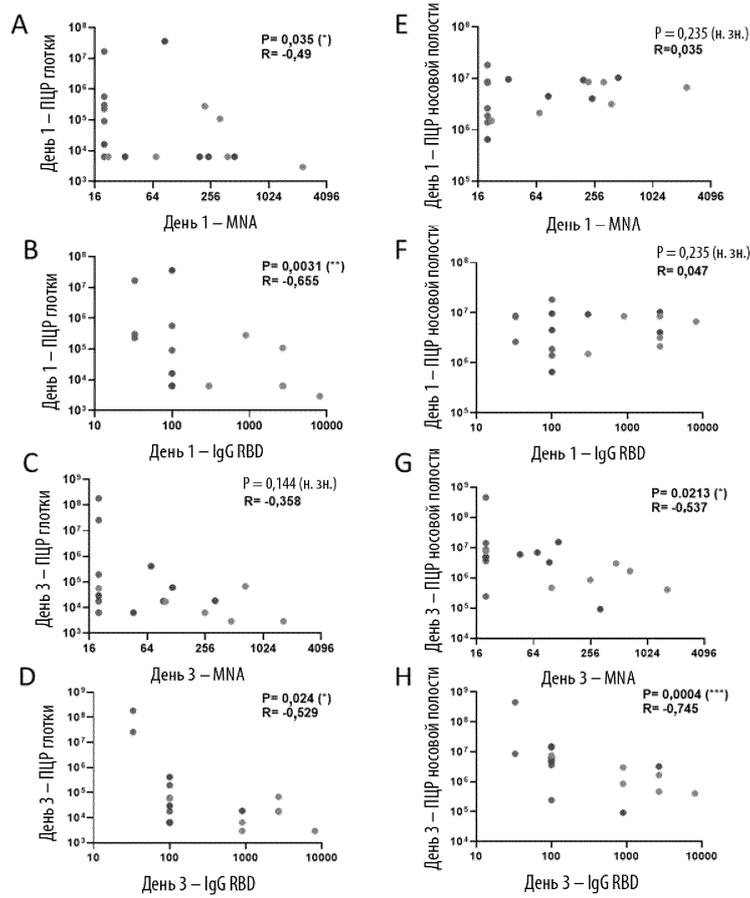
Фиг. 13В



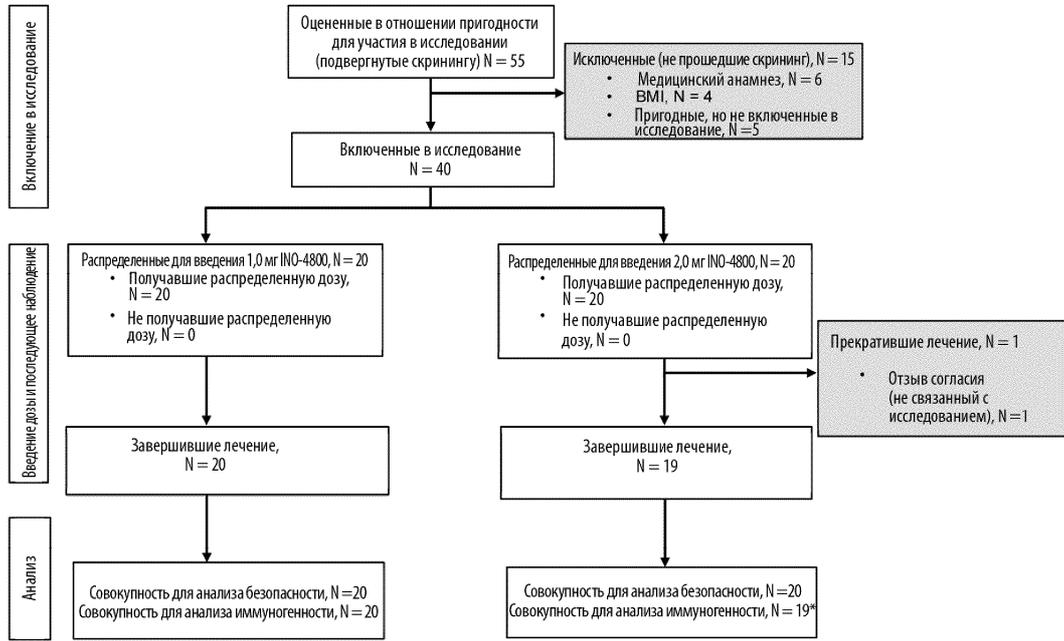
Фиг. 13С



Фиг. 14

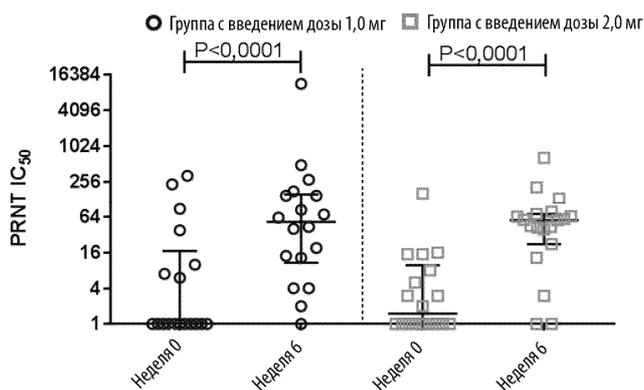


Фиг. 15

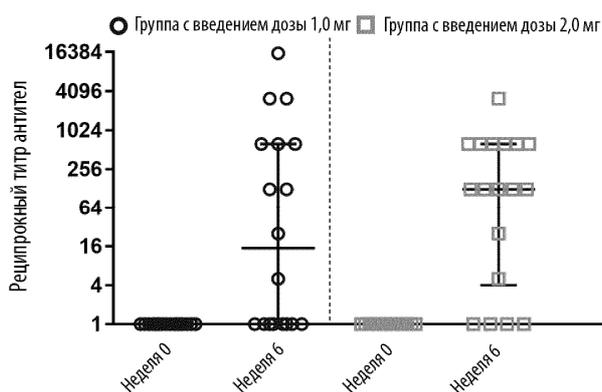


* один субъект в группе с введением дозы 2,0 мг не смог организовать стабильное транспортное перемещение и поэтому прекратил лечение

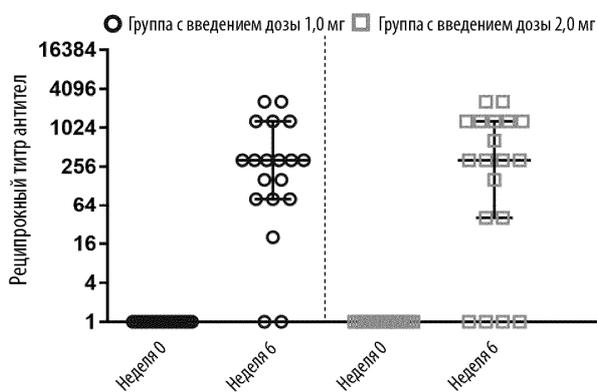
Фиг. 16



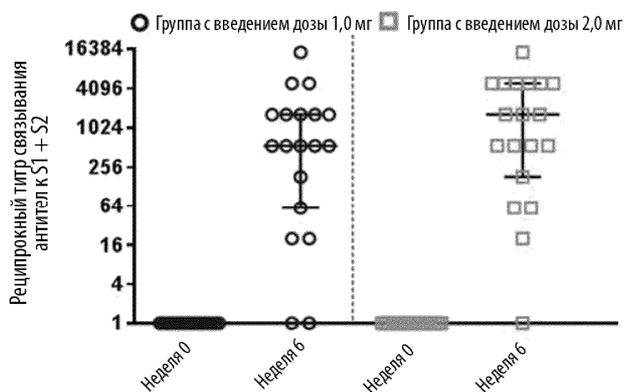
Фиг. 17А



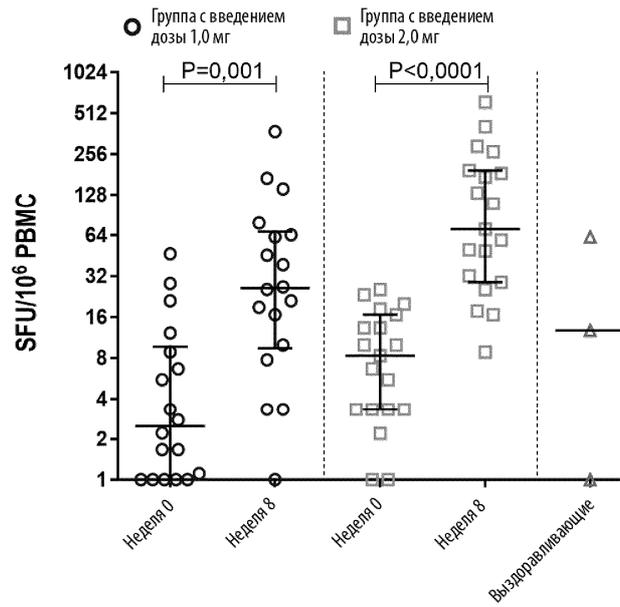
Фиг. 17В



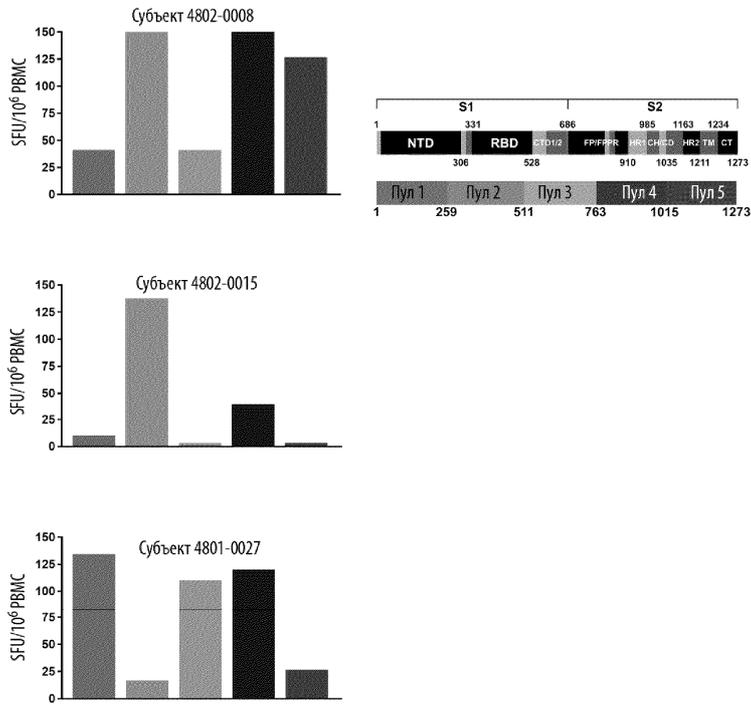
Фиг. 17С



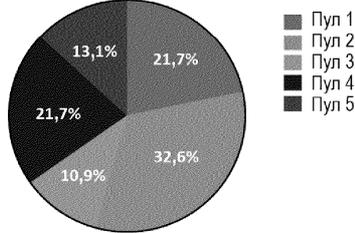
Фиг. 17D



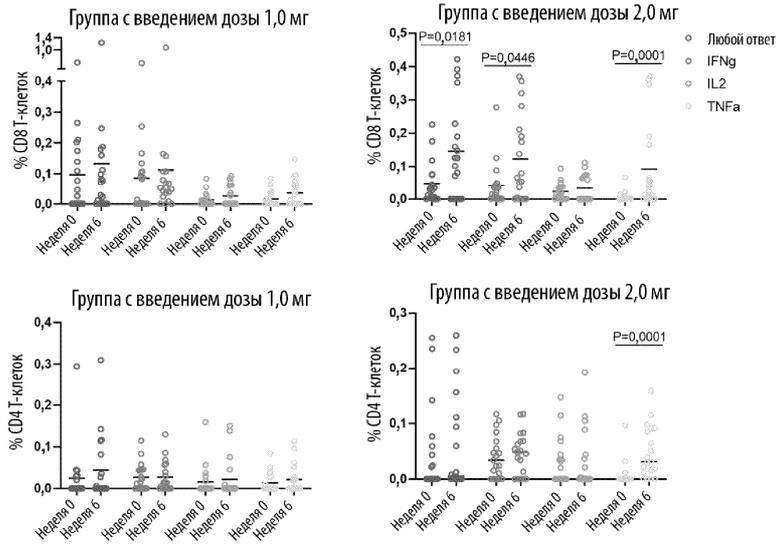
Фиг. 18А



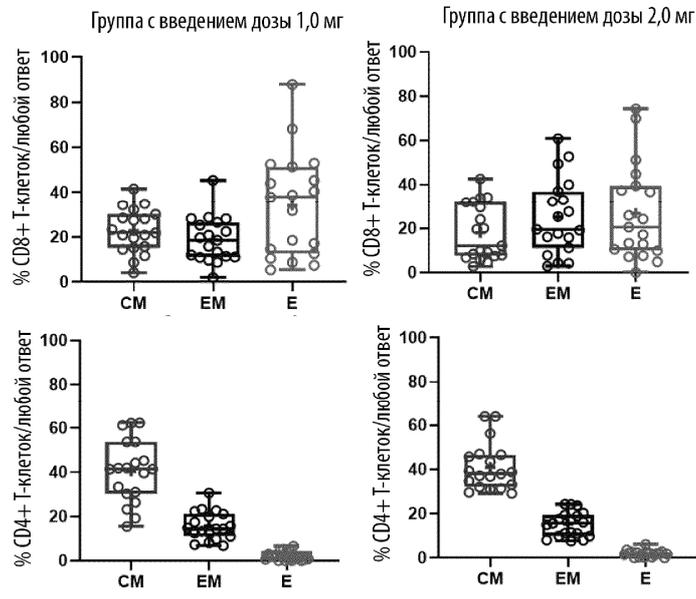
Когорта с введением дозы 2,0 мг



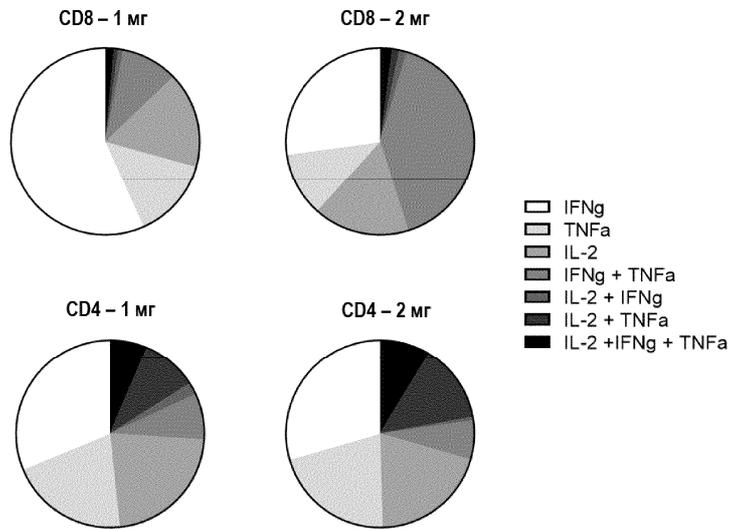
Фиг. 18В



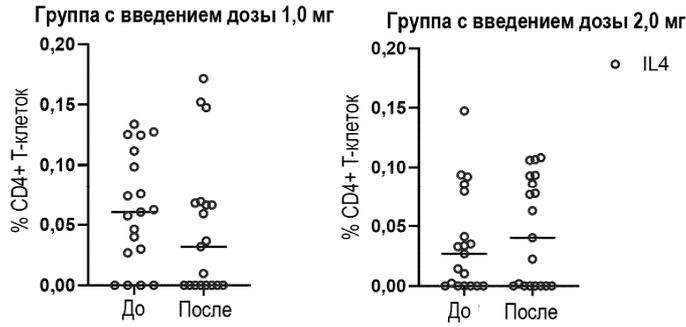
Фиг. 18С



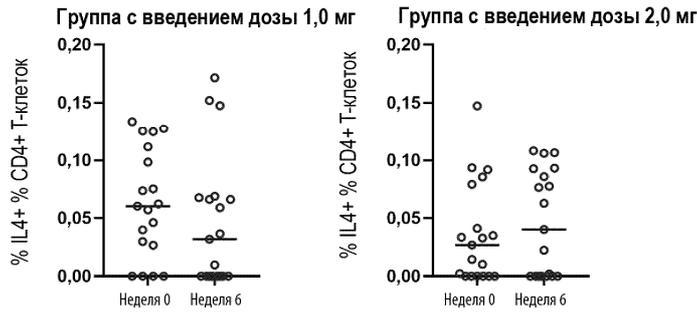
Фиг. 18D



Фиг. 18E



После изменения:



Фиг. 18F

Когорта с введением дозы 2,0 мг

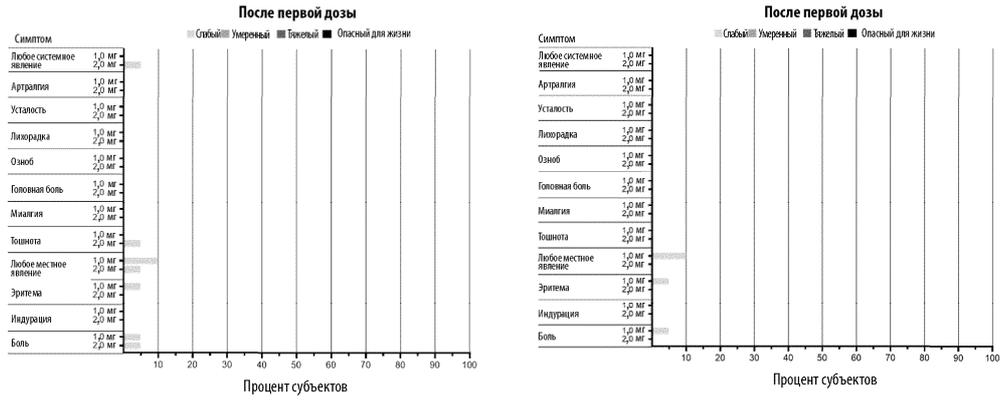
ID субъекта	Пул 1	Пул 2	Пул 3	Пул 4	Пул 5
4801-0027	33,0%	4,1%	27,0%	29,4%	6,5%
4801-0028	3,3%	95,8%	0,0%	0,8%	0,0%
4801-0029	20,0%	0,0%	80,0%	0,0%	0,0%
4802-0013	4,7%	57,8%	4,7%	23,4%	9,4%
4802-0014	27,3%	31,8%	11,4%	13,6%	15,9%
4802-0015	5,1%	70,9%	1,7%	20,6%	1,7%
4801-0011	9,2%	62,2%	5,0%	20,2%	3,4%
4801-0016	24,2%	29,3%	3,0%	19,2%	24,2%
4801-0017	22,6%	17,0%	5,7%	30,2%	24,5%
4801-0026	31,3%	18,7%	18,7%	31,3%	0,0%
4802-0005	26,1%	34,8%	0,0%	26,1%	13,0%
4802-0012	10,3%	10,3%	37,9%	20,7%	20,7%
4802-0019	0,0%	50,0%	50,0%	0,0%	0,0%
4802-0018	11,5%	9,6%	3,2%	3,8%	71,8%
4802-0020	8,0%	6,1%	36,0%	5,3%	44,7%
4802-0021	0,0%	11,5%	53,8%	23,1%	11,5%
4802-0008	6,7%	34,7%	6,7%	31,4%	20,6%
4802-0016	16,3%	16,9%	10,2%	13,3%	43,4%

Пул 1 Пул 2 Пул 3 Пул 4 Пул 5

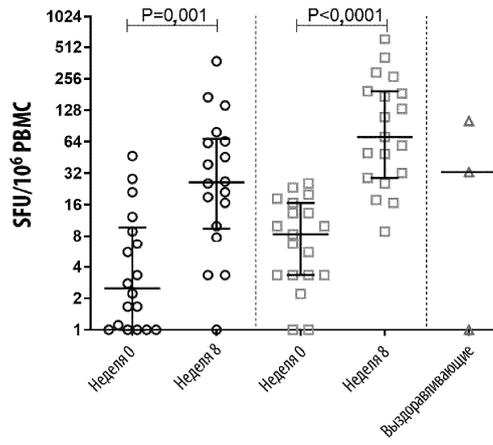
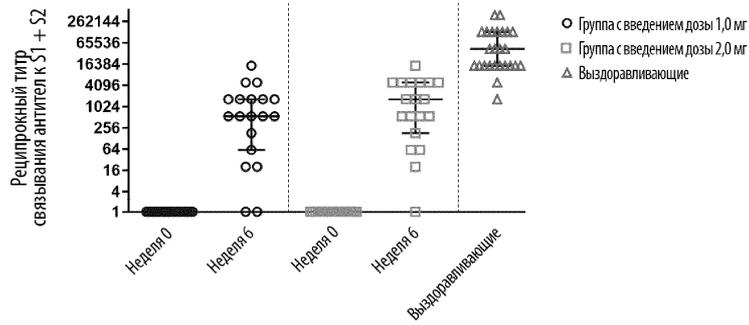
Доля ответа

- 100,00% Наиболее Высокий
- 75,00%
- 50,00% Средний
- 25,00%
- 0,00% Наиболее низкий

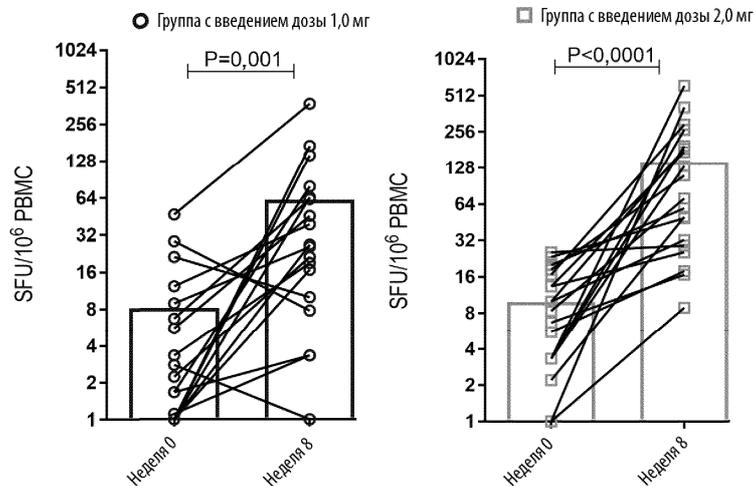
Фиг. 18G



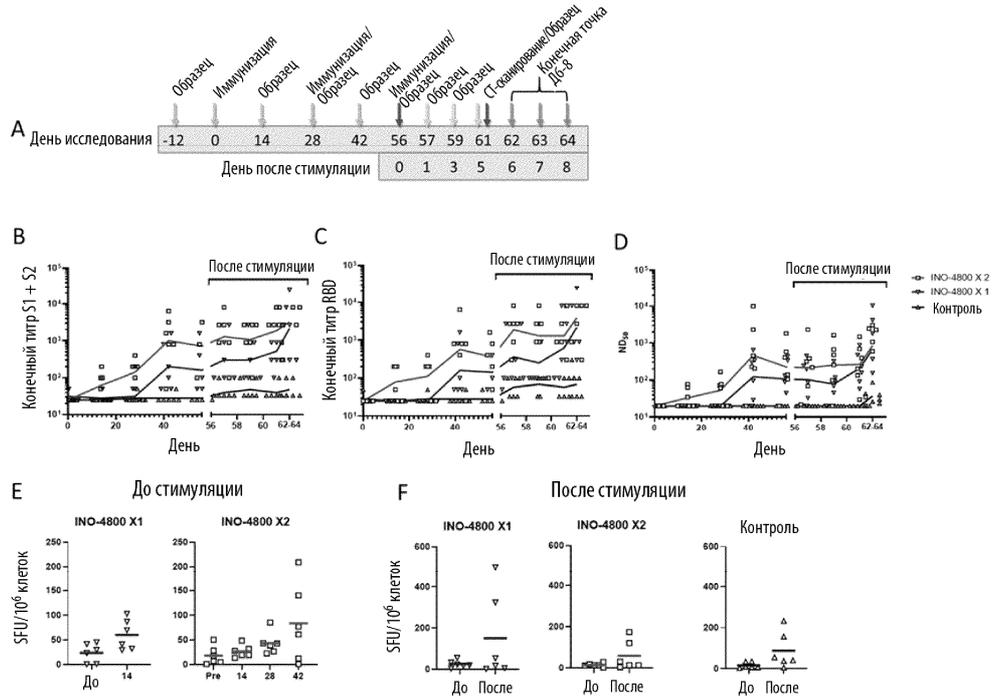
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

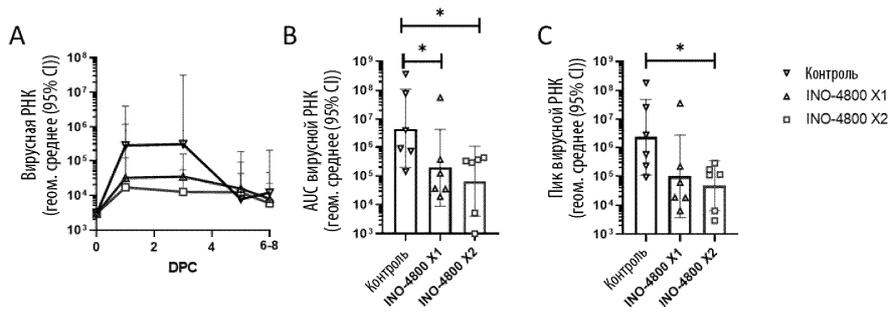


Фиг. 22

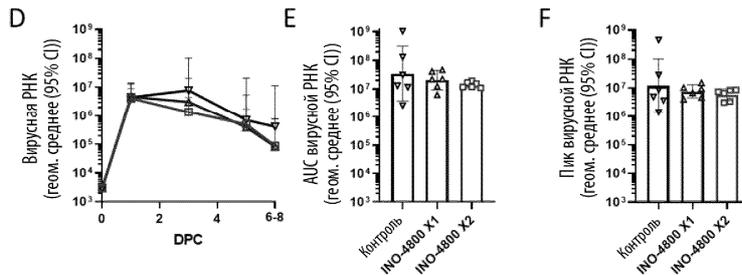


Фиг. 23

Глотка

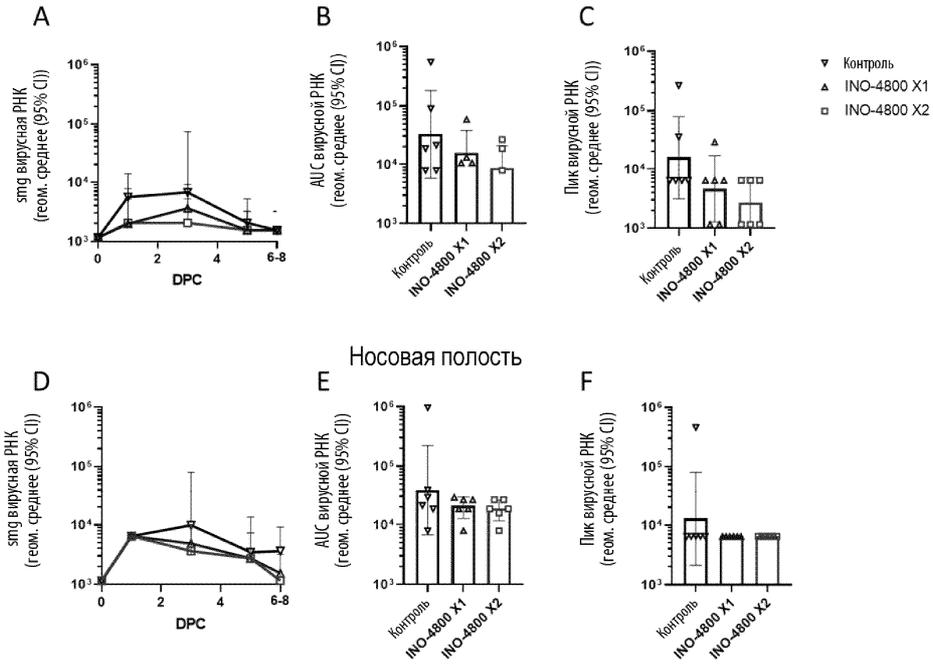


Носовая полость



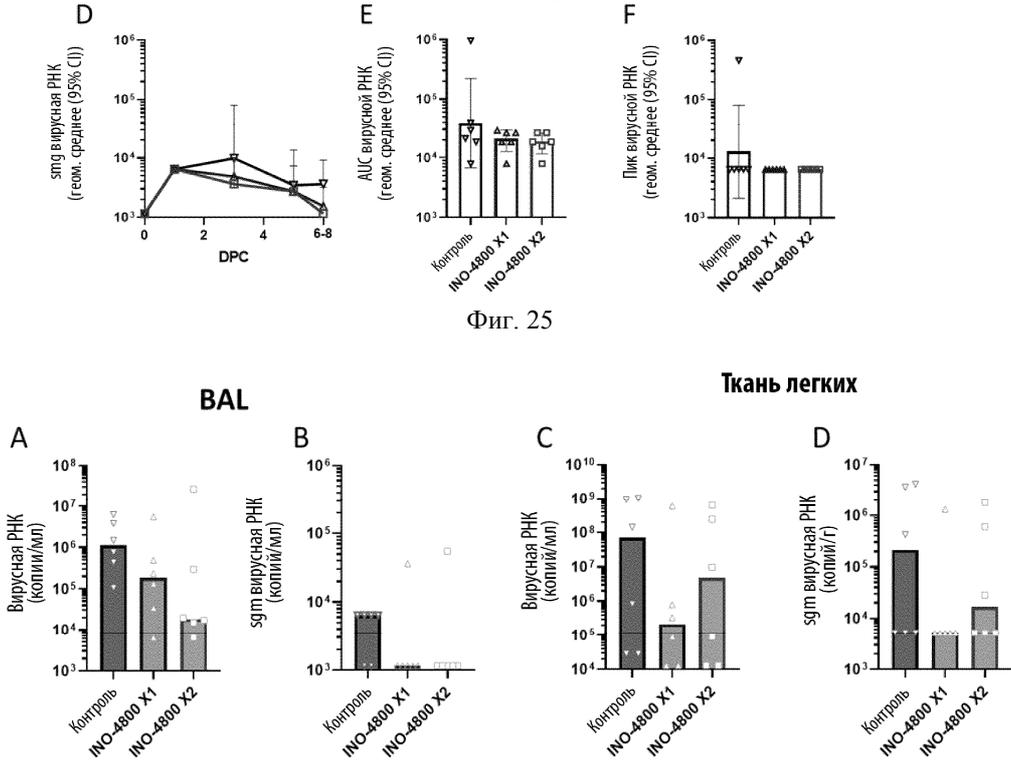
Фиг. 24

Глотка



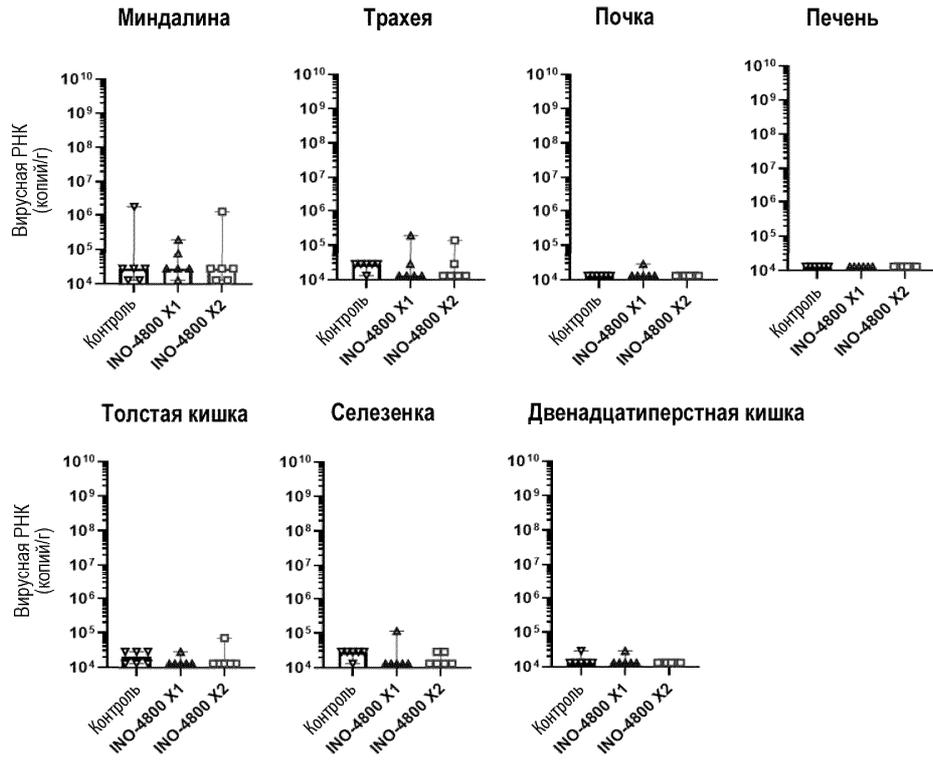
Фиг. 25

Носовая полость

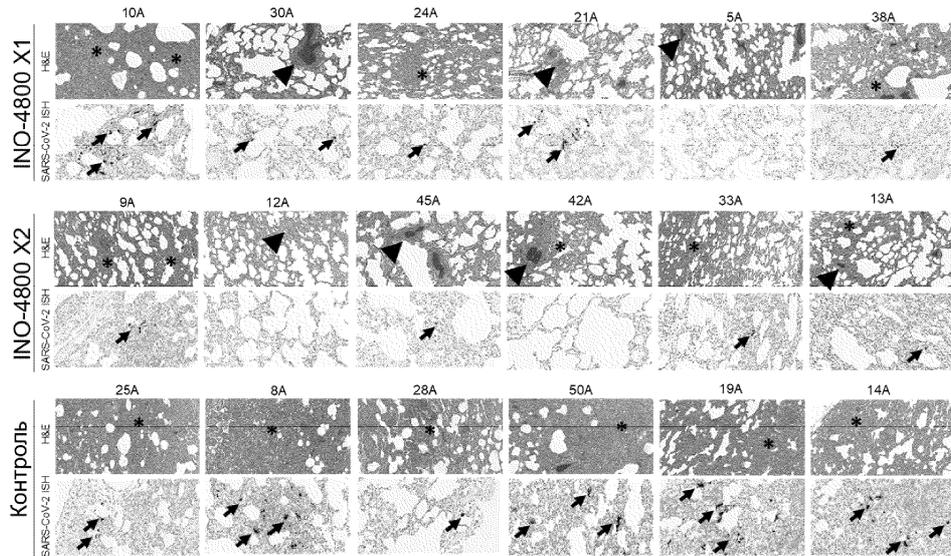


Фиг. 26

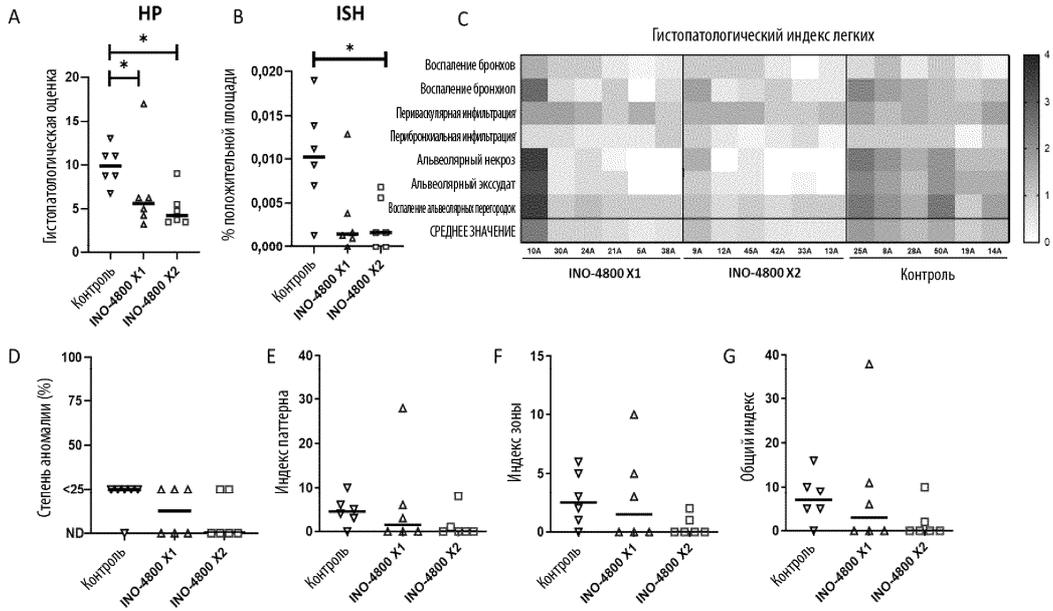
Ткань легких



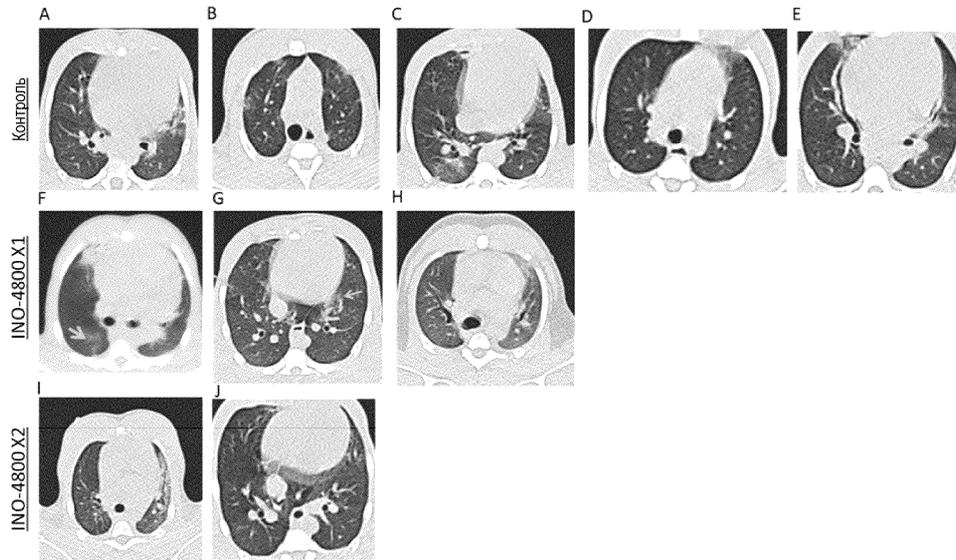
Фиг. 27



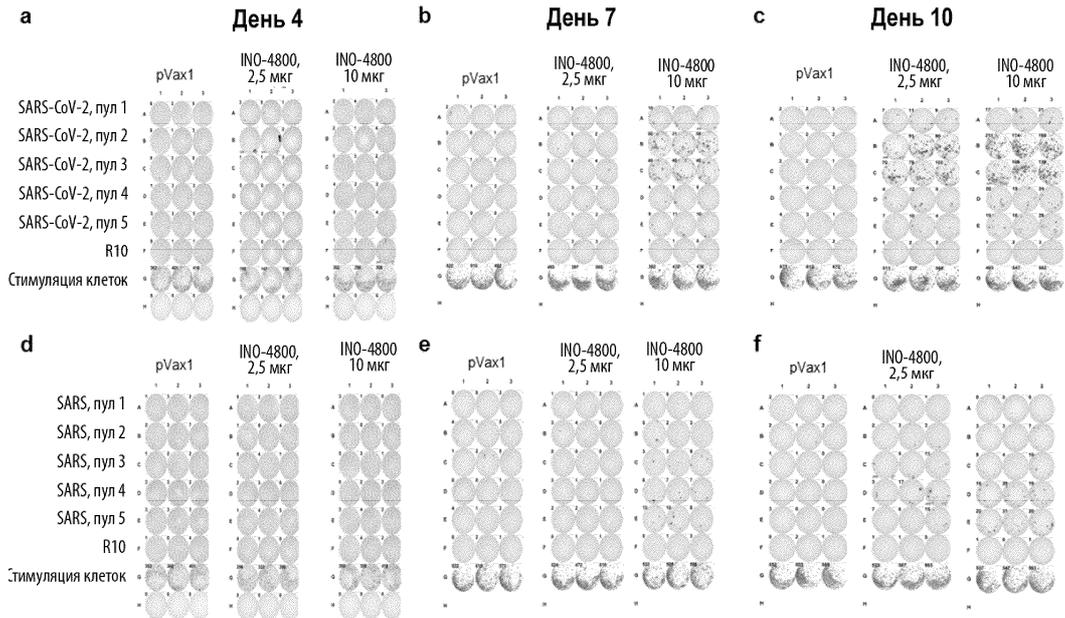
Фиг. 28



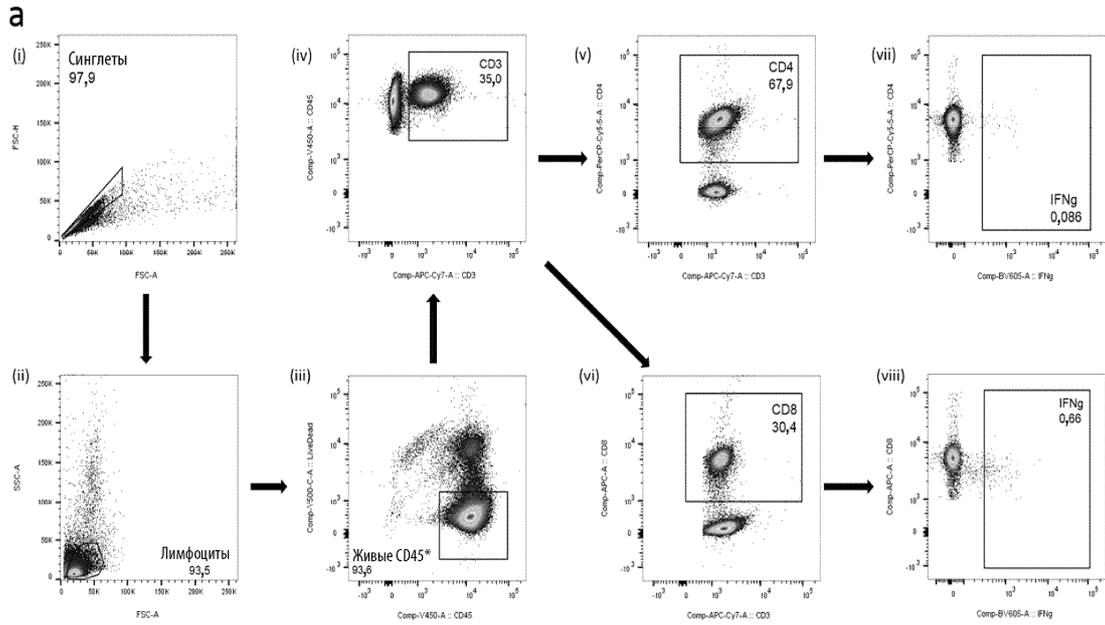
Фиг. 29



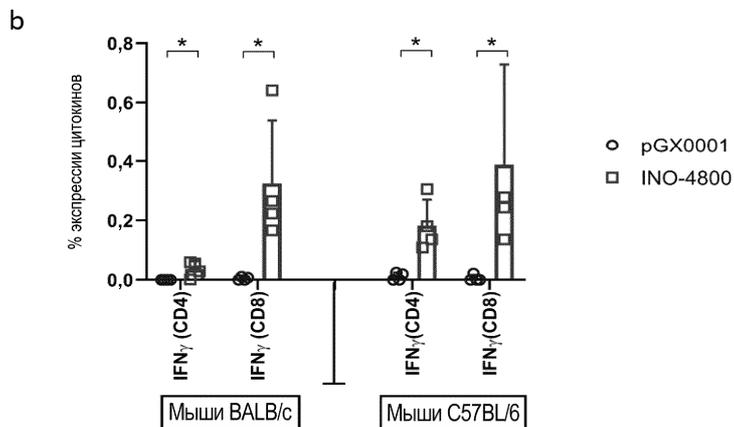
Фиг. 30



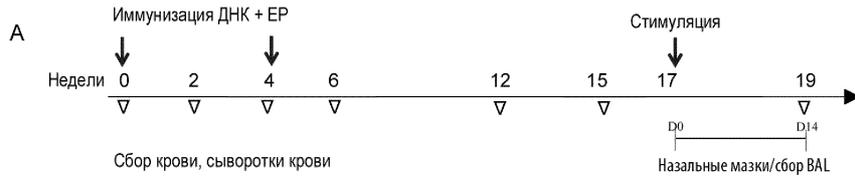
Фиг. 31



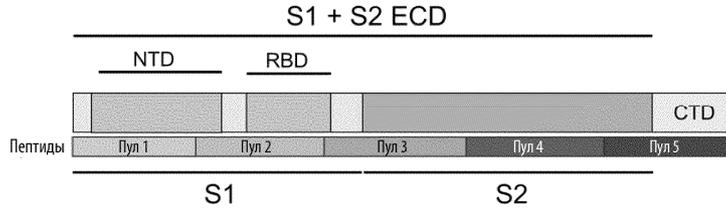
Фиг. 32А



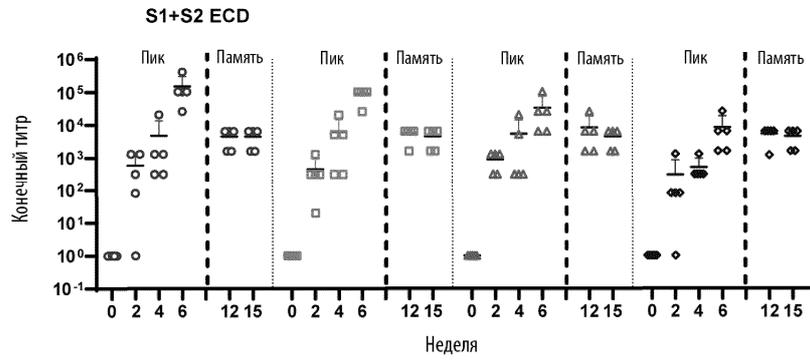
Фиг. 32В



Фиг. 33А

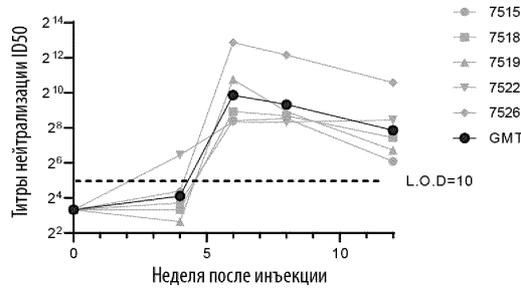


Фиг. 33В



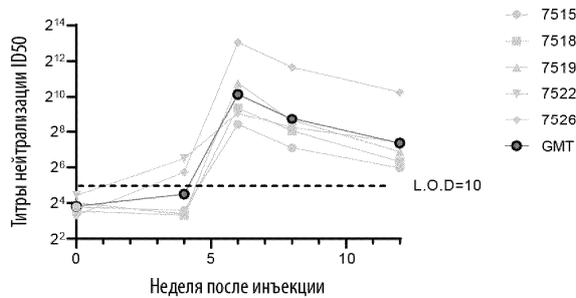
Фиг. 33С

Анализ псевдонейтрализации спайков D614 (INO-4800)

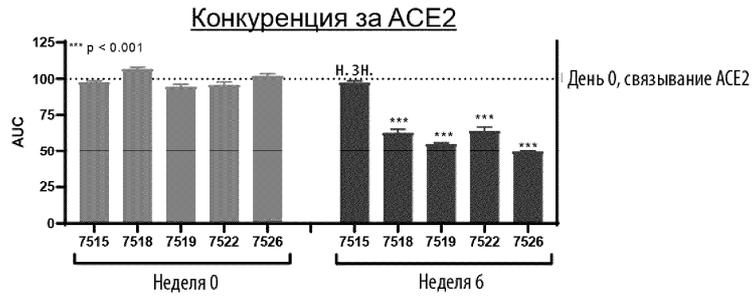


Фиг. 33D

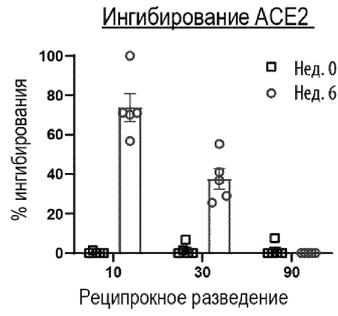
Анализ псевдонейтрализации спайковых пептидов D614 (INO-4800)



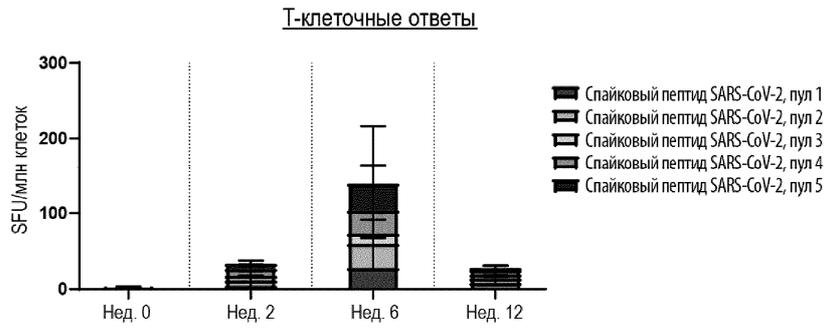
Фиг. 33Е



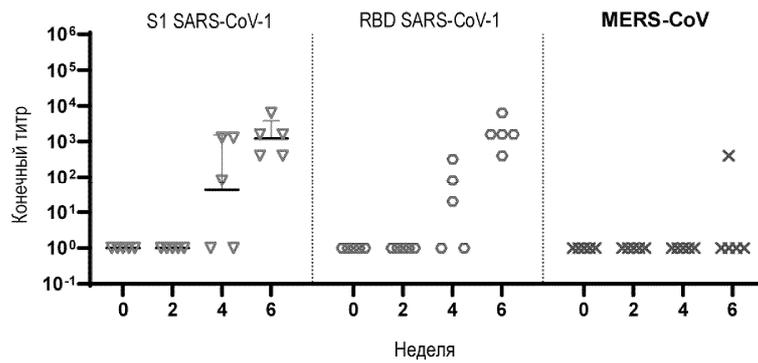
Фиг. 33F



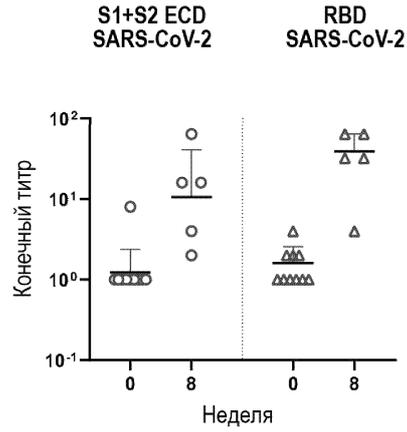
Фиг. 33G



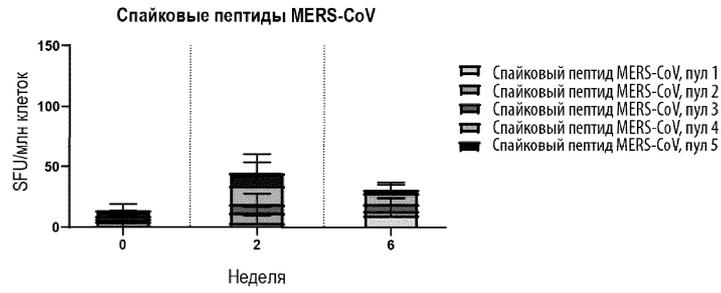
Фиг. 33H



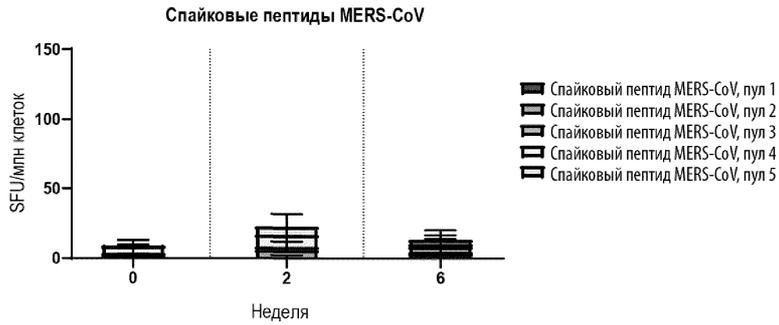
Фиг. 34



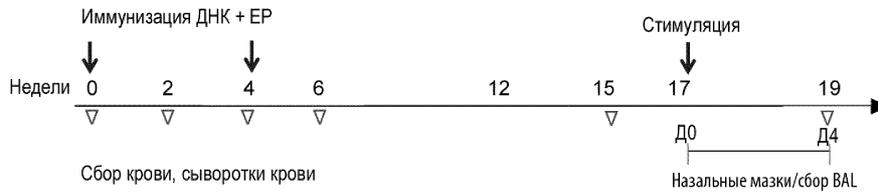
Фиг. 35



Фиг. 36А

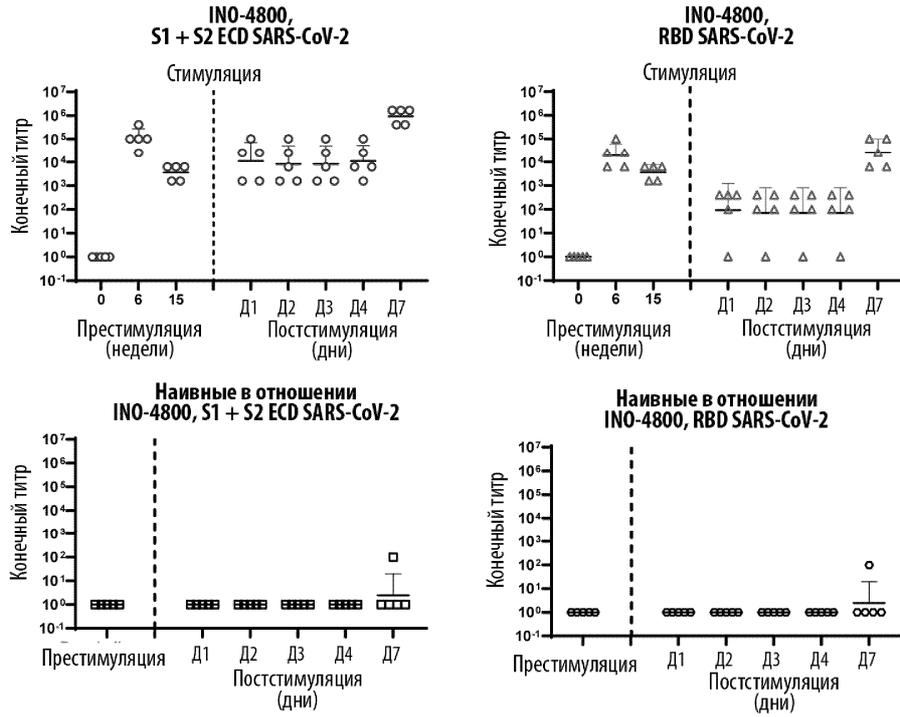


Фиг. 36В

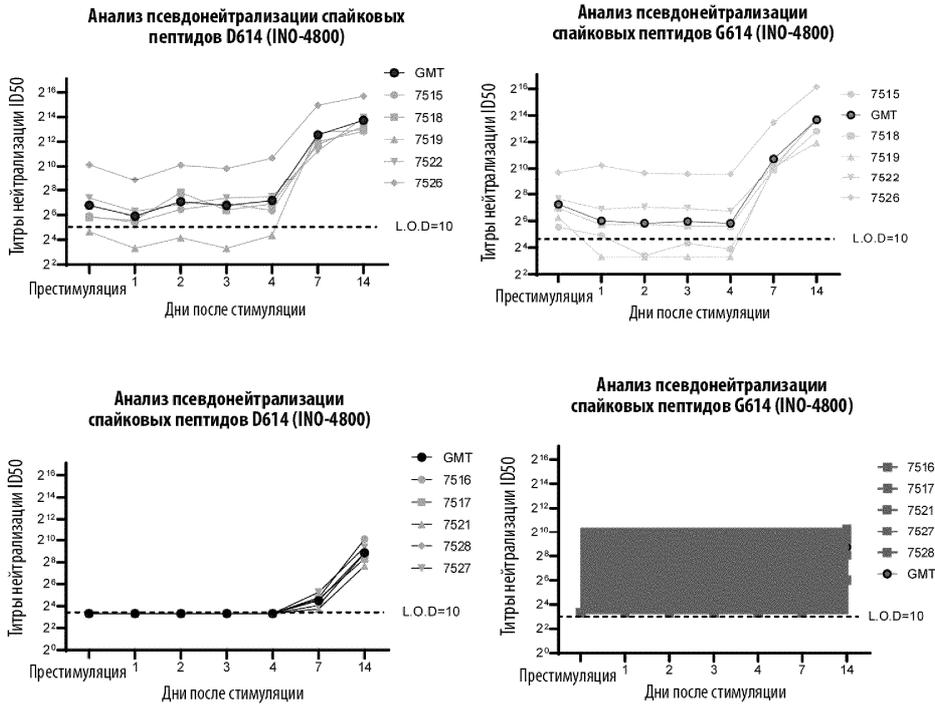


Фиг. 37А

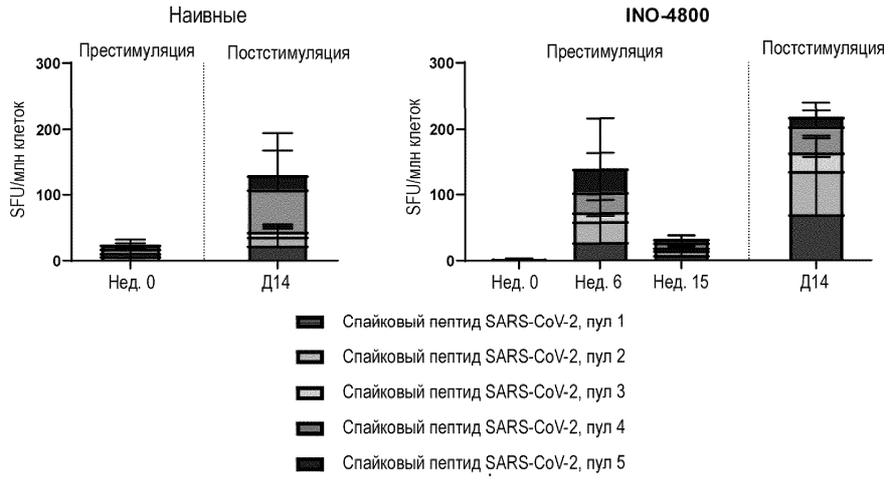
ELISA связывания Ig



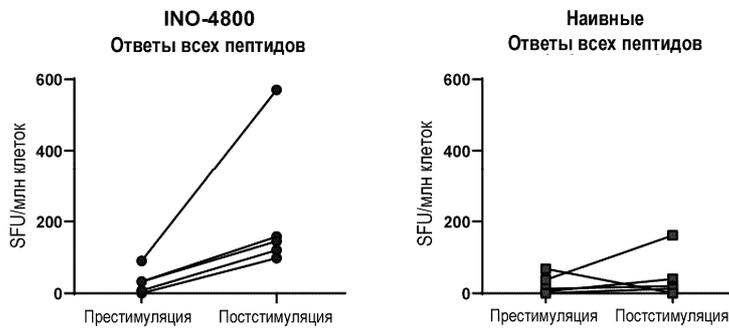
Фиг. 37В



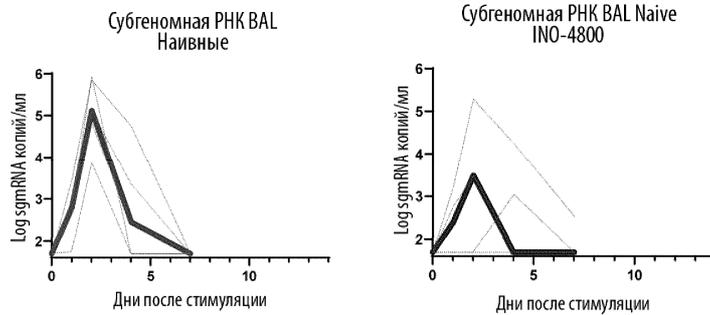
Фиг. 37С



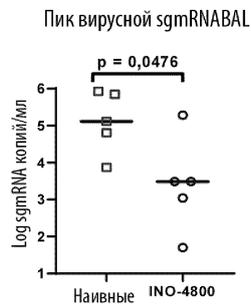
Фиг. 38



Фиг. 39



Фиг. 40А



Фиг. 40В

