

УДК 615.371

Доклинические исследования иммуногенности, протективности и безопасности комбинированной векторной вакцины для профилактики ближневосточного респираторного синдрома

И. В. Должикова¹, Д. М. Гроусова¹, О. В. Зубкова¹, А. И. Тухватулин¹, А. В. Ковыршина¹, Н. Л. Лубенец¹, Т. А. Ожаровская¹, О. Попова¹, И. Б. Есмагамбетов¹, Д. В. Щебляков¹, И. М. Евграфова¹, А. А. Недорубов², И. В. Гордейчук^{1,2,3}, С. А. Гуляев³, А. Г. Ботиков¹, Л. В. Панина¹, Д. В. Мишин¹, С. Я. Логинова⁴, С. В. Борисевич⁴, П. Г. Дерябин¹, Б. С. Народицкий^{1,2}, Д. Ю. Логунов¹, А. Л. Гинцбург^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119435 Россия

³Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, 108819 Россия

⁴48 центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации, Московская обл., Сергиев Посад-6, 141306 Россия

*E-mail: logunov@gamaleya.org

Поступила в редакцию 21.10.2019

Принята к печати 29.05.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11042

РЕФЕРАТ Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы, возбудителем которого является коронавирус БВРС-КоВ. Летальность при БВРС составляет 34.5%. В связи с высокой летальностью, отсутствием терапевтических и профилактических средств и сохраняющейся угрозой распространения БВРС за пределы эндемичных районов разработка вакцинного препарата является актуальной задачей, а вакцинопрофилактика против БВРС позволит ограничить распространение БВРС и снизить летальность. Нами была разработана комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипа. Проведенные исследования иммуногенности показали, что вакцинация животных (мыши и приматы) позволяет сформировать мощный гуморальный иммунный ответ, который сохраняется на протяжении не менее 6 месяцев. Исследования клеточного иммунного ответа у мышей после вакцинации показали формирование выраженного специфического CD4⁺ и CD8⁺ ответа. По результатам исследования протективности вакцины на модели трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, было показано, что вакцинация обеспечивает защиту 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012, 100 ЛД₅₀/мышь). Проведенные исследования безопасности и переносимости разработанной вакцины у грызунов, кроликов и приматов показали хорошую переносимость вакцины у животных и не выявили противопоказаний для проведения клинических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирусный вектор, ближневосточный респираторный синдром (БВРС), иммуногенность, оценка безопасности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 95% ДИ – 95% доверительный интервал; Ad5 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 5; Ad26 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 26; Ad41 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса человека серотипа 41; APC – аллофикоцианин;

ChAdOx1 – рекомбинантный вектор на основе аденовируса шимпанзе; **DPP4** – дипептидилпептидаза 4; **MVA** – модифицированный вирус осповакцины Анкара; **RBD** – рецепторсвязывающий домен гликопротеина **S** БВРС-КоВ; **RBD-Fc** – рецепторсвязывающий домен гликопротеина **S** БВРС-КоВ, слитый с **Fc IgG1** человека; **RBD-G** – рецепторсвязывающий домен гликопротеина **S** БВРС-КоВ, слитый с трансмембранным доменом гликопротеина **G** вируса везикулярного стоматита; **S** – гликопротеин БВРС-КоВ; **S-G** – гликопротеин БВРС-КоВ с трансмембранным доменом гликопротеина **G** вируса везикулярного стоматита; **АЛТ** – аланинаминотрансфераза; **АСТ** – аспартатаминотрансфераза; **БВРС (MERS)** – ближневосточный респираторный синдром; **БВРС-КоВ (MERS-CoV)** – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома; **в.ч.** – вирусные частицы; **ИФН-гамма** – интерферон гамма; **ЩФ** – щелочная фосфатаза.

ВВЕДЕНИЕ

Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы, которое было впервые диагностировано в июне 2012 года в Саудовской Аравии [1, 2]. Возбудителем данного заболевания является коронавирус БВРС-КоВ, относящийся к семейству коронавирусов, род бетакоронавирусов. Естественным резервуаром вируса являются одnogорбые верблюды, заражение человека происходит при контакте с верблюдами, употреблении непастеризованного верблюжьего молока, возможен аэрозольный путь передачи инфекции [3, 4]. Согласно данным ВОЗ, на 12 сентября 2019 года зарегистрировано 2458 лабораторно подтвержденных случаев БВРС, в том числе 848 со смертельным исходом, летальность составляет около 34,5% [5]. Большинство случаев БВРС зарегистрировано в Саудовской Аравии [6], однако заболевание также выявляли в 27 странах (Объединенные Арабские Эмираты, Южная Корея, Йемен и др.), завозные случаи инфекции были зарегистрированы в Европе, Северной Африке и Северной Америке [5]. В силу отсутствия эффективных профилактических и терапевтических препаратов против БВРС, высокого уровня летальности и широкого распространения резервуара инфекции эксперты ВОЗ относят вирус БВРС-КоВ к агентам с пандемическим потенциалом. В России случаи БВРС не зафиксированы. Однако в связи с высокой летальностью и сохраняющейся угрозой распространения БВРС за пределы эндемичных районов [5], разработка вакцинного препарата является актуальной задачей, а вакцинопрофилактика против БВРС позволит ограничить распространение БВРС и снизить летальность [7].

На сегодняшний день известно несколько кандидатных вакцинных препаратов на основе протективного антигена – гликопротеина **S** вируса БВРС-КоВ и его производных (субъединицы **S1**, рецепторсвязывающего домена): векторные вакцины (на основе рекомбинантных аденовирусов и вируса осповакцины), ДНК-вакцина на основе плазмидной ДНК, вакцины на основе рекомбинантных белков и вирусоподобных частиц [8–15]. Поскольку в защите от БВРС-КоВ важно формирование гуморального и клеточного иммунного ответа, перспективным направлением в разра-

ботке вакцин против БВРС является использование рекомбинантных вирусных векторов для доставки антигена. Такие векторы обеспечивают длительную экспрессию антигена в клетках иммунизируемого организма, что приводит к развитию протективного иммунного ответа уже после одной-двух иммунизаций. Для формирования наиболее выраженного и длительного иммунного ответа целесообразно проводить двукратную вакцинацию, при этом наиболее оптимальной схемой является гетерологичная вакцинация, когда для первичной и вторичной иммунизации используют различные вирусные векторы. Такая схема была успешно реализована при разработке вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола, которая зарегистрирована на территории РФ для медицинского применения и в настоящее время уже завершены пострегистрационные клинические исследования в Республике Гвинея [16].

Нами была разработана комбинированная векторная вакцина на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов для профилактики БВРС, экспрессирующих гликопротеин вируса БВРС-КоВ (изолят MERS-CoV EMC/2012). В статье представлены результаты исследования поствакцинального гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей и приматов, а также результаты доклинических исследований безопасности разработанной вакцины против БВРС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемый препарат

Комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС состоит из двух компонентов.

Компонент 1 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 26 серотипа, несущие ген рецепторсвязывающего домена гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на дозу.

Компонент 2 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 5 серотипа, несущие ген полноразмерного гликопротеина БВРС-КоВ и ген рецепторсвязывающего домена гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на дозу.

Оба компонента представляют собой лиофилизаты для приготовления растворов для внутримышечного

введения. Препарат произведен в условиях биотехнологического производства филиала «Медгамал» «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Лабораторные животные

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009, «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Шестинедельные самки мышей C57BL/6 (18–20 г) получены из питомника Пушино (Россия). Трансгенные мыши-гибриды F1 получены в результате скрещивания трансгенных гомозиготных самцов +/+, несущих ген рецептора DPP4 человека (hDPP4) (Медицинский университет Техаса, США) и нетрансгенных самок линии C57BL/6 (Пушино, Россия). Экспрессия трансгена у мышей-гибридов F1 была подтверждена методом иммуоблота. Все мыши имели свободный доступ к воде и пище, размещались в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия).

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*) были рождены и содержались в специализированном виварии ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Москва, Россия). Животные содержались в Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян («ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») в соответствии с требованиями к условиям содержания лабораторных приматов. Все экспериментальные манипуляции с игрунками проводились специалистом, имеющим сертификат Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA), прошедшим курс обучения работе с приматами (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция) по программе Laboratory Animal Science for Researchers – Non-Human Primates (Наука о лабораторных животных для исследователей – Приматы помимо человека). Все животные идентифицировались путем подкожного введения радиочипа с уникальным 15-значным кодом (Globalvet, Москва).

Иммунизация и сбор образцов сывороток крови мышей и обыкновенных игрунок

Мышей иммунизировали внутримышечно, при этом использовали максимально широкий диапазон доз от 5×10^{11} до 10^5 в.ч./мышь. Иммунизацию проводили двукратно последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы сыворотки крови мышей собирали в следующие временные точки: через 14 и 28 дней, 3 и 6 месяцев после иммунизации.

Игрунок иммунизировали внутримышечно в дозе 10^{11} в.ч./животное. Иммунизацию проводили двукрат-

но последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы плазмы крови собирали в следующие временные точки: до иммунизации и через 7 и 24 дня, 3 и 6 месяцев после иммунизации.

Определение титра антител методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Определение титра гликопротеин-специфических антител в сыворотке/плазме крови проводили методом иммуноферментного анализа. Использовали рекомбинантные белки: гликопротеин S (40069-V08B; Sino Biological, США) и RBD (40071-V08B1; Sino Biological). Забивку проводили раствором ФСБ в 0.1% Твин-20 (ФСБ-Т), содержащим 5% обезжиренного молока (A0830; AppliChem, Испания). Сыворотку/плазму титровали двукратным шагом в растворе ФСБ-Т с 3% обезжиренным молоком. Для детекции IgG мыши использовали вторичные антитела, специфические к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (NXA931; GE Healthcare, США). Для детекции IgG игрунок использовали сыворотку кролика, иммунизированного IgG мармозет, и вторичные антитела, специфические к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (NA934V; GE Healthcare, США). Проявляли с использованием раствора тетраметилбензидина (НИИОПиК, Россия). Реакцию останавливали, добавляя 1 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD_{450}) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Титр IgG определяли как максимальное разведение сыворотки, при котором значение OD_{450} сыворотки иммунизированного животного превосходит значение контрольной сыворотки/плазмы (сыворотка/плазма контрольного животного или животного до иммунизации) более чем в 2 раза.

Определение титра вируснейтрализующих антител

Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) в плазме крови иммунизированных животных определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению цитопатического действия, вызванного вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в монослое клеток Vero В. Реакцию нейтрализации проводили в варианте: постоянная доза вируса – разведения сыворотки. Плазму крови обезьян инактивировали при температуре 56°C в течение 30 мин для удаления неспецифических ингибиторов. Разведения всех сывороток готовили на среде DMEM с 2% инактивированной фетальной сывороткой крупного рогатого скота, начиная с 1 : 10, затем двукратным шагом до 1 : 5120. Разведения вирусосодержащей суспензии на основе вируса БВРС-КоВ готовили на среде DMEM с 2% инактивированной фетальной сывороткой круп-

ного рогатого скота. В приготовленном разведении концентрация вируса БВРС-КоВ составила 1000 ТЦД₅₀/мл. Смесь равных объемов плазмы и суспензии вируса инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Клетки Vero B рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 4×10^4 клеток/лунку в объеме 100 мкл, затем к ним добавляли 100 мкл смеси плазмы и суспензии вируса. Через 4 сут оценивали развитие цитопатического действия. За титр ВНА исследуемой плазмы принимали высшее ее разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия в двух лунках из трех (по сравнению с контрольными сыворотками).

Анализ Т-клеточного ответа (лимфопротективный анализ) и продукции интерферона гамма (ИФН-гамма) у мышей

Животных забивали на 8 день после иммунизации и отбирали селезенки, которые гомогенизировали через сито с диаметром пор 100 мкм в стерильном ФСБ. Спленциты выделяли с помощью центрифугирования (800 g, 30 мин) на подушке раствора фиколла (1.09 г/мл, «ПанЭко», Россия). Для анализа пролиферации Т-клеток спленциты окрашивали карбоксифлуоресцеином с использованием набора Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) tracer kit (Invitrogen, США) по описанной ранее методике [17]. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 200000 клеток на лунку в среде RPMI1640, рестимулировали рекомбинантным S БВРС-КоВ (40071-V08B1; Sino Biological) в количестве 1 мкг/лунку. Через 72 ч собирали среду для последующего анализа ИФН-гамма, в это же время клетки собирали, промывали ФСБ и окрашивали антителами, специфическими к CD3, CD4 и CD8: меченные аллофикоцианином (APC) антитела к CD3, APC-Cy7-меченные антитела к CD8 и фикоэритрин-меченные антитела к CD4 (BD Biosciences, США) фиксировали в растворе 1% параформальдегида. Пролиферирующие CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS Aria III (BD Biosciences). Результирующий процент пролиферирующих клеток (X) рассчитывали по формуле $X = \%st - \%$, где %st – процент пролиферирующих клеток после рестимуляции спленцитов рекомбинантным гликопротеином S вируса БВРС-КоВ, а % – процент пролиферирующих клеток без рестимуляции (интактные клетки).

Концентрацию ИФН-гамма в среде измеряли методом ИФА с помощью коммерческого набора (mouse IFN- γ ELISA kit; Invitrogen) по протоколу фирмы-производителя. Прирост концентрации ИФН-гамма определяли по формуле $X = Cst/Cint$, где X – прирост концентрации ИФН-гамма (разы), Cst – концентрация

ИФН-гамма в среде от стимулированных клеток (пг/мл), Cint – концентрация ИФН-гамма в среде от нестимулированных (интактных) клеток (пг/мл).

Исследование протективной эффективности

Протективную эффективность вакцины изучали на модели летальной инфекции у трансгенных мышей, несущих ген рецептора hDPP4 человека, полученных от скрещивания гомозиготных трансгенных самцов hDPP4^{+/+} и нетрансгенных самок линии C57BL/6. Животных иммунизировали внутримышечно двукратно последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом 21 день. Через 7 дней после введения компонента 2 мышей заражали интраназально вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД₅₀ на животное, затем наблюдали выживаемость в течение 30 дней.

Доклинические исследования безопасности

Доклинические исследования безопасности комбинированной векторной вакцины против БВРС были проведены совместно с АНО «ИМБИИТ» и ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [18] и «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [19]. В рамках исследований безопасности было проведено изучение токсичности при однократном и повторном введении, изучение репродуктивной и онтогенетической токсичности, иммуногенности и аллергенности. Всего в доклинических исследованиях безопасности было использовано: мышей – 670 особей, крыс – 725 особей, кроликов – 24 особи, морских свинок – 120 особей, обыкновенных игрунок – 6 особей.

Переносимость вакцины приматами анализировали ежедневно по оценке физического состояния животных, а также наличие общих симптомов интоксикации, которые включали оценку поведения, внешнего вида и физиологических функций. Лабораторную оценку переносимости вакцины у игрунок проводили на основе мониторинга массы тела, ректальной температуры и биохимических показателей крови: общего билирубина, прямого билирубина, аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинина, общего белка и щелочной фосфатазы (ЩФ). Исследования проводили на полностью автоматических анализаторах СА-180 и В-200 (Furuno, Япония) с использованием наборов реагентов DiaSys (Германия).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ GraphPad

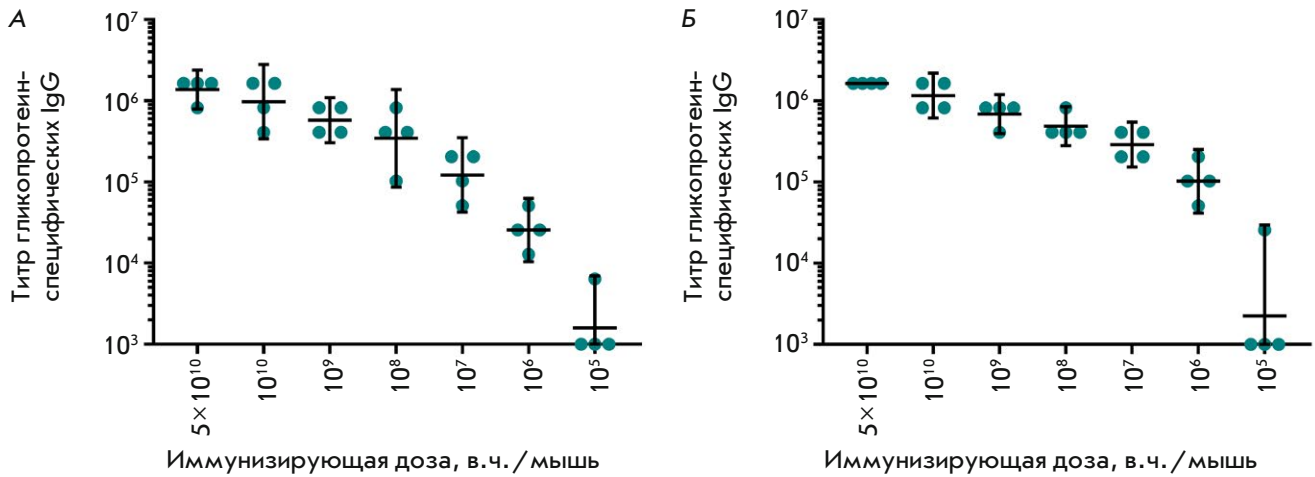


Рис. 1. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных животных через 2 (А) и 4 недели (Б) после бустерной вакцинации. По оси абсцисс представлены иммунизирующие дозы (в.ч./мышь), по оси ординат – реципрокные титры IgG. Также отмечены геометрические средние титров и 95% доверительный интервал

7.0. При анализе данных несвязанных выборок использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных [20]. При анализе данных связанных выборок использовали t-критерий Стьюдента для парных выборок или критерий Уилкоксона в зависимости от нормальности распределения данных [20]. Для определения нормальности распределения данных использовали обобщенный тест Дагостино–Пирсона [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммунизация животных комбинированной векторной вакциной индуцирует формирование длительного выраженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину БВРС-КоВ у мышей и приматов

Для подбора эффективной дозы мышей внутримышечно иммунизировали вакциной в дозах: 10^5 – 10^{10} , 5×10^{10} в.ч./мышь, через 2 и 4 недели после иммунизации собирали сыворотки крови и анализировали титры гликопротеин-специфических антител. Далее у животных отбирали сыворотки крови через 2 и 4 недели и исследовали напряженность поствакцинального гуморального иммунного ответа по титру гликопротеин-специфических IgG (рис. 1).

Анализ полученных результатов позволяет заметить дозозависимое увеличение титра гликопротеин-специфических IgG в сыворотке крови. При этом минимальная доза комбинированной векторной вакцины, необходимая для формирования напряженного гуморального иммунного ответа у всех вакцинируемых животных, – 10^6 в.ч./мышь. Определение длительности поствакцинального гуморального иммунного отве-

та показало, что через 6 месяцев после иммунизации в сыворотке крови мышей детектируются гликопротеин-специфические антитела в высоком титре (среднее геометрическое титра составило 1 : 182456, рис. 2).

Далее мы изучили напряженность гуморального иммунного ответа у приматов, вакцинированных разработанной вакциной. Для определения напряженности гуморального иммунитета обыкновенных игрунок (*S. jacchus*) иммунизировали комбинированной вакциной согласно схеме, предполагаемой для использования в клинической практике, – последовательно компонентом 1 (в дозе 10^{11} в.ч./животное) и компонентом 2 (в дозе 10^{11} в.ч./животное) вакцины с интервалом 21 день. Далее через 7 и 24 дня, а также 3 и 6 месяцев после бустерной иммунизации у животных отбирали плазму крови для анализа титра гликопротеин-специфических IgG (рис. 3А). Показано, что иммунизация приматов приводит к формированию вы-

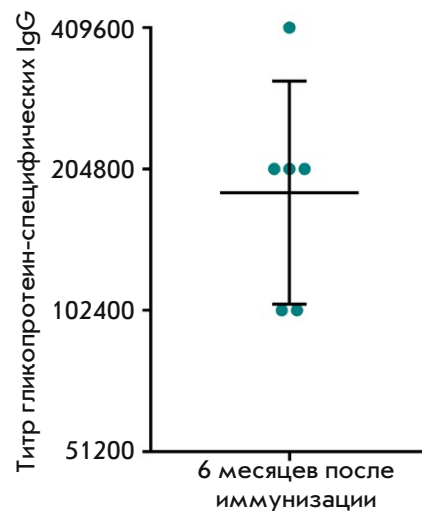


Рис. 2. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных животных через 6 месяцев после вакцинации. По оси ординат представлены реципрокные титры IgG. Также отмечены геометрическое среднее титра и 95% доверительный интервал ($n = 6$)

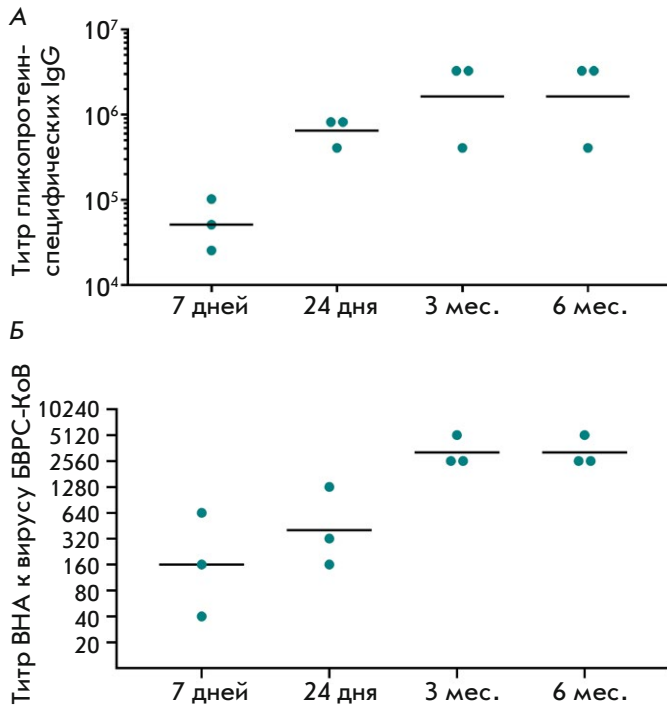


Рис. 3. А – титры гликопротеин-специфических IgG в плазме крови иммунизированных игрунок после вакцинации. По оси ординат представлены реципрокные титры IgG, по оси абсцисс – время после иммунизации. Отмечены индивидуальные титры для каждой особи, а также геометрическое среднее титра ($n = 3$). Б – титры вируснейтрализующих антител в плазме крови иммунизированных игрунок после вакцинации. По оси ординат представлены реципрокные титры ВНА к вирусу БВРС-КоВ, по оси абсцисс – время после иммунизации

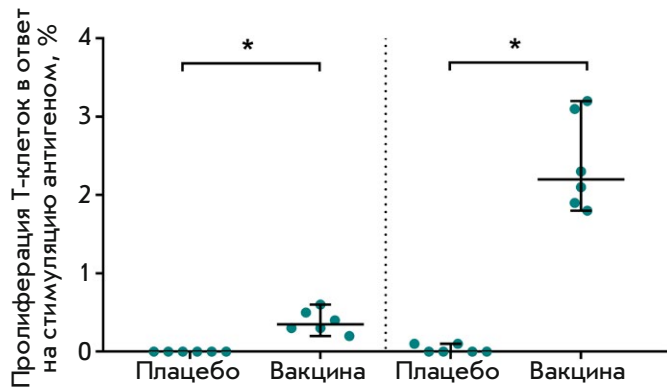


Рис. 4. Исследование лимфопролиферативной активности спленоцитов у иммунизированных вакциной и препаратом плацебо мышей. Отмечены уровни (в %) пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, рестимулированных белком S БВРС-КоВ на 18-й день после вакцинации. Отмечены медианы процента пролиферирующих клеток после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ($n = 6$). * $p < 0.05$

раженного гуморального иммунного ответа, который сохраняется не менее 6 месяцев. Так, титры гликопротеин-специфических IgG у приматов через 6 месяцев после иммунизации не отличались от титров через 3 месяца, что свидетельствует о формировании длительного иммунного ответа. При анализе титра вируснейтрализующих антител к вирусу БВРС-КоВ в плазме крови иммунизированных обезьян мы обнаружили, что уже через 7 дней после бустирующей иммунизации у животных детектируются ВНА, максимальный титр которых достигался через 3 и 6 месяцев после иммунизации (рис. 3Б). В плазме крови контрольных животных и животных до иммунизации ВНА не выявлены.

Таким образом, изучение напряженности поствакцинального иммунного ответа показало, что иммунизация мышей и приматов приводит к формированию мощного гуморального иммунного ответа, который сохраняется на протяжении не менее полугода после иммунизации животных.

Иммунизация мышей кандидатной вакциной индуцирует формирование выраженного клеточного иммунного ответа

Для оценки напряженности поствакцинального клеточного иммунного ответа мышей иммунизировали кандидатной вакциной против БВРС однократно в дозе 10⁷ в.ч./мышь. Через 18 дней после иммунизации у животных отбирали селезенки, выделяли спленоциты, определяли количество пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в культуре спленоцитов *in vitro* после рестимуляции клеток рекомбинантным белком S БВРС-КоВ (рис. 4). По результатам исследования было показано, что введение комбинированной векторной вакцины индуцирует формирование S-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Активацию клеточного звена иммунитета дополнительно анализировали по экспрессии ИФН-гамма. Результаты исследования прироста концентрации ИФН-гамма в среде *in vitro* культуры спленоцитов мышей после повторной стимуляции клеток рекомбинантным белком S БВРС-КоВ представлены на рис. 5. Показано, что введение вакцины индуцирует прирост концентрации ИФН-гамма в среде при стимуляции спленоцитов иммунизированных мышей гликопротеином S БВРС-КоВ. Концентрация ИФН-гамма в среде повышается при этом в среднем в 22 раза.

Резюмируя данные анализа антиген-специфической лимфопролиферативной активности CD4⁺ и CD8⁺ клеток и уровня экспрессии ИФН-гамма рестимулированными спленоцитами, можно заключить, что иммунизация животных комбинированной вакциной против БВРС приводит к формированию гликопротеин-специфического клеточного иммунного ответа.

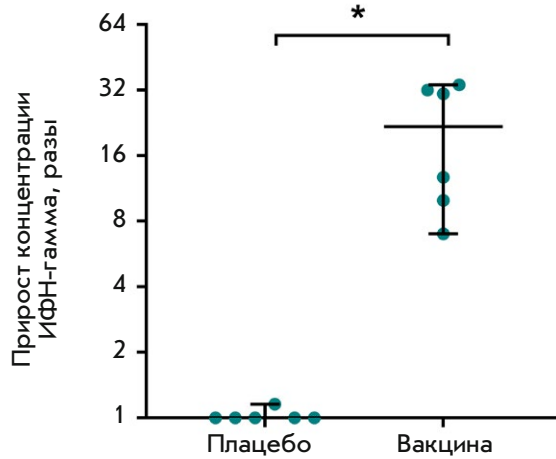


Рис. 5. Прирост концентрации ИФН-гамма в среде спленцитов иммунизированных и неиммунизированных мышей после рестимуляции рекомбинантным полноразмерным белком S вируса БВРС-КоВ. Отмечены медианы прироста концентрации ИФН-гамма после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы ($n = 6$). * $p < 0.05$

Комбинированная векторная вакцина защищает животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ

Исследование проводили на модели летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ, у трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека. Мышей иммунизировали последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Через неделю после введения компонента 2 вакцины животных заражали интраназально вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД₅₀ на животное и оценивали выживаемость в течение 30 дней. Показано, что иммунизация животных комбинированной векторной вакциной позволяет защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ. В контрольной группе погибли все животные (не вакцинированные) (рис. 6).

Комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС имеет благоприятный профиль безопасности и переносимости у животных

Общую и специфическую токсичность (токсичность при однократном и повторном введении, оценка местно-раздражающего действия, иммунотоксичность, аллергизирующие свойства и репродуктивная токсичность) оценивали на грызунах (мыши, крысы, морские свинки) и крупных животных (кролики). Было показано, что комбинированная векторная вакцина против БВРС не вызывает токсических эффектов, не оказывает аллергизирующего и иммунотоксического действия, не приводит к изменению

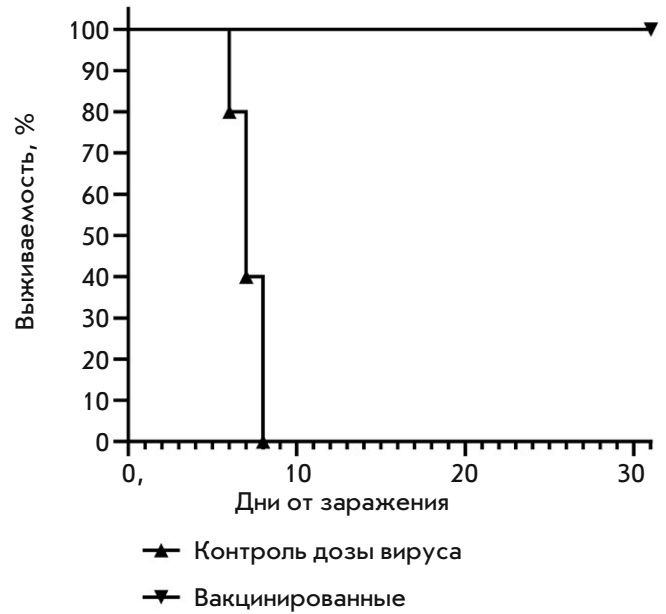


Рис. 6. Выживаемость вакцинированных ($n = 10$) и невакцинированных (контроль дозы вируса, $n = 10$) животных при заражении БВРС-КоВ

генеративной функции, не обладает местно-раздражающим действием и может быть рекомендована для проведения клинических исследований.

Переносимость вакцины изучена также на приматах. За период наблюдения не было выявлено отклонений в физическом состоянии животных, иммунизированных комбинированной векторной вакциной против БВРС, и животных из контрольной группы по анализируемым параметрам (поведенческие реакции, внешний вид, физиологические функции). В ходе эксперимента показатели ректальной температуры, изменения массы тела, а также биохимические показатели у всех животных находились в рамках нормальных для данного вида значений (рис. 7). Резюмируя полученные данные, можно заключить, что комбинированная векторная вакцина против БВРС показала хорошую переносимость на модели обыкновенных игрунок.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время в мире не существует специфических профилактических и терапевтических средств против ближневосточного респираторного синдрома. Интенсивные исследования по разработке вакцин против этого заболевания сегодня ведутся в США, Германии, Корею, Китае, Великобритании и других странах. Среди профилактических препаратов, показавших наибольшую эффективность в доклинических исследованиях, необходимо отметить кандидатные вакцины на основе: аденовирусных векторов (Ad5, Ad41, ChAdOx1) [22, 23], модифици-

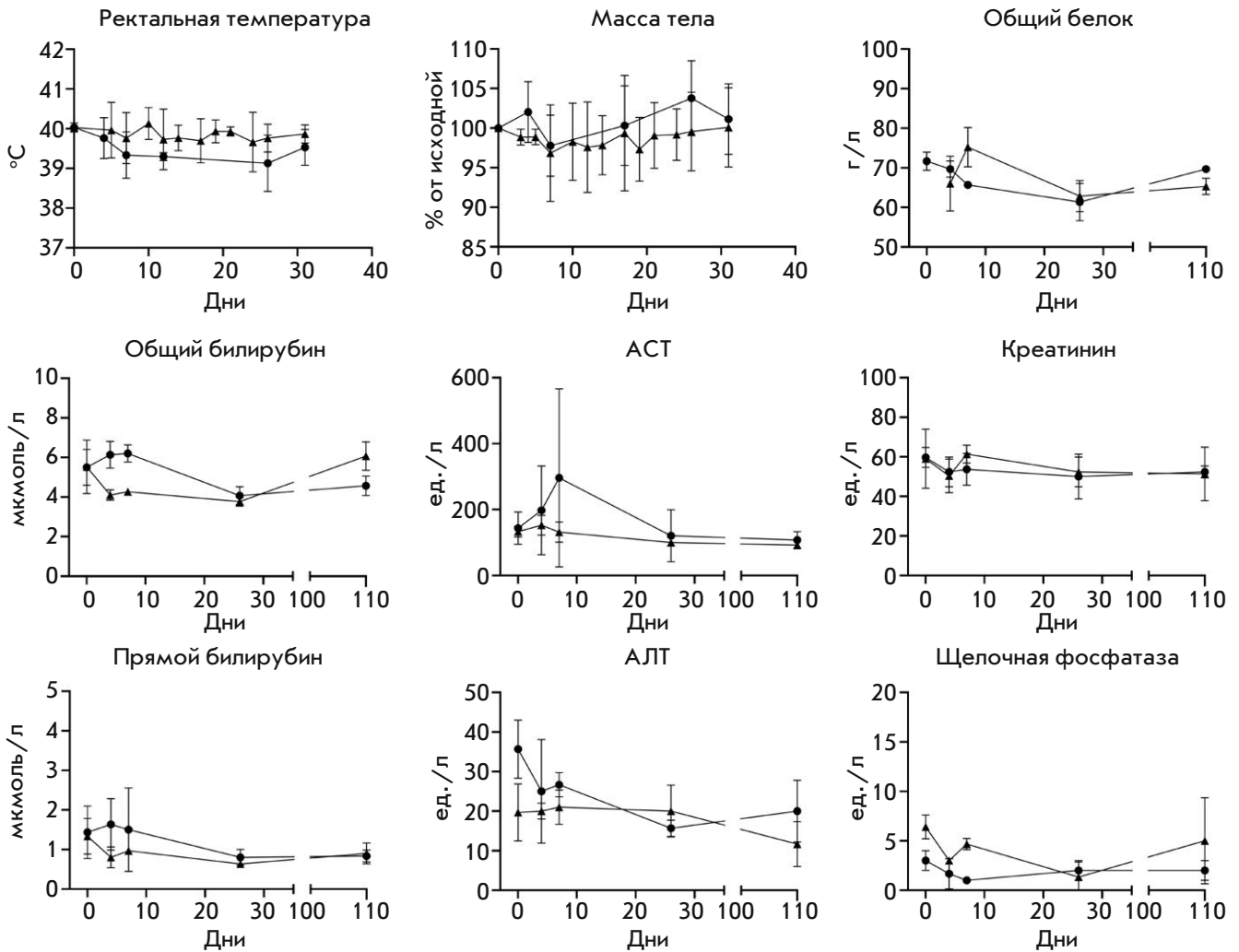


Рис. 7. Ректальная температура, масса тела и биохимические показатели крови приматов (обыкновенных игрунок), иммунизированных комбинированной векторной вакциной против БВРС (отмечены треугольниками), и контрольных животных (отмечены кругами)

рованного вируса осповакцины Анкара (MVA) [24], кодирующего протективный антиген S БВРС-КоВ, а также препараты рекомбинантного протективного антигена S БВРС-КоВ [25, 26]. Два препарата находятся на стадии клинических исследований: две вакцины на основе рекомбинантных вирусных векторов MERS001 (на основе аденовируса шимпанзе, 1 фаза) [27] и MVA-MERS-S (на основе вируса осповакцины, 2 фаза) [28]. Клинические исследования первой фазы вакцины на основе плазмидной ДНК GLS-5300, а также вакцины на основе вируса осповакцины MVA-MERS-S завершены [29, 30].

Все вакцины, вышедшие в клинические исследования, основаны на использовании гликопротеина S вируса БВРС-КоВ. Этот гликопротеин выполняет одну из важнейших задач в жизненном цикле вируса – обеспечивает его интернализацию путем взаимодействия с рецептором DPP4 на поверхности

клетки. Нейтрализация такого взаимодействия позволяет ограничивать проникновение вируса в клетку, что приводит к снижению его репликации.

Поскольку для защиты от БВРС важно формирование не только гуморального, но и клеточного иммунного ответа, перспективным направлением является разработка вакцин на основе рекомбинантных вирусных векторов. Такие векторы эффективно доставляют в клетки генетический материал, кодирующий антиген, что приводит к экспрессии антигена непосредственно самими клетками и формированию выраженного клеточного и гуморального иммунного ответа. Важным свойством рекомбинантных вирусных векторов является и то, что они позволяют сформировать протективный иммунный ответ уже после 1–2 иммунизаций, что крайне важно при разработке вакцин для профилактики опасных и особо опасных инфекций, применение которых планируется в рам-

ках разворачивающихся эпидемий или в случае завоза инфекции на неэндемичные территории.

Ранее нами было проведено исследование иммуногенности различных форм гликопротеина S вируса БВРС-КоВ: полноразмерный гликопротеин (S), полноразмерный гликопротеин с трансмембранным доменом белка G вируса везикулярного стоматита (S-G), секретлируемый рецепторсвязывающий домен гликопротеина (RBD), секретлируемый рецепторсвязывающий домен гликопротеина, слитый с Fc-фрагментом IgG1 человека (RBD-Fc) и мембранная форма рецепторсвязывающего домена гликопротеина (RBD-G) [31] – по результатам которых было показано, что для формирования наиболее мощного гуморального иммунного ответа необходимо использовать мембранную форму рецепторсвязывающего домена, а для формирования выраженного клеточного иммунного ответа – полноразмерный гликопротеин. При выборе схемы иммунизации важно учитывать, что для формирования длительного иммунного ответа целесообразно использовать подход гетерологичной двукратной вакцинации, когда для первичной и для вторичной иммунизации используют два разных рекомбинантных вирусных вектора. В связи с этим в состав комбинированной вакцины против БВРС вошли два рекомбинантных вектора на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов. В состав компонента 1 вошел рекомбинантный вектор rAd26-RBD-G, а в состав компонента 2 вакцины вошли два рекомбинантных вектора rAd5-S и rAd5-RBD-G.

Исследования иммуногенности комбинированной векторной вакцины показали, что у мышей формируется длительный гуморальный иммунный ответ, при этом титр гликопротеин-специфических антител через 2 недели после вакцинации в дозе 10^7 в.ч./мышь составил в среднем 1/121775. Схожий титр антител наблюдали Alharbi с соавт. у мышей через 28 дней после иммунизации вакциной против БВРС на основе аденовируса шимпанзе ChAdOx1 MERS [12], однако для иммунизации мышей они использовали дозу 10^8 в.ч./мышь. В дальнейшем исследовании Munster с соавт. показали [13], что иммунизация трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, вакциной ChAdOx1 MERS в дозе 10^8 в.ч./мышь позволяет защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ. В работе Hashem с соавт., которые разработали препарат на основе rAd5, несущего последовательность S1 БВРС-КоВ, показано, что двукратная иммунизация мышей препаратом в дозе 10^9 в.ч./мышь приводила к формированию гуморального иммунного ответа, при этом титр гликопротеин-специфических IgG составил 1/70000 через 3 недели после второй иммунизации (полтора месяца от начала иммунизации), а также позволяла

защитить 100% животных от инфекции, вызванной БВРС-КоВ [32].

Показано, что уже через неделю после бустирующей иммунизации у животных в плазме крови детектируются гликопротеин-специфические антитела в титре 1/25600 – 1/102400. Важно отметить, что в работе Muthumani с соавт. [33] у приматов после длительной трехкратной иммунизации ДНК-вакциной на протяжении 6 недель детектируют гликопротеин-специфические антитела в титре 1/20000, а также показано, что иммунизация приматов ДНК-вакциной позволяет защитить их от инфекции, вызванной БВРС-КоВ.

Исследование поствакцинального гуморально-иммунного ответа у мышей и приматов показало, что у животных напряженный гуморальный иммунный ответ сохраняется на протяжении не менее 6 месяцев после вакцинации. Исследования клеточного звена иммунитета у мышей показали, что введение разработанной вакцины позволяет сформировать полноценный клеточный ответ, при этом важно, что развивается не только CD4⁺ ответ, но также и CD8⁺, который может играть важную роль в защите от БВРС-КоВ [34, 35].

По завершении исследований иммуногенности комбинированной векторной вакцины на модели летальной инфекции у трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, была изучена протективность этой вакцины. Показано, что вакцина защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ. В серии доклинических исследований безопасности вакцины не было выявлено противопоказаний к проведению клинических исследований разработанной вакцины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучена иммуногенность и безопасность комбинированной векторной вакцины для профилактики ближневосточного респираторного синдрома. Проведенные исследования показали следующее:

Вакцинация животных индуцирует формирование напряженного гуморального иммунного ответа на гликопротеин S БВРС-КоВ, который сохраняется на протяжении не менее 6 месяцев.

Вакцинация животных индуцирует формирование напряженного клеточного иммунного ответа на гликопротеин S БВРС-КоВ.

Вакцинация животных индуцирует формирование протективного иммунного ответа, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом БВРС-КоВ.

Доклинические исследования безопасности вакцины не выявили противопоказаний к проведению клинических исследований. ●

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Исследование финансировано Министерством здравоохранения Российской Федерации (Государственные задания № 056-00108-18-00, 056-00078-19-00).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A.M., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 14. P. 7790–7792.
2. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 367. № 19. P. 1814–1820.
3. Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alshahafi A.J., Al Rabeeah A.A., Corman V.M., Sieberg A., Makhdoom H.Q., Assiri A., et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2014. V. 20. № 6. P. 1012–1015.
4. Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D., Raj V.S., Mohran K.A., Moussa H.A., Ghobashy H., et al. // *Euro Surveill.* 2014. V. 19. № 23. P. 1–5.
5. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2019. URL: <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/> (дата обращения: 15.10.19).
6. Aly M., Elrobh M., Alzayer M., Aljuhani, S., Balkhy H. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 10. P. 1–11.
7. World Health Organisation. WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint). 2017. URL: <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf> (дата обращения: 15.10.19).
8. Okba N.M., Raj V.S., Haagmans B.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 23. P. 49–58.
9. Ma C., Wang L., Tao X., Zhang N., Yang Y., Tseng C.T.K., Li F., Zhou Y., Jiang S., Du L. // *Vaccine.* 2014. V. 32. № 46. P. 6170–6176.
10. Nyon M.P., Du L., Tseng C.K., Seid C.A., Pollet J., Naceanceno K.S., Agrawal A., Algaissi A., Peng B.H., Tai W., et al. // *Vaccine.* 2018. V. 36. № 14. P. 1853–1862.
11. Tai W., Zhao G., Sun S., Guo Y., Wang Y., Tao X., Tseng C.K., Li F., Jiang S., Du L., et al. // *Virology.* 2016. V. 499. P. 375–382.
12. Alharbi N.K., Padron-Regalado E., Thompson C.P., Kupke A., Wells D., Sloan M.A., Grehan K., Temperton N., Lambe T., Warimwe G., et al. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 30. P. 3780–3788.
13. Munster V.J., Wells D., Lambe T., Wright D., Fischer R.J., Bushmaker T., Saturday G., Van Doremalen N., Gilbert S.C., De Wit E., et al. // *NPJ Vaccines.* 2017. V. 2. P. 28.
14. Malczyk A.H., Kupke A., Prüfer S., Scheuplein V.A., Hutzler S., Kreuz D., Beissert T., Bauer S., Hubich-Rau S., Tondera C., et al. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 22. P. 11654–11667.
15. Modjarrad K. // *Vaccine.* 2016. V. 34. № 26. P. 2982–2987.
16. International Multicenter Study of the Immunogenicity of Medicinal Product GamEvac-Combi. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03072030. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03072030> (дата обращения: 15.10.19).
17. Quah B.J., Warren H.S., Parish C.R. // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 9. P. 2049–2056.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
19. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Под ред. Хабриева Р.У. М.: Медицина, 2005. 832 с.
20. Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.М. // *Экология человека.* 2011. № 5. С. 55–60.
21. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Учебное пособие. Пер. с англ. / Под ред. Леонова В.П. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015.
22. Guo X., Deng Y., Chen H., Lan J., Wang W., Zou X., Hung T., Lu Z., Tan W. // *Immunology.* 2015. V. 145. № 4. P. 476–484.
23. Kim E., Okada K., Kenniston T., Raj V.S., AlHajri M.M., Farag E.A., AlHajri F., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gambotto A. // *Vaccine.* 2014. V. 32. № 45. P. 5975–5982.
24. Volz A., Kupke A., Song F., Jany S., Fux R., Shams-Eldin H., Schmidt J., Becker C., Eickmann M., Becker S., et al. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 16. P. 8651–8656.
25. Coleman C.M., Venkataraman T., Liu Y.V., Glenn G.M., Smith G.E., Flyer D.C., Frieman M.B. // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 12. P. 1586–1589.
26. Tang J., Zhang N., Tao X., Zhao G., Guo Y., Tseng C.T., Jiang S., Du L., Zhou Y. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015. V. 11. № 5. P. 1244–1250.
27. Safety and Immunogenicity of a Candidate MERS-CoV Vaccine (MERS001). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03399578 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03399578> (дата обращения: 15.10.19).
28. Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase Ib Study to Assess the Safety and Immunogenicity of MVA-MERS-S_DF-1. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04119440 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04119440> (дата обращения: 15.10.19).
29. Phase I, Open Label Dose Ranging Safety Study of GLS-5300 in Healthy Volunteers ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02670187 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670187> (дата обращения: 15.10.19).
30. Safety, Tolerability and Immunogenicity of Vaccine Candidate MVA-MERS-S. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03615911 URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615911> (дата обращения: 15.10.19).
31. Ozharovskaia T.A., Zubkova O.V., Dolzhikova I.V., Gromova A.S., Grousova D.M., Tikhvatulin A.I., Popova O., Shchelyakov D.V., Scherbinin D.N., Dzharullaeva A.S., et al. // *Acta Naturae.* 2019. V. 11. № 1. P. 38–47.
32. Hashem A.M., Algaissi A., Agrawal A.S., Al-Amri S.S., Alhabbab R.Y., Sohrab S.S., Almasoud A., Alharbi N.K., Peng B.H., Russell M., et al. // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 220. № 10. P. 1558–1567.
33. Muthumani K., Falzarano D., Reuschel E.L., Tingey C., Flinagai S., Villarreal D.O., Wise M., Patel A., Izmirly A., Aljuaid A., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. № 301. P. 301ra132.
34. Zhao J., Li K., Wohlford-Lenane C., Agnihothram S.S., Fett C., Zhao J., Gale M.J. Jr., Baric R.S., Enjuanes L., Gallagher T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 13. P. 4970–4975.
35. Zhao J., Alshukairi A.N., Baharoon S.A., Ahmed W.A., Bokhari A.A., Nehdi A.M., Layqah L.A., Alghamdi M.G., Al Gethamy M.M., Dada A.M., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 14. P. eaan5393.