

*На правах рукописи*

**ОЖАРОВСКАЯ ТАТЬЯНА АНДРЕЕВНА**

**РАЗРАБОТКА ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ  
БЛИЖНЕВОСТОЧНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА (БВРС) И  
ОЦЕНКА ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТИ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

03.01.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации)

**Научные руководители:**

**Шмаров Максим Михайлович** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Зубкова Ольга Вадимовна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Официальные оппоненты:**

**Забережный Алексей Дмитриевич** – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, директор федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП)

**Филатов Александр Васильевич** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в «\_\_\_» часов на заседании Диссертационного совета Д 208.130.01 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Русакова Екатерина Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

За последние два десятилетия в мире появилось три опасных для человека коронавируса: коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС-КоВ) в 2002 году, спустя десять лет – коронавирус Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), а в конце 2019 года – коронавирус SARS-CoV-2 [Al-Omari A. et al., 2018; Baek W. K. et al., 2020; Tong T. R., 2006]. В отличие от всех коронавирусов, поражающих человека, ТОРС-КоВ, БВРС-КоВ и SARS-CoV-2 связаны с серьезными заболеваниями дыхательной системы. Каждый из этих вирусов представляет большую угрозу для населения планеты. ТОРС-КоВ распространился на 29 стран по всему миру, инфицировав около 8000 человек (летальность около 10%), SARS-CoV-2 вызвал пандемию, заразив по данным на конец мая 2022 г. более 500 миллионов человек (летальность около 1,2%) [Ashour H. M. et al., 2020; WHO, 2022]. Однако наиболее опасным из данных коронавирусов является БВРС-КоВ, поскольку в настоящее время летальность составляет 34,4%. На сегодняшний день по данным ВОЗ зарегистрировано 2585 клинически подтвержденных случаев инфекции БВРС-КоВ, из них 890 случаев летального исхода.

Причинами, по которым новые коронавирусы периодически возникают в человеческой популяции, являются: широкое распространение этих вирусов, большое генетическое разнообразие и частая рекомбинация их геномов, а также увеличение количества контактов между человеком и животными. Помимо этого, скорость возникновения мутаций у РНК-вирусов в миллион раз выше, чем у их хозяев. Высокая частота мутаций коррелирует с увеличением вирулентности вируса, возможностью межвидовой передачи и способностью быстро претерпевать эволюционные изменения – признаками, которые облегчают адаптацию вируса к хозяину, позволяют избегать иммунный ответ и развивать устойчивость к лекарствам [Duffy S., 2018].

Существует вероятность того, что в результате возникновения мутаций повысится афинность связывания с рецептором на клетках и увеличится трансмиссивность уже циркулирующего в человеческой популяции вируса. Это может привести к тому, что наиболее летальный из коронавирусов, поражающих людей, БВРС-КоВ, вызовет пандемию, аналогичную COVID-19.

БВРС-КоВ инфицирует бесресничные эпителиальные клетки бронхов и альвеоциты 2-го типа и вызывает острое заболевание дыхательной системы, которое характеризуется лихорадкой, кашлем, одышкой и тяжелыми осложнениями, такими как пневмония, почечная и полиорганная недостаточность [Ashour H. M. et al., 2020; Zaki A. M. et al., 2012]. Первый

случай Ближневосточного респираторного синдрома был диагностирован в 2012 году в Саудовской Аравии. БВРС тяжелее протекает у пожилых людей, лиц с ослабленной иммунной системой и страдающих хроническими заболеваниями. С меньшей вероятностью болезнь может протекать с легкими симптомами, а в еще более редких случаях – бессимптомно.

Согласно информации, предоставляемой ВОЗ, в настоящее время случаи заболевания зафиксированы в 27 странах мира, из них большинство (84,5%) – в Саудовской Аравии. Последняя крупная вспышка за пределами данной страны произошла в Южной Корее с мая по июль 2015 года, когда из 186 заболевших погибло 36 человек [Lee S. S. et al., 2015]. Эта вспышка показала, что БВРС-КоВ способен распространяться в страны, удаленные от Саудовской Аравии, что еще больше усиливает важность разработок мер профилактики и терапевтической защиты от этой инфекции.

Основным источником заражения людей БВРС-КоВ (а также природным резервуаром) являются верблюды. Одна из причин зоонозной трансмиссии коронавируса – потребление человеком непастеризованного верблюжьего молока [Memish Z. A. et al., 2014; Reusken C. V. et al., 2014]. Кроме того, возможна передача коронавируса по воздуху и от человека к человеку [Azhar E. I. et al., 2014]. При этом вероятность заражения в медицинских центрах и среди членов семьи выше, чем в других ситуациях [The WHO MERS-CoV Research Group, 2013].

Высокая летальность и широкое распространение БВРС-КоВ привели к тому, что ВОЗ включила этот патоген в список приоритетных, которые необходимо всесторонне исследовать. Кроме того, должна вестись разработка вакцин против этих возбудителей, поскольку они способны вызвать чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения [WHO, 2017]. На данный момент не существует ни одной зарегистрированной вакцины для профилактики БВРС.

Таким образом, в связи со сложившейся в мире ситуацией по БВРС, связанной с опасностью заноса возбудителя в страну, задача по созданию вакцин против данного заболевания в РФ стала особо актуальной.

### **Цель исследования**

Разработка вакцинного препарата на основе рекомбинантного аденовируса для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и доклиническая оценка его безопасности и эффективности.

### **Задачи исследования**

1. Выбрать консенсусную последовательность гена гликопротеина S, наиболее гомологичную для современных штаммов БВРС-КоВ, и

последовательности, кодирующие различные формы белка S.

2. Получить рекомбинантные векторы на основе аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующие различные варианты гена гликопротеина БВРС-КоВ, оценить их иммуногенные свойства.

3. Определить состав и форму вакцинного препарата для профилактики БВРС и исследовать экспериментальные серии препарата на соответствие требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам.

4. Исследовать протективные свойства вакцинного препарата *in vivo*.

5. Провести доклиническую оценку безопасности и иммуногенности вакцинного препарата для профилактики БВРС на приматах.

### **Научная новизна**

В результате работы впервые разработан дизайн генетических конструкций, на основе которых получены рекомбинантные аденовирусы, экспрессирующие: ген гликопротеина S с последовательностью трансмембранного домена гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (S-G), последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) белка S с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (RBD-G), RBD с Fc-фрагментом иммуноглобулина G человека (RBD-Fc).

Впервые проведено одновременное сравнение иммуногенности пяти различных вариантов гена белка S БВРС-КоВ в составе аденовирусных векторов: S (полноразмерный гликопротеин), S-G, RBD, RBD-G, RBD-Fc.

Показано, что все разработанные формы гликопротеина S индуцируют формирование S-специфичного гуморального и клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных.

Создан новый лиофилизированный вакцинный препарат на основе Ad5-RBD-G и Ad5-S, который обеспечивает индукцию высокого уровня как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Показана протективная активность кандидатной вакцины на модели соматических трансгенных мышей.

Новизна исследований подтверждена Патентом РФ на изобретение RU 2709659 C1.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В результате проведенных исследований получены рекомбинантные аденовирусы, на основе которых разработан вакцинный препарат для профилактики БВРС. Данный препарат является высоко иммуногенным и безопасным. Дальнейшие доклинические испытания препарата позволили получить разрешение на проведение клинических исследований [<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04130594>], которые завершились в настоящее время. По их результатам будут поданы документы для получения

разрешения на регистрацию вакцины для медицинского применения.

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой исследования послужили современные подходы, теоретические и экспериментальные исследования по разработке вакцин на основе рекомбинантных аденовирусных векторов. В работе использованы актуальные молекулярно-биологические, бактериологические, вирусологические, иммунологические и биоинформатические методы, а также методы статистической обработки данных и методы работы с лабораторными животными.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1) При исследовании гуморального иммунного ответа, сформированного иммунизацией рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими различные формы гена S БВРС-КоВ, показано, что наиболее выраженный иммунный ответ развивается у мышей, которых вакцинировали вектором на основе рецептор-связывающего домена гена S, слитого с трансмембранным доменом гена гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (Ad5-RBD-G). При исследовании клеточного иммунного ответа, сформированного вакцинацией полученными рекомбинантными аденовирусными векторами, показано, что наиболее выраженный ответ развивается у мышей, которым вводили вектор, экспрессирующий полноразмерный ген S (Ad5-S).

2) Иммунизация лиофилизированным вакцинным препаратом (Ad5-S и Ad5-RBD-G) приводит к формированию напряженного протективного иммунитета у лабораторных животных: титр вируснейтрализующих антител (ВНА) к БВРС-КоВ составил в среднем 1:160 через две недели после иммунизации.

3) В рамках доклинических исследований на лабораторных животных показано, что внутримышечное введение вакцинного препарата для профилактики БВРС вызывает формирование стойкого иммунного ответа у приматов и не влияет на внешний вид, общее состояние и поведение животных, что свидетельствует о хорошей переносимости и безопасности препарата.

### **Личный вклад автора**

Автор лично осуществил выбор консенсусной последовательности и пяти различных форм гена гликопротеина S БВРС-КоВ и получил рекомбинантные векторы на основе аденовируса человека 5-го серотипа, несущие данные формы гена. При непосредственном участии автора изучена экспрессия различных

форм гена S в составе полученных рекомбинантных аденовирусных векторов методом иммуноблоттинга, исследована напряженность гуморального и клеточного иммунного ответа к антигену S у мышей, иммунизированных полученными рекомбинантными аденовирусами. Автор лично определил оптимальный состав и форму вакцинного препарата для профилактики БВРС, исследовал экспериментальные серии вакцины на соответствие требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам, проанализировал и обобщил полученные результаты. Секвенирование генов проводилось совместно с к.б.н. Ворониной О.Л., зав. лаб. анализа геномов (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации). Очистка и получение лиофильно высушенных препаратов рекомбинантных аденовирусов выполнены под руководством к.б.н. Семихина А.С. (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации). Исследование напряженности клеточного иммунного ответа проводилось совместно с к.б.н. Тухватулиным А.И. (лаб. клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации). Исследование протективной активности разработанной кандидатной вакцины выполнено совместно с ФГБУ «48 ЦНИИ» Министерства обороны Российской Федерации. Исследование безопасности и иммуногенности вакцинного препарата на приматах выполнено вместе с ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Автор непосредственно исследовал влияние предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору на эффективность иммунизации полученным вакцинным препаратом.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в медико-биологических исследованиях 5%-ом уровне значимости (0,05).

### **Внедрение полученных результатов в практику**

Выполненная работа – это законченное научное исследование, имеющее выраженную прикладную направленность. В рамках диссертационной работы были разработаны следующие методы, используемые при производстве и контроле качества аденовирусных препаратов в филиале «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации: метод проверки наличия микоплазмы в клеточных сборах, вирусных сборах и концентратах рекомбинантных аденовирусов (rAd5, rAd26);

метод определения остаточной ДНК культуры клеток НЕК293 в концентратах и готовой лекарственной форме препаратов на основе рекомбинантных аденовирусов (rAd5, rAd26); метод определения количества аденовирусных частиц (rAd5, rAd26) с использованием спектрофотометрии, что подтверждается актами о внедрении результатов в практику. Получен патент РФ на изобретение RU 2709659 C1.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы были представлены на XVII Молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2017), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2018), XIX всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2019), XXXI Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2019), двух международных конференциях «Perspective technologies in vaccination and immunotherapy» (Москва, 2018 и 2020). Апробация диссертации состоялась 15 октября 2020 года на совместной научной конференции отдела генетики и молекулярной биологии бактерий и отдела иммунологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 2).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология» и 03.01.03 – «молекулярная биология».

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликованы 11 печатных работ, 5 из которых – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных научных результатов диссертации. Имеется патент РФ на изобретение № RU 2709659 C1. Общий объем публикаций составил 111 печатных страниц (6,81 авторских листов), доля авторского участия достигает 70%.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 191 странице машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение,



выводы, список литературы (265 источников, из которых отечественных публикаций – 20, иностранных публикаций – 245). Работа содержит 15 таблиц и 31 рисунок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

**Выбор консенсусной последовательности гена гликопротеина S БВРС-КоВ.** Консенсусная последовательность белка S БВРС-КоВ выбрана посредством выравнивания 179 последовательностей, взятых из общедоступного источника NCBI, в программе Geneious 10.0.9.

**Получение и анализ рекомбинантных аденовирусов, кодирующих различные варианты гена S БВРС-КоВ.** Создание плазмидных конструкций, содержащих полноразмерный геном аденовируса человека 5-го серотипа и несущих последовательности различных вариантов гена S БВРС-КоВ, проводили методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* по стандартному протоколу. Получение инфекционных аденовирусных частиц осуществлялось трансфекцией клеток НЕК293 (клетки почки эмбриона человека, несущие в своем геноме E1 область Ad5) созданными аденовирусными векторами методом липофекции. Рекомбинантные аденовирусы были накоплены в препаративных количествах, очищены методом хроматографии и охарактеризованы по количеству вирусных частиц спектрофотометрическим методом, количеству инфекционных частиц методом титрования по конечным точкам ТЦД<sub>50</sub>, а также по размеру частиц. Экспрессию гена S БВРС-КоВ в составе полученных рекомбинантных аденовирусов изучали методом иммуноблоттинга с использованием антител, специфичных к гликопротеину S (40069-RP02, Sino Biological, Китай), и антител, специфичных к IgG кролика (NA934V, GE, Великобритания).

**Исследование иммуногенности полученных препаратов рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих различные варианты гена S БВРС-КоВ.** Мышей линии C57/BL6 однократно внутримышечно иммунизировали препаратами Ad5-S, Ad5-S-G, Ad5-RBD, Ad5-RBD-G, Ad5-RBD-Fc или Ad5-null (Ad5, не содержащий вставок) в дозе 10<sup>8</sup> в.ч. Контрольной группе вводили фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Иммуногенность препаратов оценивали по способности индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет у подопытных животных. Гуморальный иммунитет у грызунов исследовали методом ИФА путем детекции антител к гликопротеину S БВРС-КоВ и к RBD в сыворотке периферической крови, для чего использовали следующие рекомбинантные белки: гликопротеин S (40069-V08B, Sino Biological, Китай) и RBD (40071-V08B1, Sino Biological, Китай). Клеточный иммунитет изучали

методами ELISPOT и проточной цитофлюориметрии по количеству клеток, ответивших на стимуляцию белком S. Методом ELISPOT определяли количество ИФН-гамма-секретирующих спленоцитов, проточной цитофлюориметрией – количество пролиферирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток.

**Определение состава и формы вакцинного препарата для профилактики БВРС.** По результатам экспериментов по иммуногенности выбрали компоненты вакцинного препарата, подобрали оптимальную дозу путем анализа напряженности гуморального иммунитета у мышей после иммунизации разными дозами ( $10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $10^8$  в.ч./мышь) кандидатной вакцины. Далее определяли форму вакцинного препарата, исследовали его стабильность методом титрования по конечным точкам ТЦД<sub>50</sub>. Экспериментальные серии кандидатной вакцины изучали на соответствие требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам.

**Изучение протективных свойств вакцинного препарата для профилактики БВРС *in vivo*.** Исследование выполняли совместно с ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны РФ. Эксперимент проводили на мышах линии C57/BL6, экспрессирующих в легких ген дипептидил пептидазы 4 человека (hDPP4). Животных инфицировали БВРС-КоВ в дозе  $1 \times 10^6$  БОЕ/мышь.

**Изучение безопасности и иммуногенности вакцинного препарата для профилактики БВРС на приматах.** Исследование проводили совместно с ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Для исследования безопасности обыкновенных игрунок (*Callithrix jacchus*) иммунизировали однократно вакцинным препаратом  $(1 \pm 0,5) \times 10^{11}$  в.ч. на животное, контрольной группе вводили буфер, соответствующий восстановленному препарату. У животных измеряли вес и температуру тела, оценивали наличие общих симптомов интоксикации. Изучение иммуногенности включало в себя оценку напряженности специфического клеточного и гуморального иммунного ответа.

**Исследование влияния предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору на эффективность иммунизации.** В рамках клинических исследований II фазы из ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» были получены сыворотки добровольцев. Титр ВНА к Ad5 определяли в реакции вирус-нейтрализации на культуре клеток НЕК293. Титр S-специфических антител в сыворотках крови добровольцев определяли методом ИФА.

**Статистическая обработка результатов исследований.** Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ GraphPad 5.0 и GraphPad 7.0 (GraphPad Software, США), а также «Excel» («Microsoft», США). При анализе данных несвязанных выборок использовали критерий Стьюдента для независимых образцов или критерий Манна-Уитни в зависимости от

нормальности распределения данных. Нормальность распределения определяли с помощью обобщенного теста Д'Агостино-Пирсона. Результаты сравнения экспериментальных и контрольных групп считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .






### Результаты исследований и их обсуждение

**Выбор консенсусной последовательности и различных форм гена гликопротеина S БВРС-КоВ.** Ключевым моментом при создании вакцины является выбор антигена. Гликопротеин S БВРС-КоВ является протективным антигеном, поскольку может вызывать образование ВНА, при этом большая часть нейтрализующих эпитопов находится в рецептор-связывающем домене [Du L. et al., 2013; Mou H. et al., 2013; Wang L. et al., 2015]. Эффективным подходом при разработке дизайна иммуногена для вакцинного препарата является создание синтетического антигена, основанного на консенсусной последовательности (наиболее гомологичной для разных штаммов вируса). Поэтому нами была сконструирована консенсусная аминокислотная последовательность полноразмерного гликопротеина S на основе 179 вариантов современных штаммов (2015-2017 гг.) БВРС-КоВ, изолированных от человека.

Большинство кандидатных вакцин против БВРС-КоВ основаны на полноразмерном белке S или его части. Несмотря на это, вопрос о том, какую именно форму выбрать для получения эффективной вакцины: S, одну из субъединиц или RBD, пока остается открытым. Поэтому помимо белка S, нами была выбрана еще одна форма антигена на его основе. Вариант, названный S-G (Таблица 1), содержит ген S с последовательностью трансмембранного домена гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (VSV). Наличие этого домена должно обеспечить заякоривание белка S на мембране клетки для более эффективного распознавания клетками иммунной системы.

Поскольку ВНА к БВРС-КоВ в большинстве нацелены на рецептор-связывающий домен S белка, в исследование иммуногенности включили три конструкции, содержащие RBD. Первая форма содержала RBD с лидерным пептидом (LP) секретлируемой щелочной фосфатазы на N-конце для эффективной внеклеточной секреции. Вторая форма представлена RBD с LP и последовательностью Fc-фрагмента человеческого IgG1 на C-конце. Такая модификация должна усиливать иммуногенность за счет возможного связывания с Fc-рецептором на антиген-презентирующих клетках [Li Z. et al., 2011], а также увеличивать стабильность белка и продлевать период его полужизни *in vivo* [Zhang M. Y. et al., 2009]. Третья форма содержала RBD с LP и последовательностью трансмембранного домена гликопротеина G VSV. Данная форма также будет заякорена на мембране клетки.

Таблица 1 – Различные формы белка S БВРС-КоВ

На основе полноразмерного S	На основе RBD
S 	RBD 
S-G 	RBD-Fc 
	RBD-G 

Для обеспечения высокого уровня продукции белка S кодоны оптимизировали под экспрессию в клетках млекопитающих и все пять последовательностей различных вариантов гена гликопротеина S БВРС-КоВ были синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (Россия).

Помимо выбора антигена, вторым ключевым моментом в разработке кандидатной вакцины является поиск подходящей векторной платформы. Рекомбинантные аденовирусы обладают рядом характеристик, учитываемых при создании вакцинных препаратов, в том числе возможность получать препарат в высоком титре в условиях производства, полностью охарактеризованный профиль безопасности и возможность индуцировать в организме сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Из ряда известных аденовирусов, самым изученным является аденовирус человека 5-го серотипа (Ad5), поэтому он стал основой для создания векторов.

**Конструирование рекомбинантных векторов на основе аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующих различные варианты гена S БВРС-КоВ.** Получение рекомбинантных Ad5, экспрессирующих различные формы гликопротеина S БВРС-КоВ, происходило в три этапа. На первом этапе были синтезированы пять вариантов последовательностей гена S (S, S-G, RBD, RBD-Fc, RBD-G) и предоставлены в виде промежуточных плазмид. На втором этапе каждый из генов клонировали в вектор pShuttle-CMV (StrataGen, США), несущий пустую экспрессионную кассету и плечи гомологии с последовательностью рекомбинантного Ad5. Наконец, на третьем этапе получали пять аденовирусных векторов методом гомологичной рекомбинации.

Таким образом, нами было сконструировано пять рекомбинантных плазмид: pAd5-S, pAd5-S-G, pAd5-RBD, pAd5-RBD-G и pAd5-RBD-Fc.

Далее методом трансфекции клеток HEK293 получили пять рекомбинантных аденовирусов, содержащих различные варианты гена S БВРС-КоВ: Ad5-S, Ad5-S-G, Ad5-RBD, Ad5-RBD-G, Ad5-RBD-Fc. Очистку вирусов проводили методом хроматографии. Характеристики всех аденовирусов

представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика полученных рекомбинантных аденовирусов

Название препарата	Среднее количество, в.ч./мл	Среднее значение титра, ТЦД <sub>50</sub> /мл	Размер в.ч., нм	Количество остаточной ДНК НЕК293, нг/мл
Ad5-S	$(1,21 \pm 0,04) \times 10^{12}$	$(2,62 \pm 1,36) \times 10^9$	160,2	0,05
Ad5-S-G	$(1,22 \pm 0,09) \times 10^{12}$	$(2,85 \pm 1,09) \times 10^9$	127,6	0,06
Ad5-RBD	$(2,06 \pm 0,06) \times 10^{12}$	$(2,59 \pm 1,57) \times 10^9$	140,8	0,6
Ad5-RBD-Fc	$(1,12 \pm 0,09) \times 10^{12}$	$(2,32 \pm 0,90) \times 10^9$	127,5	0,08
Ad5-RBD-G	$(2,04 \pm 0,09) \times 10^{12}$	$(3,22 \pm 2,31) \times 10^9$	135,0	0,03

Из представленных результатов видно, что полученные очищенные рекомбинантные аденовирусы обладают высокой концентрацией, которая находится в диапазоне от  $1,1 \times 10^{12}$  в.ч. до  $2,1 \times 10^{12}$  в.ч. на мл образца, высоким титром (среднее значение титра находится в диапазоне от  $2,5 \times 10^9$  до  $3,5 \times 10^9$  ТЦД<sub>50</sub>/мл), стандартными размерами, а также высокой чистотой, т.к. количество остаточной ДНК клеток НЕК293 не превышало 1 нг на мл образца.

Исследование экспрессии гена S БВРС-КоВ в составе полученных рекомбинантных аденовирусов показало, что в лизатах клеток, трансдуцированных Ad5-S, Ad5-S-G и Ad5-RBD-G, обнаружены белки S, S-G и RBD-G, соответственно, т.е. данные формы являются несекретируемыми. При этом S белок и форма S-G были детектированы в виде двух полипептидов, состоящих из полноразмерной формы S и субъединицы S1, которая образуется в результате расщепления белка S протеазами клетки. Молекулярные массы полипептидов превышали рассчитанные по нуклеотидной последовательности, что свидетельствовало о предполагаемом гликозилировании белка [Chi H. et al., 2017; Deng Y. et al., 2018; Nyon M. P. et al., 2018]. Результаты анализа показали, что формы RBD и RBD-Fc являются секретируемыми, поскольку данные белки обнаружены в клеточных средах. Массы полипептидов на основе RBD соответствовали расчетным. В контрольных образцах экспрессии не наблюдалось.

Таким образом, получены и охарактеризованы очищенные рекомбинантные аденовирусы Ad5-S, Ad5-S-G, Ad5-RBD, Ad5-RBD-G, Ad5-RBD-Fc, экспрессирующие различные варианты гена S БВРС-КоВ.

**Исследование иммуногенности различных форм белка S БВРС-КоВ у грызунов.** Определение гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови животных. Гуморальный иммунный ответ на различные формы протективного антигена БВРС-КоВ, экспрессируемые в составе рекомбинантных аденовирусов, оценивали на мышах через три недели после иммунизации

полученными Ad5. Образование S-специфических IgG наблюдалось во всех опытных группах, однако величина гуморального ответа различалась среди них (Рисунок 1). Сыворотка крови мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-RBD-G, содержала S-специфические IgG в наибольшей концентрации: геометрическое среднее титра (ГСТ): 1:1875135 ( $p < 0.05$ , сравнение Ad5-RBD-G с другими группами, за исключением Ad5-S-G).

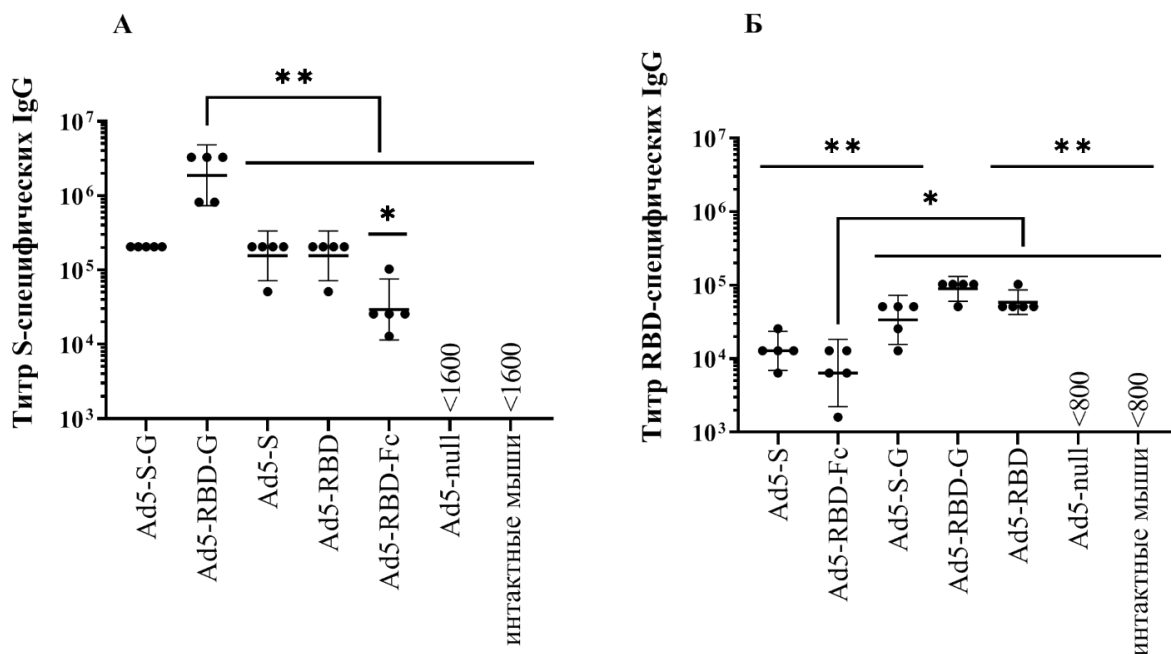


Рисунок 1 – Уровни антител в сыворотках крови иммунизированных животных. Отмечено ГСТ и 95% доверительный интервал (ДИ) для каждой группы (n=5). А) Титры S-специфических IgG. Звездочки указывают на статистически значимые различия в титрах IgG между группами. \*  $p < 0.05$ , сравнение Ad5-RBD-Fc с другими группами; \*\*  $p < 0.05$ , сравнение Ad5-RBD-G с другими группами (кроме Ad5-S-G). Б) Титры RBD-специфических IgG. \*  $p < 0.05$ , сравнение Ad5-RBD-Fc с другими группами (кроме Ad5-S); \*\*  $p < 0.05$ , сравнение Ad5-RBD-G с другими группами (кроме Ad5-RBD), тест Манна-Уитни

По результатам исследования IgG, специфичных к RBD, выявили, что наиболее иммуногенной является конструкция Ad5-RBD-G (ГСТ: 1:89144,  $p < 0.05$ , при сравнении Ad5-RBD-G с другими группами, кроме Ad5-RBD). Статистически значимых различий в титрах IgG, специфичных к RBD, между группами Ad5-RBD и Ad5-RBD-G не обнаружено (Рисунок 1, Б).

Таким образом, показано, что все полученные рекомбинантные аденовирусы (Ad5-S, Ad5-S-G, Ad5-RBD, Ad5-RBD-G, Ad5-RBD-Fc) индуцируют формирование гуморального иммунного ответа у грызунов.

Однако иммунизация мышей вектором Ad5-RBD-G индуцирует формирование наиболее высоких титров антител, специфических как к белку S, так и к RBD.

Исследование напряженности клеточного иммунного ответа у мышей при иммунизации аденовирусными векторами, экспрессирующими различные варианты гена S БВРС-КоВ. Анализ пролиферации CD4<sup>+</sup> клеток на 8-й день после вакцинации (Рисунок 2, А) выявил наибольшую лимфопролиферативную активность в группе Ad5-S (2,10%) и наименьшую – в группе Ad5-RBD-Fc (0,25%).

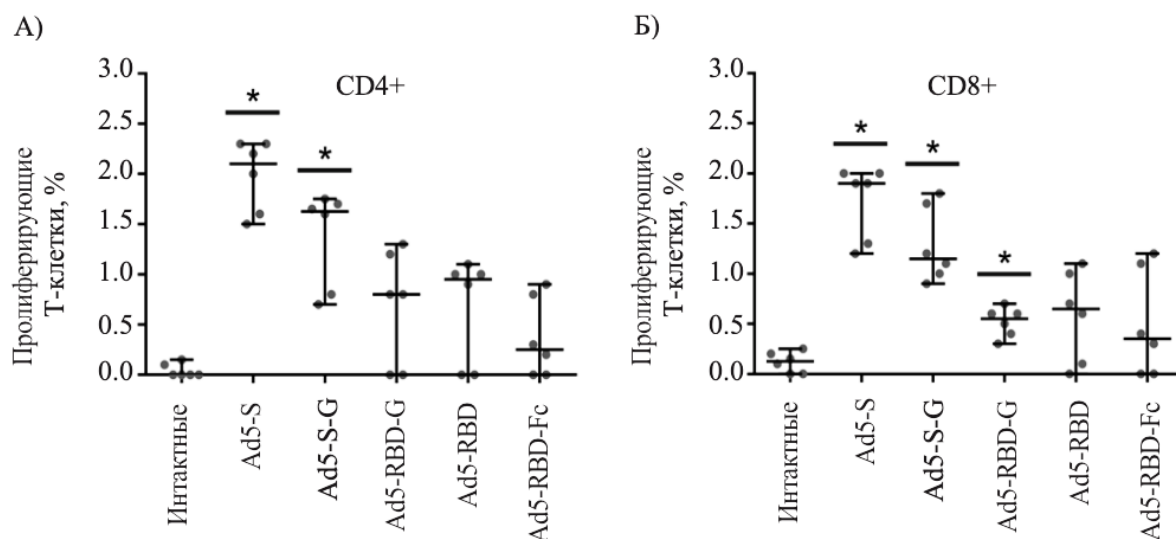


Рисунок 2 – Уровни лимфопролиферативной активности спленоцитов у иммунизированных мышей. По осям ординат отмечены уровни (%) пролиферирующих CD4<sup>+</sup> (А) и CD8<sup>+</sup> (Б) Т-клеток, рестимулированных белком S БВРС-КоВ. Отмечены медианы пролиферирующих клеток (%) и 95% ДИ медианы для каждой группы (n=6). Звездочки указывают на статистически значимые различия в % пролиферирующих клеток между вакцинированными и интактными животными. \* p < 0.05, тест Манна–Уитни

Анализ пролиферации CD8<sup>+</sup> клеток (Рисунок 2, Б) выявил наибольшую лимфопролиферативную активность в группе Ad5-S (1,90%), наименьшую – в группе Ad5-RBD-Fc (0,35%).

Исследование продукции ИФН-гамма спленоцитами после рестимуляции гликопротеином S БВРС-КоВ показало, что наиболее выраженный клеточный иммунный ответ развивался у животных, иммунизированных Ad5-S и Ad5-S-G: прирост концентрации ИФН-гамма составил  $15,12 \pm 0,43$  и  $10,14 \pm 0,97$  раза относительно интактных клеток соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее выраженная S-специфическая пролиферация CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток наблюдалась в ответ на введение рекомбинантного аденовируса Ad5-S, что

согласуется с результатами эксперимента по измерению продукции ИФН-гамма иммунокомпетентными клетками, стимулированными белком S БВРС-КоВ.

**Состав и форма вакцинного препарата для профилактики БВРС.** Поскольку рекомбинантный аденовирус Ad5-RBD-G вызывает сильный гуморальный иммунный ответ у мышей, а аденовирус Ad5-S индуцирует напряженный клеточный иммунный ответ, их выбрали в качестве компонентов вакцинного препарата для профилактики БВРС. Далее определяли оптимальную иммунизирующую дозу препарата. В исследованиях кандидатных вакцин для профилактики БВРС показано, что в ответ на вакцинацию у животных формируется напряженный гуморальный иммунный ответ, при этом у мышей, выживших после заражения БВРС-КоВ, средний титр S-специфических IgG составляет около 1:100000 [Alharbi N. K. et al., 2017]. Поэтому мы проанализировали уровни гуморального иммунитета у мышей после вакцинации различными дозами разработанного препарата (Рисунок 3).

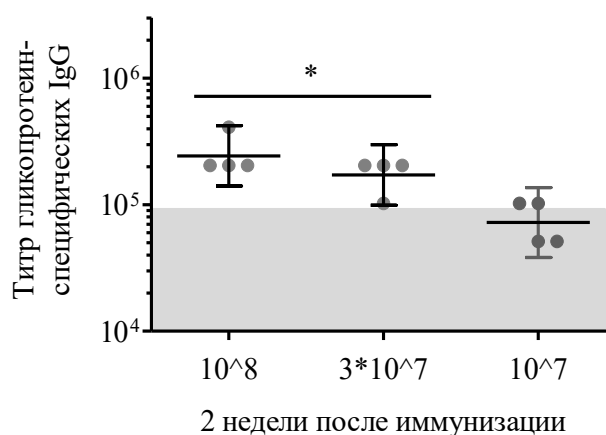


Рисунок 3 – Титры S-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных животных. По оси абсцисс представлены иммунизирующие дозы, по оси ординат – реципрокные титры IgG. Отмечены ГСТ и 95% ДИ. Серым прямоугольником обозначен предел отсечения (титр IgG менее 1:100000). \*  $p < 0,05$  при сравнении с титром IgG 1:100000.

Результаты показали, что иммунизация мышей разработанным вакцинным препаратом в дозе  $3 \times 10^7$  в.ч./мышь позволяет сформировать напряженный гуморальный иммунный ответ в протективном титре (более 1:100000) у всех животных уже через две недели после иммунизации. Пересчет на человеческую дозу осуществляли по массе, считая, что средний вес взрослого человека равен 60-70 кг. В результате, доза вакцинного препарата для профилактики БВРС была определена как  $(1 \pm 0,5) \times 10^{11}$  в.ч.

После выбора дозы определили форму вакцинного препарата. Выбрана лиофильная форма, так как лиофилизированные вирусные векторы хранятся при температуре 4 °С и способны выдерживать без особых последствий более



высокие температуры, что позволяет перевозить препараты на большие расстояния без потери активности и заявленных свойств. Вследствие этого упрощаются условия транспортировки и хранения вакцины, увеличивается срок годности. Поэтому нами были получены лиофильно высушенные препараты рекомбинантных вирусных векторов Ad5-S и Ad5-RBD-G, а затем проведено исследование их стабильности методом титрования по конечным точкам ТЦД<sub>50</sub>. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Титры препаратов рекомбинантных аденовирусных векторов

Препарат	Среднее значение ТЦД <sub>50</sub> /мл	
	до лиофилизации	после лиофилизации
1 серия	$(2,19 \pm 1,49) \times 10^9$	$(2,03 \pm 0,79) \times 10^9$
2 серия	$(2,62 \pm 1,36) \times 10^9$	$(2,89 \pm 1,83) \times 10^9$

Исследование титров препаратов до лиофилизации и после показало, что используемая композиция позволяет получить лиофилизированные рекомбинантные аденовирусы без статистической разницы в титрах.

Кроме того, мы оценили стабильность полученной кандидатной вакцины по прошествии года хранения при температуре 4 °С методом титрования по конечным точкам ТЦД<sub>50</sub>. В результате, титр серии 1 составил  $(2,52 \pm 2,19) \times 10^9$ , а серии 2 –  $(2,39 \pm 1,55) \times 10^9$ . Расхождения между исходными значениями титра и полученными через год хранения оказались весьма незначительными и колебались в пределах погрешности метода, что свидетельствует о возможности хранить разработанный вакцинный препарат при температуре 4 °С в течение года без снижения активности.

На следующем этапе работы экспериментальные серии кандидатной вакцины изучили на соответствие требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам (Таблица 4).

Таблица 4 – Исследования экспериментальных серий вакцинного препарата

Показатель	Требования проекта НД	Серия №1	Серия №2
Общие тесты			
Описание	белый порошок	соответствует	соответствует
Стерильность	должен быть стерильным	стерильный	стерильный
pH	от 6,0 до 8,0 (при растворении в 1 мл воды для инъекций)	7,04	7,4
Микоплазмы	не должен содержать	не содержит	не содержит
Бактериальные эндотоксины	не более 100 единиц эндотоксина	менее 100	менее 100

Продолжение таблицы 4.

Основные тесты			
Подлинность	наличие гена гексона аденовируса (ПЦР-РВ)	содержит	содержит
	наличие гена белка S (ПЦР-РВ)	содержит	содержит
	наличие последовательности RBD-G (ПЦР-РВ)	содержит	содержит
	иммуногенность (ИФА) ГСТ не менее 1:10000	1:445000	1:204800
	наличие белков S и RBD-G (иммуноблоттинг)	содержит	содержит
Общий белок	не более 0,5 мг/дозу	8,6 мкг/доза	20,4 мкг/доза
Остаточный белок	не более 0,1 % от общего белка	0,08 % от общего белка	0,06 % от общего белка
Остаточная ДНК	не более 10 нг/дозу	0,5 нг/дозу	0,3 нг/дозу
Специфические тесты			
Количество в.ч.	$(1 \pm 0,5) \times 10^{11}$ в.ч./доза	$(0,82 \pm 0,02) \times 10^{11}$	$(0,87 \pm 0,05) \times 10^{11}$
Специфическая активность	среднее значение ТЦД <sub>50</sub> /мл не менее $10^7$ ТЦД <sub>50</sub> /мл	$(3,68 \pm 1,79) \times 10^8$	$(4,75 \pm 3,39) \times 10^8$
Соотношение в.ч./БОЕ	не более чем 1:500	1:17,8	1:31,6
Безопасность	не должен содержать РКА	не содержит	не содержит

По результатам исследований двух экспериментальных серий вакцинного препарата для профилактики БВРС показано соответствие данного препарата требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам. Таким образом, проведенные эксперименты являются основанием для организации производства и выпуска экспериментально-производственных серий препарата и решения вопроса о возможности его клинических исследований.

**Изучение протективных свойств вакцинного препарата для профилактики БВРС *in vivo*.** У наиболее часто используемых лабораторных животных (мышей, хомячков и хорьков) есть отличия в рецепторе БВРС-КоВ – дипептидил пептидазе 4, из-за которых данный вирус не может проникнуть в клетки [Реск К. М. et al., 2015]. Поэтому для изучения протективных свойств сначала была разработана модель легочной инфекции, вызванной БВРС-КоВ, как описано ранее [Ожаровская Т. А. и др., 2019]. Чтобы в легких мышей экспрессировался рецептор БВРС-КоВ (hDPP4), мышам за три дня до заражения коронавирусом интраназально вводили рекомбинантный аденовирус Ad5-hDPP4 ( $1 \times 10^{11}$  в.ч. на мышь).

Исследование протективной активности было выполнено совместно с ФГБУ «48 ЦНИИ» Министерства обороны Российской Федерации. Для проведения эксперимента мышей разделили на три группы: опытную, контрольную и плацебо. Мышей из опытной группы однократно внутримышечно иммунизировали вакцинным препаратом для профилактики БВРС в дозе  $3 \times 10^7$  в.ч. на животное (Рисунок 4). Контрольной группе вводили ФСБ, группе плацебо – буфер, соответствующий восстановленному препарату. Через две недели после иммунизации вакцинным препаратом, мышей из опытной группы и группы плацебо инфицировали БВРС-КоВ, тогда как контрольную группу не заражали коронавирусом. Концентрацию коронавируса в легких оценивали на 3 и 5 сутки после заражения. Результаты представлены в таблице 5.

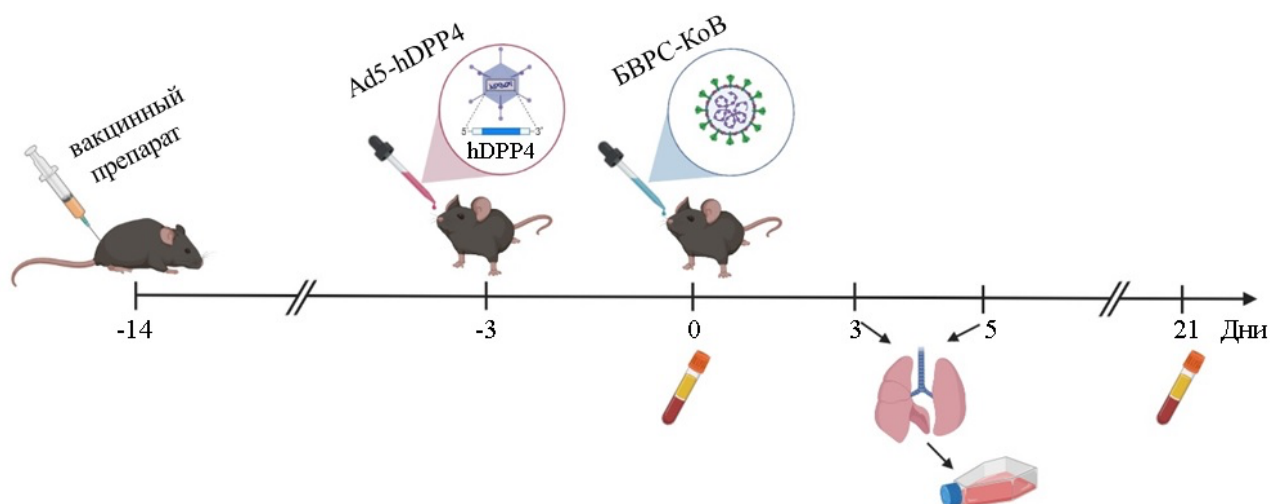


Рисунок 4 – Схема постановки эксперимента по изучению протективных свойств вакцинного препарата для профилактики БВРС. Схема создана с использованием BioRender.com

Таблица 5 – Результаты исследования протективных свойств вакцинного препарата для профилактики БВРС на мышах

Группа животных	Титр БВРС-КоВ, lg БОЕ/мл		Коэффициент ингибирования	Титр ВНА	
	3 день	5 день		0 день	21 день
Интактные мыши	0,0±0,0	0,0±0,0	-	0	0
Плацебо	3,0±0,2	0,3±0,3	0 %	0	160
Опыт (вакцинный препарат)	0,0±0,0	0,0±0,0	100 %	160	320

По результатам исследования показано, что через трое суток после заражения БВРС-КоВ инфекционный вирус был выделен только из легких интактных мышей и группы плацебо. При этом в легких иммунизированных

мышей вирус не выявлен, коэффициент ингибирования составил 100%. Исследование уровня ВНА к БВРС-КоВ до заражения (0 день) показало, что в контрольной группе и в группе плацебо в сыворотках крови не детектируются ВНА, в то время как у иммунизированных животных титр ВНА к БВРС-КоВ составил в среднем 1:160 через две недели после иммунизации.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженной протективной эффективности вакцинного препарата, характеризующейся выработкой ВНА и ингибированием репликации БВРС-КоВ в легких инфицированных животных.

**Изучение безопасности и иммуногенности вакцинного препарата для профилактики БВРС на приматах.** Исследование выполнено совместно с ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Для исследования безопасности и напряженности гуморального иммунного ответа обыкновенных игрунок разделили на две группы: опытной группе однократно вводили вакцинный препарат в дозе  $1 \times 10^{11}$  в.ч., контрольной группе вводили буфер, соответствующий восстановленному препарату. В ходе ежедневного осмотра животных не было выявлено никаких отклонений от нормы. При исследовании безопасности не было выявлено негативного влияния вакцины на общее состояние животных, температура тела не повышалась, отсутствовало изменение веса животных. Таким образом, вакцинный препарат хорошо переносится обыкновенными игрунками.

Сбор сывороток крови и анализ наличия RBD-специфических IgG методом ИФА проводили до введения препарата, а также на 21, 28, 45 дни, 3 и 6 месяцев после иммунизации. Результаты анализа представлены на рисунке 5.

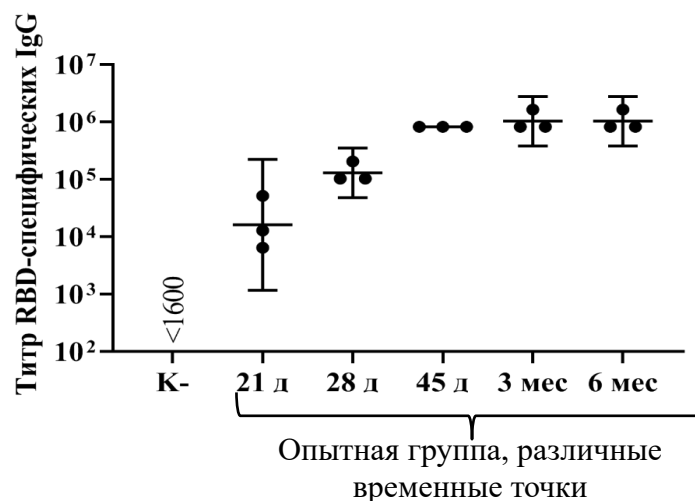


Рисунок 5 – Уровни RBD-специфических IgG в сыворотках крови обыкновенных игрунок ( $n=3$ ) после иммунизации. По оси абсцисс представлены группы и временные точки, по оси ординат – реципрокные титры IgG. Отмечены ГСТ и 95% ДИ. К- – контрольная группа

Результаты данного исследования показали, что иммунизация приматов вакцинным препаратом для профилактики БВРС приводит к формированию гуморального иммунного ответа. Так, через три недели после вакцинации в плазме крови у животных наблюдаются RBD-специфические антитела (ГСТ: 1:16127), при этом титр антител нарастает с течением времени и через три месяца после иммунизации ГСТ составляет 1:1032127; данное значение сохраняется по прошествии еще трех месяцев.

Для исследования напряженности клеточного иммунитета у обыкновенных игрунок проводили отбор крови из вены через 12 дней после иммунизации обезьян опытной группы. Затем выделяли мононуклеарные клетки периферической крови и определяли количество пролиферирующих CD4+ и CD8+ лимфоцитов *in vitro* после стимуляции клеток рекомбинантными белком S1 БВРС-КоВ.

На 12 сутки после введения вакцины в опытной группе у трех животных наблюдалась S1-специфическая пролиферация CD4+ клеток, также у двух обезьян из группы наблюдалась пролиферация CD8+ клеток (Рисунок 6). По данным анализа, количество пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток в ответ на стимуляцию *in vitro* белком S1 БВРС-КоВ составило в среднем 0,13% и 0,53%, соответственно.

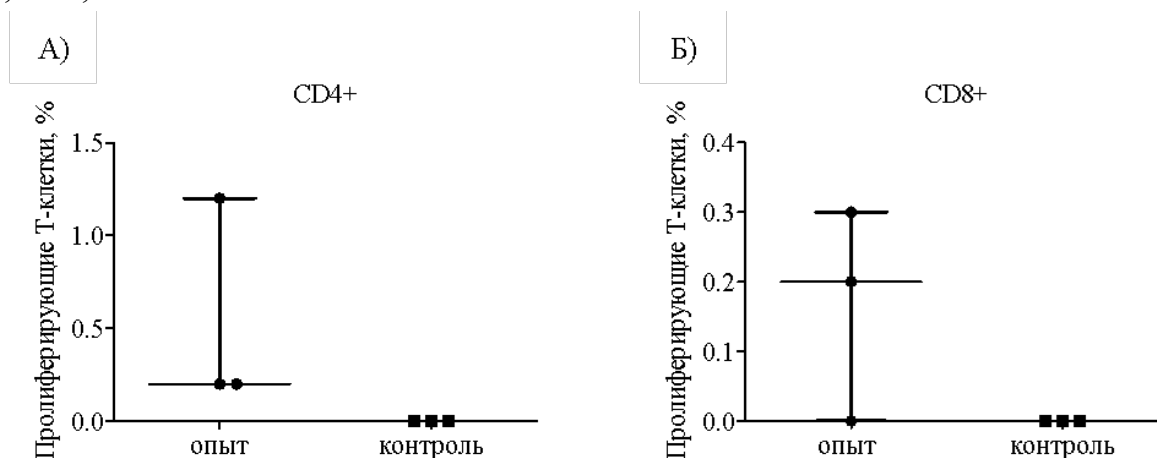


Рисунок 6 – Уровни пролиферирующих CD4+ (А) и CD8+ (Б) клеток обыкновенных игрунок после *in vitro* стимуляции рекомбинантным белком S1 БВРС-КоВ. Отмечены медианы пролиферирующих клеток (%) после рестимуляции и 95% ДИ медианы для каждой группы (n=3)

Полученные данные свидетельствуют о высокой иммуногенности, а также хорошей переносимости и безопасности вакцинного препарата для профилактики БВРС.

**Исследование влияния предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору на эффективность иммунизации.** Считается, что одним из факторов, влияющих на эффективность вакцин на основе рекомбинантных аденовирусов, является наличие предсуществующего иммунитета к данному вектору у определенного процента популяции людей. Так, в клинических исследованиях вакцины для профилактики ВИЧ-1 на основе Ad5, показано, что наличие ВНА к вектору у добровольцев снижает иммуногенность вакцины [Catanzaro A. T. et al., 2006]. Поэтому был проведен эксперимент по исследованию влияния предсуществующего иммунного ответа к аденовирусу человека 5-го серотипа на иммуногенность разработанной кандидатной вакцины для профилактики БВРС. Для этого, в рамках клинических исследований II фазы из ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» были получены сыворотки добровольцев, вакцинированных кандидатной вакциной для профилактики БВРС. У добровольцев проводили отбор крови из вены для определения наличия ВНА к Ad5 с помощью реакции вирус-нейтрализации перед вакцинацией и S-специфических IgG методом ИФА через три недели после иммунизации. Результаты исследования представлены на рисунке 7.

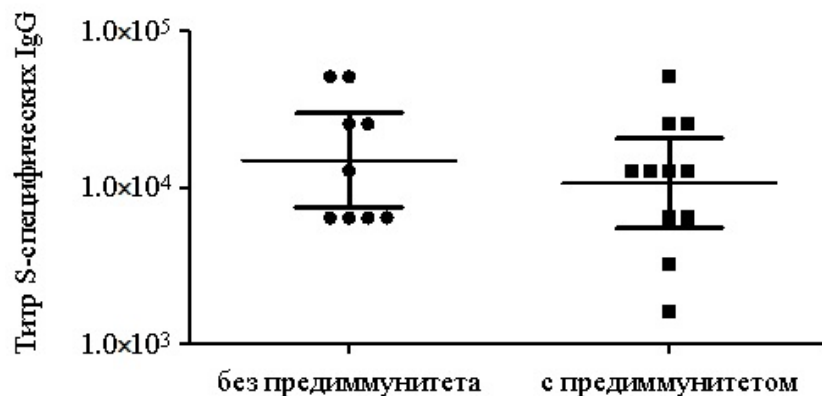


Рисунок 7 – Напряженность гуморального иммунитета у добровольцев через три недели после вакцинации. По оси абсцисс представлены группы, по оси ординат – реципрокные титры S-специфических IgG. Отмечены ГСТ и 95% ДИ

Результаты данного анализа показали, что через три недели после вакцинации у добровольцев в обеих группах, как с наличием предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору, так и с отсутствием предиммунитета к Ad5, наблюдаются S-специфические антитела. При этом ГСТ в группе без предиммунитета составляет 14932, а в группе с предиммунитетом ГСТ составляет 10595, однако статистически значимых различий между группами не обнаружено ( $p = 0,5849$ , тест Манна-Уитни).

Итак, установлено, что внутримышечная иммунизация добровольцев

вакцинным препаратом для профилактики БВРС в дозе  $1 \times 10^{11}$  в.ч. в присутствии предсуществующего иммунного ответа к Ad5 не влияет на выработку антител, специфичных к гликопротеину S БВРС-КоВ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вспышки ТОРС-КоВ, БВРС-КоВ, а также пандемия, вызванная SARS-CoV-2, продемонстрировали приобретенную опасность данных коронавирусов, после того как они пересекли межвидовой барьер и стали заражать людей. Поскольку на данный момент не существует зарегистрированных вакцин для профилактики БВРС, в настоящей работе нами была разработана кандидатная лиофилизированная векторная вакцина против данного заболевания. В качестве компонентов вакцины были выбраны два рекомбинантных аденовирусных вектора: Ad5-RBD-G, поскольку в исследовании иммуногенности на мышах было показано, что он вызывает мощный гуморальный иммунный ответ, и Ad5-S, т.к. он индуцирует высокий уровень клеточного иммунного ответа. Проведены исследования безопасности и иммуногенности кандидатной вакцины на обыкновенных игрунках. Показано, что иммунизация соматических трансгенных мышей лиофилизированным препаратом позволяет сформировать напряженный протективный иммунный ответ со средним значением титра ВНА к БВРС-КоВ 1:160 через две недели после иммунизации. Проведенные доклинические испытания позволили получить разрешение на проведение клинических исследований полученной кандидатной вакцины, получившей название «БВРС-ГамВак». В настоящее время завершены клинические исследования первой и второй фазы вакцины «БВРС-ГамВак», по результатам которых будут поданы документы для получения разрешения на регистрацию вакцины для медицинского применения.

## ВЫВОДЫ

1. Подобрана консенсусная последовательность гена гликопротеина S БВРС-КоВ, наиболее гомологичная для современных штаммов. Выбраны последовательности, кодирующие различные формы гликопротеина: два варианта рецептор-связывающего домена (RBD), содержащие лидерный пептид щелочной фосфатазы: RBD и RBD-Fc, слитый с Fc IgG1 человека; и два варианта с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита: S-G и RBD-G.
2. Получено пять рекомбинантных векторов на основе аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующих различные варианты гена гликопротеина БВРС-КоВ: Ad5-S, Ad5-S-G, Ad5-RBD, Ad5-RBD-G, Ad5-RBD-Fc.

3. Иммунизация мышей аденовирусами Ad5-S, Ad5-S-G, Ad5-RBD, Ad5-RBD-G, Ad5-RBD-Fc индуцирует формирование выраженного гуморального и клеточного иммунного ответа. Наиболее высокие титры S-специфических IgG-антител наблюдались в группе животных, иммунизированных Ad5-RBD-G (ГСТ составило 1:1875135). Наибольшая S-специфическая пролиферация CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток детектирована у животных, вакцинированных Ad5-S (2,1% и 1,9% пролиферирующих клеток соответственно).
4. Подобран оптимальный состав и форма вакцинного препарата для профилактики БВРС, представляющего собой два лиофильно высушенных аденовирусных вектора Ad5-RBD-G и Ad5-S. Показано, что экспериментальные серии препарата соответствуют требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам.
5. Вакцинный препарат способен индуцировать формирование вируснейтрализующих антител (среднее значение титра ВНА к БВРС-КоВ у лабораторных животных составило 1:160 через две недели после иммунизации). Кандидатная вакцина обладает 100% протективной активностью по подавлению репродукции БВРС-КоВ в легких мышей.
6. В доклинических исследованиях на приматах показано, что однократное внутримышечное введение вакцинного препарата для профилактики БВРС в дозе  $1 \times 10^{11}$  в.ч. не влияет на общее состояние здоровья животных, что свидетельствует о хорошей переносимости и безопасности препарата. Вакцинный препарат индуцирует формирование стойкого иммунного ответа, специфические антитела сохраняются на протяжении не менее 6 месяцев (ГСТ составляет 1:1032127).
7. Наличие у добровольцев предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору не влияет на иммуногенность вакцинного препарата. Напряженный поствакцинальный гуморальный иммунный ответ формируется несмотря на высокие уровни ВНА (выше 1:1000) к аденовирусу.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. *Ожаровская Т.А.* Иммуногенность различных форм гликопротеина S коронавируса ближневосточного респираторного синдрома / Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Должикова И.В., Громова А.С., Гроусова Д.М., Тухватулин А.И., Попова О., Щедряков Д.В., Щербинин Д.Н., Джаруллаева А.Ш., Ерохова А.С., Шмаров М.М., Логинова С.Я., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Acta Naturae. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 38-47.
2. Ковыршина А.В. Комбинированная векторная вакцина для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ / Ковыршина А.В.,



Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Зубкова О.В., **Ожаровская Т.А.**, Попова О., Тухватулин А.И., Токарская Е.А., Симакова Я.В., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Евграфова И.М., Дерябин П.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Иммунология. – 2020. – Т. 41. – №2. – С. 135-143.

3. Должикова И.В. Доклинические исследования иммуногенности, протективности и безопасности комбинированной векторной вакцины для профилактики ближневосточного респираторного синдрома. / Должикова И.В., Гроусова Д.М., Зубкова О.В., Тухватулин А.И., Ковыршина А.В., Лубенец Н.Л., **Ожаровская Т.А.**, Попова О., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Евграфова И.М., Недорубов А.А., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Мишин Д.В., Логинова С.Я., Борисевич С.В., Дерябин П.Г., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Acta Naturae. – 2020. – Т. 12. – № 3. – С. 114-123.

4. Logunov D.Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tikhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., **Ozharovskaya T.A.**, Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // Lancet. – 2020. – Vol. 396. – № 10255. – P. 887-897.

5. Logunov D.Y. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. / Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tikhvatullin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., **Ozharovskaya T.A.**, Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // Lancet. – 2021. – Vol. 397. – № 10275. – P. 671-681.

6. **Ожаровская Т.А.** Получение соматических трансгенных мышей для разработки модели инфекции, вызванной коронавирусом Ближневосточного респираторного синдрома / Ожаровская Т.А., Попова О., Гроусова Д.М., Громова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Зубкова О.В. // XIX всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», сборник тезисов и докладов. – 2019. – С. 112-114.

7. **Ожаровская Т.А.** Разработка и характеристика рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген DPP4 человека, для получения соматических трансгенных животных / Ожаровская Т.А., Попова О., Гроусова Д.М.,

Громова А.С., Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Зубкова О.В. // XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Сборник тезисов. – 2019. – С. 129.

8. **Ожаровская Т.А.** Биораспределение рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа при интерназальном и внутримышечном введении мышам / Ожаровская Т.А., Овчаренко Д.С., Артемова Э.А., Попова О., Картуесов А.Г., Зубкова О.В. // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2018. – №16. – С. 131-133.

9. **Ozharovskaia T.A.** Comparative analysis of biodistribution of adenoviral vectors subgroups C, D and E in Syrian hamsters / Ozharovskaia T.A., Dovgiy M.A., Popova O., Lysenko A.A., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V. // Future biomedicine, proceedings of conference series. – 2018. – №2. – P. 40.

10. **Ozharovskaia T.A.** Immunogenicity and protective activity of recombinant adenoviruses type 5, expressing different forms of MERS coronavirus S protein / Ozharovskaia T.A., Dolzhikova I.V., Popova O., Grousova D.M., Dzharullaeva A.S., Erokhova A.S., Tukhvatulin A.I., Loginova S.Y., Borisevich S.V., Gordeychuk I.V., Zubkova O.V. // Future biomedicine, proceedings of conference series. – 2020. – №4. – P. 46.

11. Патент РФ RU 2709659 С1 на изобретение «Иммунобиологическое средство и способ его использования для индукции специфического иммунитета к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (варианты)» / Зубкова О.В., **Ожаровская Т.А.**, Должикова И.В., Попова О., Щедряков Д.В., Громова А.С., Гроусова Д.М., Джаруллаева А.Ш., Тухватулин А.И., Щербинин Д.Н., Кутаев Д.А., Логинова С.Я., Борисевич С.В., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Бюл. № 35. Дата начала отсчета срока действия патента: 06.09.2018.

### Список сокращений

БВРС – Ближневосточный респираторный синдром	НЕК293 – клетки почки эмбриона человека, несущие в своем геноме E1 область Ad5
БВРС-КоВ – коронавирус Ближневосточного респираторного синдрома	LP – лидерный пептид
БОЕ – бляшкообразующая единица	RBD – рецептор-связывающий домен
ВНА – вируснейтрализующие антитела	RBD-Fc – RBD с Fc-фрагментом иммуноглобулина G человека
в.ч. – вирусная частица	RBD-G – RBD с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита
ИФН-гамма – интерферон гамма	S – ген гликопротеина Spike БВРС-КоВ
ТОРС-КоВ – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома	S-G – ген S с последовательностью трансмембранного домена гликопротеина G VSV
ТЦД <sub>50</sub> – 50% тканевая цитопатическая доза	VSV – вирус везикулярного стоматита
ФСБ – фосфатно-солевой буфер	
Ad5 – аденовирус человека 5-го серотипа	