



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 35517

(51) C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0565.1

(22) 20.09.2021

(45) 18.02.2022, бюл. №7

(72) Табынов Кайсар Казыбаевич; Табынов Кайрат Казыбаевич; Туребеков Нуркельди Айтмуханбетулы; Ерубасев Токтасын Кенжеканович; Есполов Тлектес Исабаевич

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»; Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева» Министерства здравоохранения Республики Казахстан

(56) Daniel Watterson, Danushka K.Wijesundara, Naphak Modhiran. Preclinical development of a molecular clamp-stabilised subunit vaccine for severe acute respiratory syndrome coronavirus//Clin Transl Immunology. 2021 Apr 5;10(4):e1269. doi: 10.1002/cti2.1269.;

CN 112225814 (A), 15.01.2021;

CN 111217917 A, 02.06.2020;

KZ 34761 B, 08.12.2020.

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУБЪЕДИНИЧНОЙ АДЬЮВАНТИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19**

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и медицины, и представляет собой способ получения новой субъединичной

адьювантированной вакцины для специфической профилактики COVID-19. Сущность изобретения состоит в том, что для получения вакцины против COVID-19 используют эктодоменный полноразмерный стабилизированный спайк белка вируса SARS-CoV-2, полученный на основе бакуловирусной технологии (на клетках Sf9 - ткань яичек мотылька *Spodoptera frugiperda*) с использованием химически нейтральной среды (не содержащей дрожжей, сыворотки, протеинов и других продуктов животного происхождения), рекомбинантный белок очищают аффинной хроматографией на колонке с NiNTA, концентрируют гель-фильтрацией на хроматографических колонках и формулируют наноэмульсионным масляным адьювантом Sepivac SWETTM (Seppic, Франция). Полученная таким образом вакцина способна обеспечивать формирование у мышей не только сбалансированного Th1/Th2 гуморального и Т-клеточного иммунного ответов при двукратном режиме внутримышечной иммунизации с интервалом в 21 день, но и полную защиту от дикого типа вируса SARS-CoV-2 (D614G) и блокировку трансмиссии вируса при испытании на сирийских хомяках. Кроме того, Spike-основанная адьювантированная вакцина обеспечивает формирование у хомяков существенных титров нейтрализующих антител как в отношении дикого типа с D614G мутацией в Спайк белке, так и дельта (B.1.617.2) варианта вируса SARS-CoV-2.

(19) KZ (13) B (11) 35517

Изобретение относится к области биотехнологии и медицины, и представляет собой способ получения новой субъединичной адьювантированной вакцины для специфической профилактики COVID-19.

Известен способ получения инактивированной вакцины против COVID-19 [(19) KZ (13) B (11) 34761], в приготовлении которой используется штамм вируса SARS-CoV-2, выделенный на территории Республики Казахстан. Штамм вируса SARS-CoV-2 согласно оптимальным условиям культивирования накапливается в культуре клеток Vero, инактивируется формальдегидом, очищается низкоскоростным центрифугированием, диафильтрацией и стерилизующей фильтрацией. В полученный вирусный антигенный концентрат добавляется адьювант гидроокись алюминия «Алгидрогель-85» до конечной концентрации 0,5 мг/0,5 мл и разливается в стеклянные флаконы. Полученная таким способом вакцина безопасна при внутрибрюшинном введении белым мышам и внутривенном введении кроликам. Вакцина обеспечивает 80% защиту от COVID-19 инфекции на протяжении не менее 6 месяцев после двукратной вакцинации. Срок годности 12 месяцев при температуре 4-6°C. Недостатком полученной таким способом вакцины является то, что в ее приготовлении используется дикий вирулентный штамм вируса SARS-CoV-2, который требует в производственном предприятии создания дорогостоящего условия с третьим уровнем биологической безопасности (BSL-3). Более того в формулировании этой

вакцины используется гидроокись алюминия, который преимущественно формирует II тип Т-хелперного (Th-2) иммунного ответа и на минимальном уровне столь важный для очистки организма от вируса Th-1 иммунный ответ. Данный факт обуславливает то, что среди всех на сегодня доступных вакцин против COVID-19, именно инактивированные вирусные вакцины обладают самой низкой эффективностью.

Известен также способ получения субъединичной вакцины против COVID-19 на основе эктодоменного полноразмерного спайк белка в сочетании с азотным бисфосфонат-модифицированным цинк-алюминиевым гибридным адьювантом [Sci Transl Med. 2021 Aug 11;13(606):eabg1143]. Экспрессия спайк белка осуществлялась в культуре клеток млекопитающих. Данная вакцина вызвала значительно более высокие титры нейтрализующих антител у мышей, хомяков и циномогусовых обезьян, чем те, которые наблюдались в плазме из выздоровевших от COVID-19 людей. Вакцина также индуцировала как Th1-, так и Th2-поляризованные Т-хелперные клеточные реакции у мышей. У хомяков иммунизация вакциной защищала животных от заражения SARS-CoV-2, о чем свидетельствует отсутствие потери веса, уменьшение симптомов заболевания и снижение патологии легких у зараженных животных. Вакцинация хомяков вакциной также снизила передачу вируса внутри клетки невакцинированным хомякам, содержащимся в одной клетке. Недостатком данной вакцины является то, что она не обеспечила полной защиты привитых хомяков от SARS-CoV-2 инфекции (вирус выделялся из назальных турбин и легких некоторых животных), а также трансмиссии вируса. Более того, в составе вакцины использован адьювант, который сам или его аналоги ранее нигде не были зарегистрированы, следовательно, внедрение этого препарата в практику потребует более обширных и длительных клинических исследований.

Наиболее близким к заявляемому изобретению по совокупности существенных признаков (прототипом) является способ получения

субъединичной вакцины [Clin Transl Immunology. 2021 Apr 5;10(4):e1269] на основе префузионно стабилизированного молекулярных зажимов полного спайк белка в сочетании с лицензированным адьювантом MF59 (Seqirus, Парквилл, Австралия). Рекомбинантный белок был получен с помощью бакуловирусной технологии, где в качестве культуры для выращивания использовались клетки яичника китайского хомячка (СНО). На модели мышей данная вакцина вызвала высокий уровень нейтрализующих антител, а также широкореактивные и полифункциональные спайк-специфические CD4+ и цитотоксические CD8+ Т-клетки в *in vivo* исследованиях. На сирийских хомяках вакцинация привела к снижению вирусной нагрузки в легких, защите от легочного заболевания и снижению выделения вируса в ежедневных мазках из горла, что сильно коррелировало с уровнем нейтрализующих антител. Также показано, что вакцинный кандидат совместим с крупномасштабным коммерческим производством, длительное время стабилен при температуре 2-8°C. Недостатком этой вакцины является то, что она в режиме двукратной иммунизации так и не обеспечила полную защиту хомяков от SARS-CoV-2 инфекции. Но самым значительным недостатком этого способа получения является то, что технология с использованием молекулярных зажимов при конструировании спайк белка индцировало образование перекрёстно реагирующих с вирусом ВИЧ у почти половины волонтеров на стадии I-фазы клинического испытания. Данный факт способствовал прекращению дальнейшего клинического исследования этой вакцины.

Сущность изобретения состоит в том, что для получения вакцины против COVID-19 используется эктодоменный полноразмерный стабилизированный спайк белок вируса SARS-CoV-2, полученный на основе бакуловирусной технологии (на клетках Sf9 - ткань яичек мотылька *Spodoptera frugiperda*) с использованием химически нейтральной среды (не содержащей дрожжей, сыворотки, протеинов и других продуктов животного происхождения), очищенный аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA, концентрированный гелем-фильтрацией на хроматографических колонках, и

формулированный наноэмульсионным масляным адьювантом Sepivac SWE™ (SWE, Seppic, Франция).

Мир по-прежнему находится в эпицентре пандемии коронавирусной инфекции (COVID-19), вызванной коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2). Эта вирусная инфекция затронула почти все страны мира, и по состоянию на 03 августа 2021 количество подтвержденных случаев заражения им составило 198,7 млн человек, из них 4,2 млн человек умерли [<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>]. Пандемия прогрессирует, хотя стратегии сдерживания вместе с кампанией иммунизации на первых порах замедлили ее развитие, но в связи с появлением новых мутаций вируса [Nature. 2021, 596: 276–280], способных ускользать от иммунного ответа, во многих странах вновь регистрируются всплески заболеваемости или новые "волны" эпидемии. Примечательным является то, что в странах с высоким охватом вакцинации населения несмотря на широкое распространение инфекции случаи госпитализации и летальных исходов людей многократно ниже, чем в начале пандемии [<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>]. Это делает вакцинацию весьма оправданным инструментом в контроле и в целом снижении последствий пандемии COVID-19 на социально-экономическую деятельность человека.

На сегодня для массового экстренного применения доступны несколько вакцин (инактивированные, мРНК и векторные) [<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>], однако, как видится их недостаточно для удовлетворения глобального спроса (применено чуть более 4 млрд. доз различных вакцин, 14,9% населения земли полностью вакцинированы, только 1,1% людей в странах с низким уровнем дохода получили хотя бы одну дозу [*Published online at OurWorldInData.org*. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/coronavirus>']). В целом разработка более широкого спектра вакцин с различными механизмами действия могла бы помочь контролировать распространение

SARS-CoV-2 в глобальном масштабе. И в этом отношении сейчас активно задействуются традиционные платформы на основе белковых субъединиц вируса. Подходы на основе рекомбинантного белка COVID-19 имеют преимущества перед другими технологиями, включая 40-летний опыт безопасности и эффективности, в том числе у очень маленьких младенцев, а также надежное крупномасштабное производство и высокую стабильность в обычных холодильных условиях [Int J Mol Med. 2020; 46(1):3-16]. Среди 110 вакцинных кандидатов против COVID-19, находящихся на стадии клинических исследований, наибольшее количество или 37 (34%) представляют собой препараты на основе белковых субъединиц. Из них 11 находятся на стадии III-фазы клинического исследования, 16 на II-фазе, а остальные на I-фазе. Примечательным является то, что почти в половине (16/37) вакцинных кандидатов в качестве антигена выступают полноразмерный Spike белок или его субъединицы, в таком же количестве вакцин используется только RBD (рецептор связывающий домен Спайк белка, мономерный, димерный, тримерный и конъюгированный), а в оставшихся препаратах различные пептиды Spike белка [<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>].

На основании вышеизложенного, в основу настоящего изобретения *положена задача* получения новой субъединичной адьювантированной вакцины для специфической профилактики COVID-19, которая должна обладать следующими свойствами:

- быть безопасной;
- обеспечивать при минимальной кратности иммунизации сбалансированный Th1/Th2 иммунный ответ;
- формировать высокие титры нейтрализующих антител, в том числе против мутированных вариантов вируса SARS-CoV-2;
- обеспечивать индуцирование сильного Т-клеточного иммунного ответа;

- обеспечивать протективную эффективность, а также защиту от трансмиссии вируса;
- при производстве не требовать создание высокого уровня биологической защиты и безопасности;
- не требовать особых условий при транспортировке и хранении, иметь длительный срок годности.

Данная задача может быть решена с помощью разработки безопасных и эффективных вакцин на основе адъювантированных рекомбинантных белковых субъединиц вируса.

Субъединичные вакцины являются хорошо зарекомендовавшими себя безопасной и широко используемой платформой, показавшую высокую эффективность против целого ряда инфекционных заболеваний, таких как гепатит В, дифтерия, коклюш, столбняк, опоясывающий лишай и вируса папилломы человека [Nat. Rev. Immunol. 2021, 21: 83–100]. И по этой причине разработка субъединичной вакцины против SARS-CoV-2 является важным шагом в борьбе с пандемией COVID-19.

Наша исследовательская группа, включающая консорциум из академических учреждений как Международный центр вакцинологии при Казахском национальном аграрном исследовательском университете (КазНАИУ) и Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева Министерство здравоохранения Республики Казахстан, разрабатывает белковую субъединичную COVID-19 вакцину под названием NARUVAX-C19. Вакцина приготовлена из экстрацеллюлярного домена Spike белка, полученного на основе бакуловирусной экспрессии, и с аминокислотной последовательностью соответствующего гена дикого варианта вируса SARS-CoV-2 (Уханьский штамм). Для сравнительных исследований одновременно составлена вакцина на основе рекомбинантного коммерческого мономерного RBD Spike белка, который также является популярной мишенью для разработки COVID-19 вакцин. Этот белок отвечает

за связывание вируса SARS-CoV-2 с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE-2) клеток и проникновение в них [Cell. 2020;181(4):894-904.e9]. Использование этого белка разработчиками обусловлено тем, что ввиду своего малого размера его легче конструировать и в высоких концентрациях накапливать в различных экспрессионных системах [Engineered SARS-CoV-2 receptor binding domain improves immunogenicity in mice and elicits protective immunity in hamsters. bioRxiv [Preprint]. 2021 Mar 4:2021.03.03.433558], что очень важно с производственной точки зрения для обеспечения глобального спроса на вакцину. Немаловажной причиной в пользу выбора RBD для разработки вакцины было и то, что ввиду меньшего количества эпитопов, чем в полномасштабном Spike белке, он преимущественно формирует вируснейтрализующие антитела с меньшим риском возникновения антитело-зависимого усиления инфекции (ADE [The SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits a potent neutralizing response without antibody-dependent enhancement. bioRxiv 2020.04.10.036418]. Хотя показано, что субъединичные вакцины, способные вызывать S-специфические нейтрализующие антитела [Science. 2020; 367(6483):1260-1263, Nat Commun. 2021; 12(1):372], представляют наименьший риск ADE.

Для уменьшения количества необходимого антигена, сокращения числа требуемых иммунизаций и повышения эффективности пандемической вакцины у разных возрастных категорий людей, в том числе иммунокомпрометированных, в состав субъединичных вакцин необходимо включать адъюванты [Immunol Cell Biol. 2004; 82(5):488-96]. Нашу вакцину формулировали сквален содержащим наноэмульсионным масляным адъювантом SWE с типом эмульсии «Масло-вода», предоставленным Seppic (Франция), который является аналогом другого известного адъюванта MF59 (Novartis, USA). Адъювант MF59 в составе гриппозных вакцин (в том числе против вируса пандемического гриппа A/H1N1pdm09) зарегистрирован в Европе и США, и исследовался у широкой категории людей, таких как взрослые, пожилые, дети, младенцы и беременные женщины [Influenza Other

Respir Viruses. 2008 Nov;2(6):243-9, Front Immunol. 2017;8:1760]. Более того показано, что гриппозные вакцины, формулированные адьювантом MF59, способны обеспечивать перекрестно реагирующий иммунитет с различными штаммами вируса гриппа [Expert Rev Vaccines. 2011;10(4):447-62]. Все это указывает на то, что ксвален содержащие адьюванты, в том числе SWE, могут обеспечить создание безопасных и эффективных вакцин против COVID-19.

Техническим результатом является то, что субъединичная вакцина на основе рекомбинантного из экстрацеллюлярного домена Spike белка, полученного по предлагаемому способу, способна обеспечивать формирование у мышей не только сбалансированного Th1/Th2 гуморального и Т-клеточного иммунного ответов при двукратном режиме внутримышечной иммунизации с интервалом в 21 день, но полную защиту от дикого типа вируса SARS-CoV-2 (D614G) и блокировку трансмиссии вируса при испытании на сирийских хомяках. Кроме того, Spike-основанная адьювантированная вакцина обеспечило формирование у хомяков существенных титров нейтрализующих антител как в отношении дикого типа с D614G мутацией в Спайк белке, так и дельта (B.1.617.2) варианта вируса SARS-CoV-2. Полученные результаты являются весьма обнадеживающими и поддерживают дальнейшую разработку этой вакцины с выходом на стадию клинических исследований.

Признаками, характеризующими изобретение, совокупность которых обеспечивает получение технического результата, являются:

- 1) Используется эктодоменный полноразмерный стабилизированный спайк белок вируса SARS-CoV-2 (аминокислотная последовательность белка может быть актуализирована в соответствии с доминирующим вирусом), полученный на основе бакуловиральной технологии (на клетках Sf9 - ткань яичек мотылька *Spodoptera frugiperda*) с использованием химически нейтральной

среды, не содержащей дрожжей, сыворотки, протеинов и других продуктов животного происхождения

2) Рекомбинантный белок очищается аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA, концентрируется гель-фильтрацией на хроматографических колонках и формулируется в соотношении 50:50 наноэмульсионным масляным адьювантом Sepivac SWE™ (SWE, Serpic, Франция);

3) Вакцина расфасовывается по 1-10 мл во флаконы с последующей закупоркой;

2) Вакцина вводится в оптимальной дозе внутримышечным способом двукратно с интервалом в 21-28 дней.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Далее описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Представленные ниже варианты осуществления описаны в интересах лучшего понимания изобретения, и понятно, что объем настоящего изобретения не ограничивается следующим описанием. Поэтому очевидно, что специалисты в данной области могут модифицировать любой способ осуществления, который целесообразен в пределах объема настоящего изобретения, при рассмотрении представленного здесь описания.

Для лучшего понимания сущности изобретения ниже приводятся примеры его конкретного выполнения.

Пример 1

Дизайн вакцины на основе рекомбинантного Спайк белка

Выбор бакуловиральной системы экспрессии рекомбинантных белков был обусловлен тем, что она больше подходит для крупносерийного производства, может расти с высокой плотностью при комнатной температуре без подачи

CO₂, и экспрессировать белки быстрым, простым и надежным способом по низкой себестоимости и более высокой продуктивности.

На начальном этапе получены плазмиды с генами, кодирующими полный спайк белок вируса SARS-CoV-2 (генбанк, номер доступа: NC 045512) с 6× гистиридиновой меткой (His tag), и затем экспрессионные кассеты переклонированы в вектор pFASTBac 1. Бакуловирус был сгенерирован в соответствии со стандартными процедурами Bac-to-Bac. Рекombинантный бакуловирус был размножен в клетках Sf9 (ткань яичек мотылька *Spodoptera frugiperda*) до третьего пассажа в химически нейтральной среде, не содержащей дрожжей, сыворотки, протеинов и других продуктов животного происхождения, и затем использован для экспрессии белка. Через 72 часа после заражения культуральный супернатант был очищен центрифугированием, а затем рекомбинантный спайковый белок был очищен аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA, концентрирован и заменен буфером на фосфатный забуференный физраствор (PBS) гель-фильтрацией на хроматографических колонках. Последовательность рекомбинантного белка спайка была подтверждена с помощью SDS-PAGE геля и Вестерн блоттинга. Эндотоксин определяли с помощью системы обнаружения эндотоксина PyroGene™ (кат. № 50-658U, LONZA, Walkersville, MD, USA), а остаточное содержание ДНК в конечном вакцинном продукте определяли с помощью набора Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (ThermoFisher, P7589) в соответствии с инструкциями производителей.

В результате этой работы был получен растворимый тримерный спайк белок с гекса-гистиридиновой меткой на С-конце для облегчения очистки белка. Конечный белковый продукт имел чистоту ~ 90% по SDS-PAGE, был стерильным и с низким содержанием эндотоксина и остаточной ДНК.

Пример 2

Приготовление вакцинных формуляций

На основе нашего Спайк белка, а также коммерческого белка RBD (рецептор-связывающий домен; ABP Biosciences; Protein Construction - Spike Protein RBD [Gln321-Ser591]; Expressed Host - HEK293 Cells, Purity - > 95% as determined by SDS-PAGE; Endotoxin - < 1.0 EU per μg protein as determined by the LAL method) вируса SARS-CoV-2, формулированных масляным наноземulsionным адьювантом SWE (Seppic, Франция; тип эмульсии «масло/вода») в соотношении 50:50 (по объему) и без него, были приготовлены восемь следующих образцов вакцины: 1) SWE Adj RBD 5.0 μg ; 2) SWE Adj RBD 2.5 μg ; 3) SWE Adj RBD 1.25 μg ; 4) Antigen-RBD 5.0 μg ; 5) SWE Adj Spike 5.0 μg ; 6) SWE Adj Spike 2.5 μg ; 7) SWE Adj Spike -1.25 μg ; 8) Antigen-Spike- 5 μg . В качестве негативного контрольного образца использовали просто адьювант SWE с PBS (плацебо). Все образцы были стерильны и содержали бактериальных эндотоксинов менее 2 EU на дозу.

Пример 3

Вакцинация мышей и анализ иммунного ответа

Использовались 4-6-недельные самки SPF (свободные от патогенной флоры) BALB/c мышей, полученные из питомника лабораторных животных Национального центра особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева (ННЦООИ; г. Алматы, Казахстан). Животные до начала эксперимента были размещены в вентилируемые клетки с HEPA-фильтрами (Allentown, USA) на 7 суток для акклиматизации. Иммунизацию мышей проводили всеми вакцинными формуляциями и контрольным образцом внутримышечно (в область бедра) в объеме 100 мкл двукратно с интервалом в 21 день. На 21 день после прайм (n=11/группа) и бустерной (n=7/группа) вакцинации у мышей брали из орбитального венозного синуса образцы крови для определения антиген специфичных IgG антител и его изотипов (IgG1 и IgG2a), а также антител, блокирующих связывание RBD с ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) клеточным рецептором, в иммуноферментном анализе (ИФА).

Кроме того, определялись нейтрализующие антитела с запатентованным диким типом (D614G) вируса SARS-CoV-2 [KZ (13) В (11) 34974]. Сыворотка крови отделялась центрифугированием и хранилась при -20°C до использования.

На 21 день после прайм ($n=4/\text{группа}$) и бустерной ($n=4/\text{группа}$) вакцинации мыши подвергались эвтаназии (цервикальная дислокация под кетамин/ксилазиновой анестезией) и в асептических условиях у них отбирались селезенки для оценки Т-клеточного иммунного ответа (по продукции цитокинов, а также пролиферации CD4^+ и CD8^+ клеток в ответ на рестимуляцию суспензии спленоцитов вакцинными белками).

Адьювантированные Spike и RBD основанные вакцины со всеми дозами уже на 21-день после прайм вакцинации мышей формировали у них существенные антиген специфичные IgG антитела ($P=0.0145- <0.0001$ vs. *appropriate control*). При этом титры IgG антител у мышей в зависимости от вида вакцинного белка или его дозы не имели между собой существенных различий ($P>0.05$). RBD-основанная вакцина со всеми дозами после однократной иммунизации индуцировали титры антител, существенно превосходящие ($P=0.0084- <0.0001$) таковые с только антигеном, чего не наблюдалось в отношении Spike-основанной вакцины (за исключением дозы 2.5 мкг). Проведенная бустерная иммунизация обеими адьювантированными вакцинными формуляциями со всеми дозами, включая самих антигенов индуцировало существенное ($P=0.0001 - <0.0001$) повышение титров IgG антител в сравнении с таковыми после прайм вакцинации. RBD и Spike-основанные вакцины с адьювантом почти со всеми дозами в режиме двукратной иммунизации обеспечивали формирование высоких титров IgG антител, которые существенно ($P=0.0287- <0.0001$) превосходили таковые антигенов без адьюванта. Примечательным является то, что титры IgG антител индуцированные с образцами вакцин на основе только антигенов только после бустерной иммунизации были существенны ($P <0.0001$) в сравнении с соответствующими контрольными группами.

Дальнейший анализ по изотипам IgG антител показал, что после однократного введения RBD и Spike основанные вакцины вне зависимости от их дозировки, а также сами антигены преимущественно формировали Th-2 поляризованный иммунный ответ, ввиду существенного превышения титров IgG1 изотипа антител над IgG2a ($P=0.0367 - 0.0003$). Однако на 21 день после бустерной вакцинации (Рисунок 1B), разница между титрами IgG1 и IgG2a антител во всех RBD и Spike-основанных вакцинных группах была незначительна ($P>0.05$), то есть произошло переключение иммунного ответа с Th-2 поляризованного в сторону сбалансированного Th1 и Th2 ответов. Чего не скажешь в отношении самих антигенов, где в указанный срок наблюдения разница между титром IgG1 изотипа антител над IgG2a оставалась существенной ($P=0.0017-0.0058$).

Далее определяли уровень антител, блокирующих взаимодействие RBD белка вируса SARS-CoV-2 с клеточным рецептором ACE2. Показано, что Spike-основанная вакцина с адьювантом со всеми испытанными дозами антигена уже на 21 день после прайм иммунизации обеспечила у 57.1-71.4% мышей формирование RBD-ACE2 блокирующих антител, что было существенно выше ($P=0.0132 - 0.0001$) в сравнении с таковыми RBD-основанной вакцины, где этот показатель был на уровне 0-42.8%. Однако уровни RBD-ACE2 блокирующих антител во всех группах были на низком уровне. Животные, привитые однократно только антигенами RBD или Spike, не формировали RBD-ACE2 блокирующих антител. На 21 день после бустерной иммунизации количество мышей, формирующих RBD-ACE2 блокирующие антитела, во всех группах, в том числе привитых только антигенами, достигло 100%. Однако по уровню этих антител Spike-основанные вакцины практически со всеми дозами (в том числе образец без адьюванта) продемонстрировали лучшие результаты ($P=0.0102 - <0.0001$) в сравнении с соответствующими RBD-основанными.

Нейтрализующие антитела с диким вариантом вируса SARS-CoV-2 почти во всех группах животных на 21 день после прайм иммунизации были не

существенными ($P > 0.05$ vs. *appropriate controls*). Только лишь в Spike-основанной адъювантированной вакцинной группе в дозе 2.5 μg титры нейтрализующих антител были не только существенны ($P = 0.0094$) по отношению с контролем. После бустерной иммунизации в группах животных, привитых с RBD-основанной вакциной лишь в дозе 2.5 мкг, среднегеометрические титры нейтрализующих антител были в пределах GMT $4.9 \log_2$ (4.2 – 5.7) и имели статистически достоверную разницу от контрольной группы ($P = 0.0027$) и соответствующего самого антигена ($P = 0.0073$). Напротив, Spike-основанная вакцина, со всеми дозами после бустерной иммунизации формировала высокие титры вируснейтрализующих антител в пределах GMT 7.1 – 9.0 \log_2 (6.1 -10.4), которые были более чем существенно выше не только в отношении контроля ($P < 0.0001$) и самого антигена ($P < 0.0001$), но и соответствующих групп, привитых RBD-основанной вакциной ($P < 0.0001$). Сами антигены не формировали значительных ($P > 0.05$ по сравнению с соответствующим контролем) титров нейтрализующих антител у мышей даже после двукратной иммунизации.

Оценка продукции восьми видов цитокинов в ответ на рестимуляцию спленоцитов мышей с соответствующими белками (RBD или Spike) показало, что преимущественно адъювантированные образцы вакцины после двукратной иммунизации были способны индуцировать клеточный иммунный ответ. Обе RBD и Spike-основанные вакцины, формулированные с масляным адъювантом, почти со всеми испытанными дозировками индуцировали существенную продукцию как Th1 (IFN-gamma, IL-2, TNF-alpha, IL-17A), так и Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) опосредованных цитокинов в сравнении с соответствующими контрольными группами ($P = 0.0185 - < 0.0001$), которые также превосходили таковые самих антигенов ($P = 0.0321 - < 0.0001$). Среди исследованных антигенов лишь Spike белок без адъюванта был способен индуцировать существенную экспрессию цитокинов IL-2 ($P = 0.0426$) и IL-6 ($P = 0.0025$) в сравнении с соответствующими контрольными группами. Полученные данные показывают, что испытуемые образцы

адьювантированной вакцины на основе как Spike, так и RBD белка у двукратно привитых мышей формируют выраженный сбалансированный Th1/Th2 клеточный иммунный ответ.

Вышеизложенные данные по цитокиновому ответу нашли свое подтверждение в тесте на антиген специфичную пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ клеток. Установлено, что лишь адьювантированные RBD и Spike-основанные вакцинные формуляции почти со всеми испытанными дозами индуцировали существенную пролиферацию CD4⁺ ($P=0.0472$ - < 0.0001) клеток в ответ на рестимуляцию соответствующими белками в сравнении с контрольными группами. Уровень пролиферации CD8⁺ клеток с адьювантированными RBD и Spike-основанными вакцинами также заметно превышал таковые соответствующих контрольных групп, однако эта разница не была статистически достоверной ($P>0.05$). Исключением является лишь Spike-основанная адьювантированная вакцина в дозе 2.5 мкг, которая индуцировала существенную ($P=0.0361$ vs. соответствующий контроль) пролиферацию CD8⁺ клеток.

Пример 4

Вакцинация хомяков и оценка гуморального иммунного ответа

Использовались 6-8-недельные самцы сирийских хомяков, полученные из питомника лабораторных животных ННЦООИ. Животные до начала эксперимента были размещены в вентилируемые клетки с НЕРА-фильтрами (Allentown, USA) на 7 суток для акклиматизации. Иммунизацию хомяков проводили RBD и Spike-основанными вакцинными формуляциями с содержанием антигена 5 мкг/доза и контрольным образцом внутримышечно (в область бедра) в объеме 200 мкл двукратно с интервалом в 21 день. На 21 день после бустерной (n=4/группа) вакцинации у хомяков брали кровь из подъязычного венозного сплетения (под кетамин/ксилазиновой анестезией) образцы крови для определения антиген специфичных IgG антител, а также

антител, блокирующих связывание RBD с ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) клеточным рецептором, в ИФА. Кроме того, определялись нейтрализующие антитела с диким типом (D614G) или дельта вариантом вируса SARS-CoV-2 (в дозе 1000 TCID₅₀). Сыворотка крови отделялась центрифугированием и хранилась при -20°C до использования.

Иммуногенность образцов вакцин на хомяках оценивали в режиме двукратной внутримышечной иммунизации с интервалом в 21 день. В отличие от эксперимента на мышах здесь мы использовали одну дозу вакцины в 5 мкг/животное, а также не включали группы с только антигеном, так как в исследованиях на мышах они не продемонстрировали ни выработку нейтрализующих антител, ни выраженного клеточного иммунного ответа. В данном эксперименте также использовались образцы сывороток крови хомяком на 21 день после заражения вирусом SARS-CoV-2 (D614G дикий вариант), то есть переболевших инфекцией животных.

Оба испытанных состава вакцин на основе RBD и Spike привели к появлению значительных титров антител IgG через 21 день после бустерной иммунизации по сравнению с контролем ($P < 0.0001$). Значительные титры IgG антител против РБД ($P < 0.0001$ по сравнению с контролем) были также обнаружены в группе реконвалесцентов. Однако самые высокие титры IgG антител были индуцированы вакциной на основе Spike ($P = 0.0455$ по сравнению с вакциной на основе RBD), которые были немного выше, чем в группе реконвалесцентов.

Дальнейшие исследования показали, что RBD-основанная вакцина с адьювантом на 21 день после бустерной иммунизации обеспечивает формирование RBD-ACE2 блокирующих антител лишь у 50% животных, причем уровень этих антител был низким (2/6) или средним (1/6). Лучше всего себя проявила Spike-основанная вакцина, которая у 100% животных формировала высокие (4/6) и средние (2/6) уровни RBD-ACE2 блокирующих антител, которые существенно ($P < 0.0001$) превосходили таковые с RBD-

основанной вакциной, и не уступали группе реконвалесцентов (у 2/2 высокие и 2/2 средние уровни ACE2 блокирующих антител).

Уровень нейтрализующих антител с диким вариантом вируса SARS-CoV-2 с D614G мутацией был полностью сопоставим с данными по IgG и RBD-ACE2 блокирующих антител. Наивысший титр вируснейтрализующих антител на уровне GMT $7.8 \log_2$ (6.5 – 9.4) был выявлен в группе хомяков, привитых двукратно Spike-основанной адъювантированной вакциной, который превосходил таковые с RBD-основанной вакциной (GMT $3.7 \log_2$ [2.6-5.0], $P < 0.0001$), контролем ($P < 0.0001$) и не уступали группе реконвалесцентов. Перекрестно реагирующие с дельта вариантом вируса SARS-CoV-2 нейтрализующие антитела были выявлены лишь в группе хомяков, двукратно привитых Spike-основанной адъювантированной вакциной, титр которых составлял GMT $6.0 \log_2$ (4.7-7.7; $P < 0.0001$ vs. RBD-основанная вакцина и контрольная группа) и был в 3.5 раза ниже чем с диким вариантом вируса. Интересным является то, что в группе реконвалесцентов уровень нейтрализующих антител был сопоставим со Spike-основанной вакциной группой, однако здесь снижение нейтрализующих титров антител к дельта варианту вируса SARS-CoV-2 в сравнении с исходным диким вариантом составляло 1.5 раза.

Пример 6

Оценка протективной эффективности вакцины на хомяках

На 21 день после бустерной инъекции хомяки всех групп были интранально заражены вирусом SARS-CoV-2 в дозе 1×10^4 ТЦД50 под внутрибрюшинной кетаминевой (100 mg/kg) и ксилазиновой (10 mg/kg) анестезией и наблюдались в течение 7 дней после заражения с ежедневным измерением веса животных. На 3-й и 7-й дни после заражения половина животных (3/6) из каждой группы были подвергнуты некропсии для взятия проб носовых турбин и легких. Три доли правого легкого у каждого животного

были зафиксированы в 10% формалине для гистопатологических исследований. Две доли левого легкого были гомогенизированы в 1 мл DMEM с помощью прибора TissueLyser II (QIAGEN) при 300 колебаний/мин в течение 60 секунд, супернатант после центрифугирования (5000 g в течение 15 мин при 4°C) был собран и хранился при -70°C для выявления вирусной РНК в РТ-ПЦР и определения вирусного титра.

Динамика массы животных

Защитное свойство вакцин в первую очередь оценивали по динамике массы животных после контрольного заражения в течение 7 суток. Исследования показали, что только лишь в группе хомяков, привитых адьювантированной Spike-основанной вакциной, не отмечалось снижения массы тела в течение срока наблюдения, а даже напротив с 3 дня после заражения отмечалась положительная динамика по этому параметру. У животных, привитых RBD-основанной вакциной на 2-3 сутки наблюдалось положительная динамика в весе, однако с 4 дня пошло небольшое снижение, которое достигла максимума (на 1.77% от исходного веса) на 7 день наблюдения. В контрольной группе хомяков отмечалось стабильное снижение массы тела, которое на 7 день после заражения составило около 9.8% от исходного веса животных. У некоторых контрольных животных к концу срока наблюдения отмечалось ухудшение состояния, которое выражалось подавленностью и взъерошенностью. Отмечена достоверная разница по весу животных между Spike-основанной вакциной ($P=0.0386$ - <0.0001) и контрольной группой на 4-7 дни после контрольного заражения, а также RBD-основанной вакциной ($P=0.0053$) и контрольной группой на 7 день после контрольного заражения.

Вирусная нагрузка в респираторных органах животных

Вирусную нагрузку у хомяков определяли в суспензиях их носовых турбин и легких на 3 и 7 дни после контрольного заражения. При этом оценка вирусной нагрузки проводилась по данным реал-тайм ПЦР (выражались в циклах/Ct), а также по титру инфекционной активности вируса (\log_{10}

TCID₅₀/0.2 mL). Результаты ПЦР исследований показали, что на 3 день после контрольного заражения РНК вируса SARS-CoV-2 выявлялись как в назальных турбинах, так и легких всех животных, и на 7 день эта тенденция сохранилась. Исключением является только лишь группа хомяков, привитых Spike-основанной вакциной, где был отрицательный результат (Ct более 40) в ПЦР во всех пробах на 7 день после контрольного заражения. Дальнейшее титрование образцов суспензий назальных турбин и легких показало, что у животных, привитых Spike-основанной вакциной во все сроки наблюдения полностью отсутствовал детектируемый уровень инфекционного вируса, и тем самым обеспечена лучшая защита по данному показателю в сравнении с RBD-основанной вакциной (день 3, назальные турбины, $2.25 \pm 0.66 \log_{10}$ TCID₅₀/0.2 mL; $P=0.0357$) и контрольной (день 3, назальные турбины [$6.08 \pm 0.36 \log_{10}$ TCID₅₀/0.2 mL] и легкие [$3.0 \pm 0.22 \log_{10}$ TCID₅₀/0.2 mL], $P=0.0032 - <0.0001$) группами. В образцах назальных турбин и легких хомяков из RBD-основанной вакциной группы хоть и обнаруживался инфекционный вирус, однако его титры были существенно ниже (назальные турбины на 3 день после контрольного заражения; $P=0.0001$) чем в контрольной группе. На 7 день после заражения в образцах назальных турбин ($0.91 \pm 0.3 \log_{10}$ TCID₅₀/0.2 mL) и легких ($0.83 \pm 0.22 \log_{10}$ TCID₅₀/0.2 mL) хомяков контрольной группы (2/3) все еще присутствовал инфекционный вирус, однако его титры были на низком уровне, и не имели достоверной разницы ($P>0.05$) по сравнению с вакцинированными группами животных.

Защита от трансмиссии вируса

Во все группы хомяков на 2 сутки после контрольного заражения были подсажены по 2 особи наивных животных, одна из которых была на контакте в течение одних суток (после отделялась в чистую клетку), а другая в течение 5 суток после подсадки. На 5 сутки после контакта оба животных подвергались некропсии для оценки вирусной нагрузки в назальных турбинах и легких. Кроме того, в течение срока наблюдения определялся вес этих животных. До

подсадки контактных животных у всех опытных хомяков определялся титр инфекционного вируса в ротоглоточных смывах.

Установлено, что Spike-основанная вакцина обеспечивает 100%-ную блокировку трансмиссии вируса от зараженных животным к контактным, так как у обеих подсаженных наивных животных во всех образцах не выявлялась вирусная РНК в ПЦР и инфекционный вирус при титровании в течение срока наблюдения, а также отмечалась положительная динамика в весе (прирост массы животных на 5 день после подсадки составлял 5-6%, данные не показаны). Напротив, в RBD-основанной вакциной группе у 2/2 контактных животных вирус выявлялся в назальных турбинах и легких в ПЦР, а в 1/2 случаях и инфекционный вирус в титрах $0.7-2.37 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2 \text{ mL}$. К 5 дню после подсадки у контактных хомяков RBD-основанной вакциной группы у одного животного отмечалась положительная динамика (на 1.3%), а другого отрицательная (на 3.2%, данные не показаны). У контактных хомяков контрольной группы наблюдалась идентичная картина, однако здесь вирус выявлялся в несколько высоких титрах (назальные турбины 3.62 ± 1.12 , легкие $1.5 \pm 1.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2 \text{ mL}$), а также отмечалось снижение массы тела животных на 3.5-4.8% (данные не показаны). При оценке уровня выделяемого вируса через ротоглотку на 2 сутки после контрольного заражения (или на момент подсадки контактных животных к ним), установлено, что инфекционный вирус не детектировался лишь у животных, привитых Spike-основанной вакциной, и в существенно меньшем титре ($1.04 \pm 0.21 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2 \text{ mL}$; $P=0.0013$) выделялся у животных RBD-основанной вакциной группе по сравнению с контрольной группой ($4.25 \pm 0.89 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2 \text{ mL}$).

Гистология легких опытных и контактных животных

В легких всех зараженных хомяков за исключением Spike-основанной вакциной группы было подтверждено наличие классических признаков острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), проявляющихся при заражении вирусом SARS-CoV-2. Была дана сравнительная морфологическая характеристика, которая показала, что на 3 сутки исследования в RBD-

основанной вакцинной и контрольной группах, а также их контактных группах в легких хомяков были выявлены признаки экссудативной фазы ОРДС. На 7 сутки в легких животных этих же групп отмечались признаки фибропролиферативной фазы ОРДС. Необходимо отметить, что уровень повреждения легких в RBD-основанной вакцинной группе в течение срока наблюдения был существенно ниже ($P < 0.0001$), чем в контрольной группе, где состояние легких было оценено как тяжелое. Только лишь в Spike-основанной вакцинной и его контрактной группах не было выявлено признаков классических фаз, характерных для ОРДС, то есть была отмечена полная защита легких от вирусного повреждения (гистологическая картина легких соответствовала образцы негативного контроля или Mock животного).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения субъединичной вакцины для профилактики COVID-19, включающий использование адъювантированной формуляции очищенного рекомбинантного вирусного белка, полученного на основе бакуловирусной системы, **отличающийся** тем, что используют рекомбинантный эктодоменный полноразмерный стабилизированный спайк белок вируса SARS-CoV-2, полученный в бакуловирусной экспрессионной

системе на культуре клеток Sf9 (ткань яиц мотылька *Spodoptera frugiperda*) с использованием химически нейтральной среды (не содержащей дрожжей, сыворотки, протеинов и других продуктов животного происхождения), рекомбинантный белок очищают аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA, концентрируют гель-фильтрацией на хроматографических колонках и формулируют наноэмульсионным масляным адъювантом Serivac SWE™.