



КОНФЕРЕНЦИЯ GLP-PLANET III

Результаты доклинического исследования субъединичной рекомбинантной вакцины на основе N-белка вируса SARS-CoV-2

Крышень Кирилл Леонидович, к.б.н.
kryshen.kl@doclinika.ru

Санкт-Петербург, 2022

Вакцины для профилактики SARS-CoV-2

38
Approved Vaccines

197
Countries with Approved Vaccines

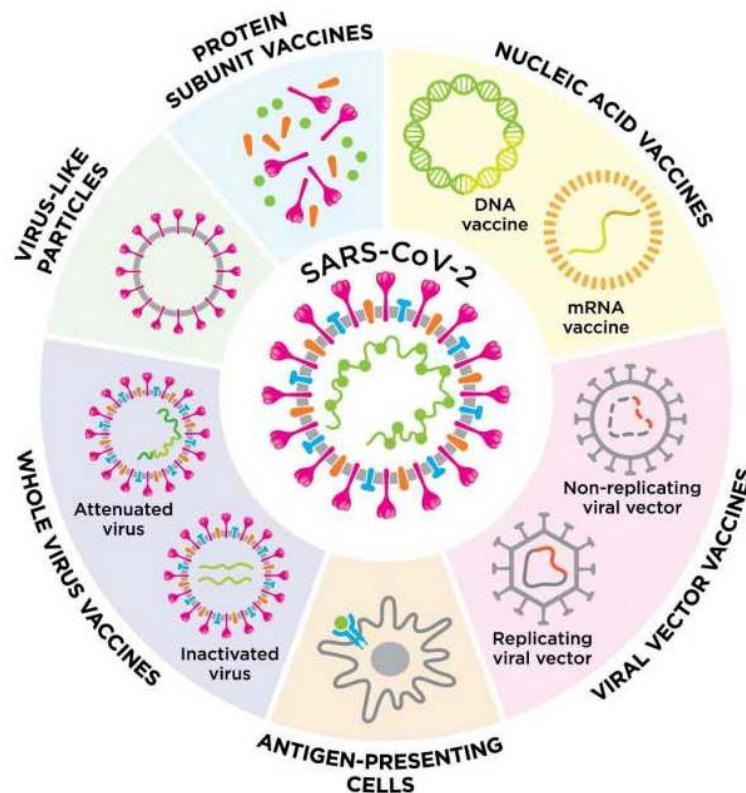
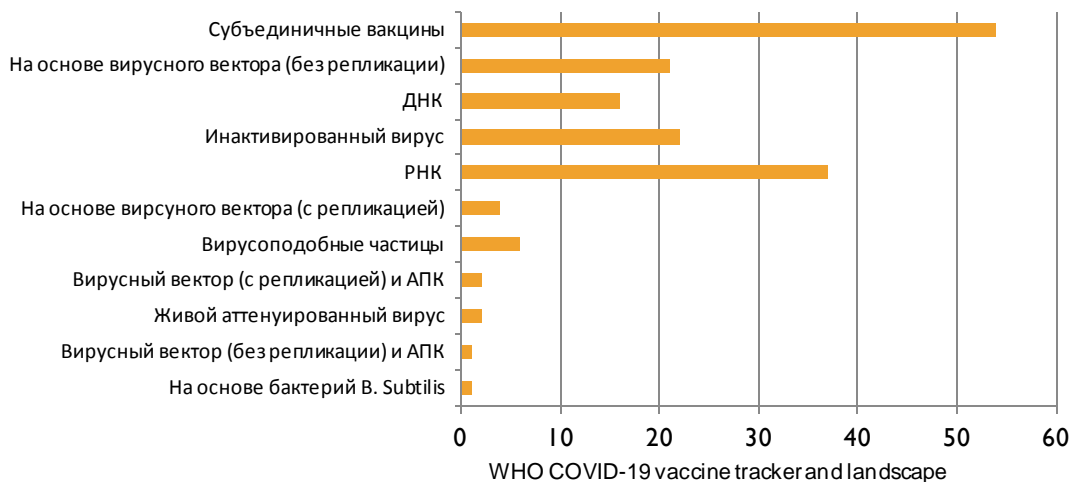
11
WHO EUL Vaccines

212
Vaccine Candidates

734
Vaccine Trials

76
Countries with Vaccine Trials

По данным сайта <https://covid19.trackvaccines.org/>



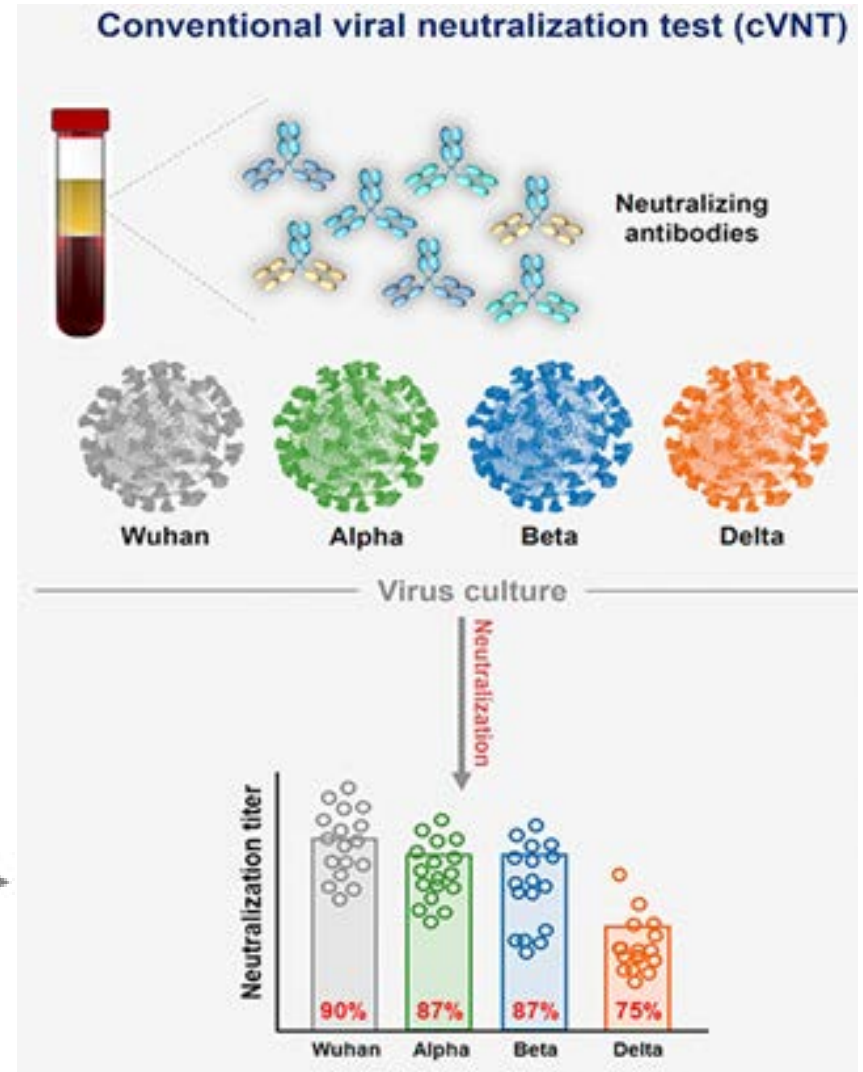
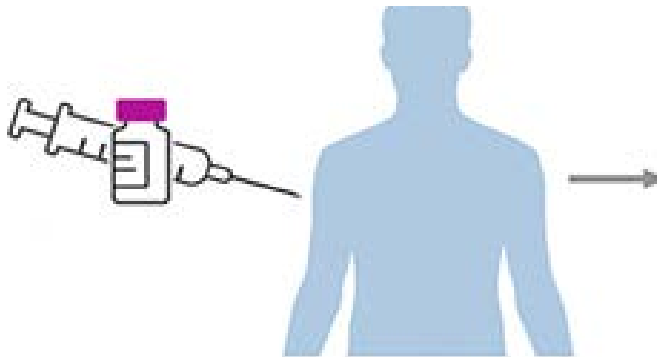
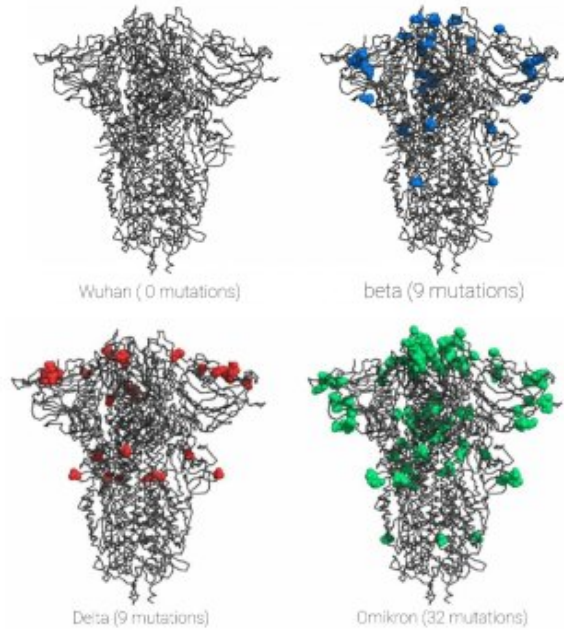
<https://doi.org/10.3390/bioengineering9020072>

По данным ГРЛС в РФ на текущий момент зарегистрировано 9 вакцин отечественного производства для профилактики COVID 19

- Гам-Ковид-Вак (Спутник V) – на основе аденовирусного вектора (08.2020)
- ЭпиВакКорона – на основе пептидных антигенов спайк-белка вируса SARS-CoV-2 (10.2020)
- КовиВак – на основе инактивированного цельновирионного вируса SARS-CoV-2 (02.2021)
- Конвасэл® - на основе рекомбинантного белка N вируса SARS-CoV-2 (03.2022)

ПРОБЛЕМА ПОЯВЛЕНИЯ НОВЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА

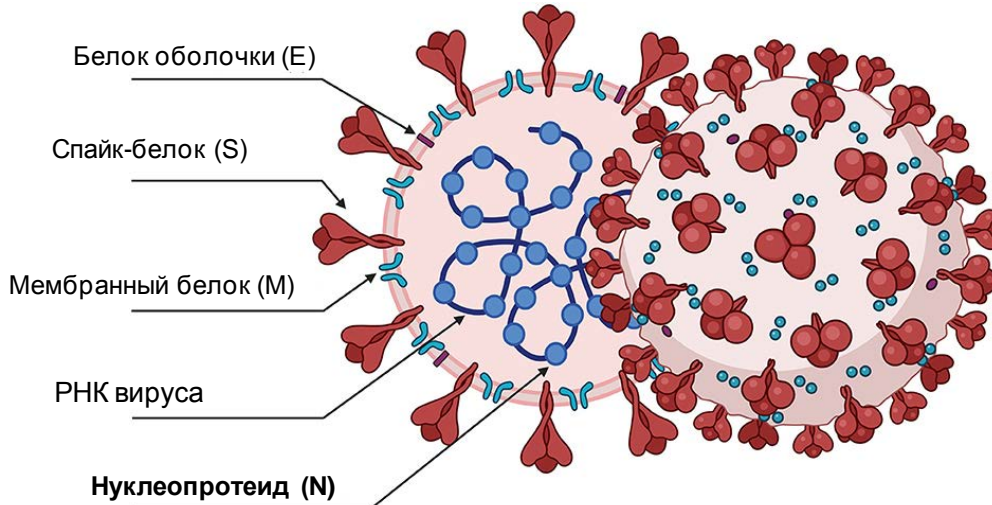
Мутации Спайк-белка



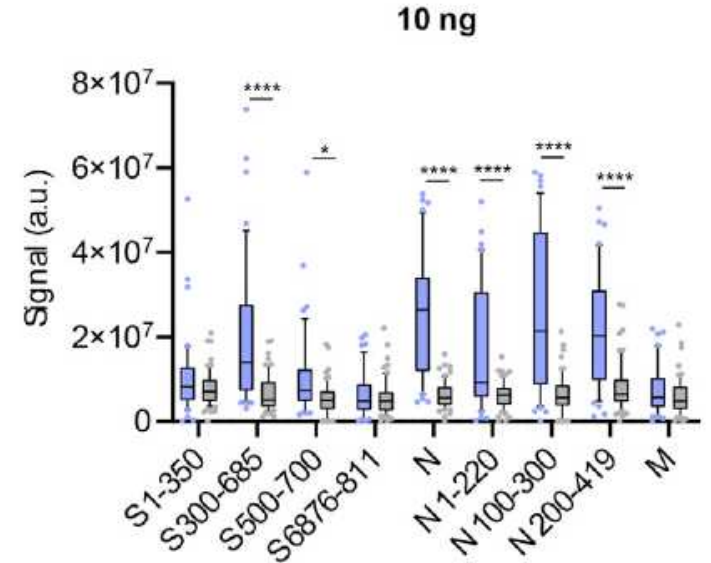
Salehi M. et al. Assessment of BIV1-CovIran inactivated vaccine–elicited neutralizing antibody against the emerging SARS-CoV-2 variants of concern //Clinical Microbiology and Infection. – 2022. – T. 28. – №. 6. – С. 882. e1-882. e7.

Белок N в качестве целевого антигена

Обладает высокой иммуногенностью



<http://doi.org/10.3389/fviro.2021.815388>



Результаты Dot-Blot анализа

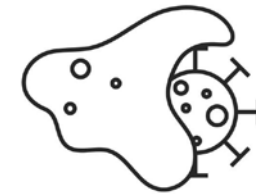
Smits V. A. J. et al. The Nucleocapsid protein triggers the main humoral immune response in COVID-19 patients // Biochemical and biophysical research communications. – 2021. – Т. 543. – С. 45-49.

Высококонсервативен

HCoV-OC43 N-NTD	59	VVPYY	SW	FSG	ITQ	FQK	QKEF	E	VE	GGG	PEI	APGVP	A	EAK	G	Y	R	H	R	G	S	108
SARS-CoV-2 N-NTD	46	PNNTAS	W	F	T	A	L	T	Q	H	G	K	K	F	P	R	G	G	G	P	D	93
SARS-CoV N-NTD	47	PNNTAS	W	F	T	A	L	T	Q	H	G	K	E	E	L	R	F	P	R	G	G	94
MERS-CoV N-NTD	37	PNNTV	S	W	Y	T	L	T	Q	H	G	K	V	P	L	T	F	P	P	G	D	83
HCoV-OC43 N-NTD	109	F	K	T	A	D	G	N	Q	R	Q	L	L	P	R	W	F	Y	F	Y	L	158
SARS-CoV-2 N-NTD	94	I	R	G	G	D	G	K	M	K	D	L	S	P	R	W	F	Y	F	Y	L	143
SARS-CoV N-NTD	95	V	R	G	G	D	G	K	M	K	E	L	S	P	R	W	F	Y	F	Y	L	144
MERS-CoV N-NTD	84	I	N	T	G	N	G	I	K	Q	L	L	A	P	R	W	F	Y	F	Y	T	132
HCoV-OC43 N-NTD	159	A	D	I	V	D	R	D	P	S	S	D	E	A	I	P	T	R	F	F	P	189
SARS-CoV-2 N-NTD	144	D	H	I	G	T	R	N	P	A	N	N	A	A	I	V	L	Q	L	P	Q	174
SARS-CoV N-NTD	145	D	H	I	G	T	R	N	P	A	N	N	A	A	I	V	L	Q	L	P	Q	175
MERS-CoV N-NTD	133	S	T	F	G	T	R	N	P	A	N	D	S	A	I	V	T	Q	F	A	P	163

Цветом выделены высококонсервативные участки

Наличие Т-клеток памяти обнаружено у пациентов спустя 17 лет после SARS-CoV 2003 года



<https://doi.org/10.3390/v13061115>

Конвасэл® Вакцина субъединичная рекомбинантная для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2

Разработчик (производитель): ФГУП СПбНИИВС ФМБА России

Лекарственная форма: эмульсия для внутримышечного введения

Состав: рекомбинантный белок N вируса SARS-CoV-2, 50 мкг

Основные вспомогательные вещества: сквалан - 15 мг, (D,L)- α -токоферол - 5 мг, полисорбат 80 - 5 мг



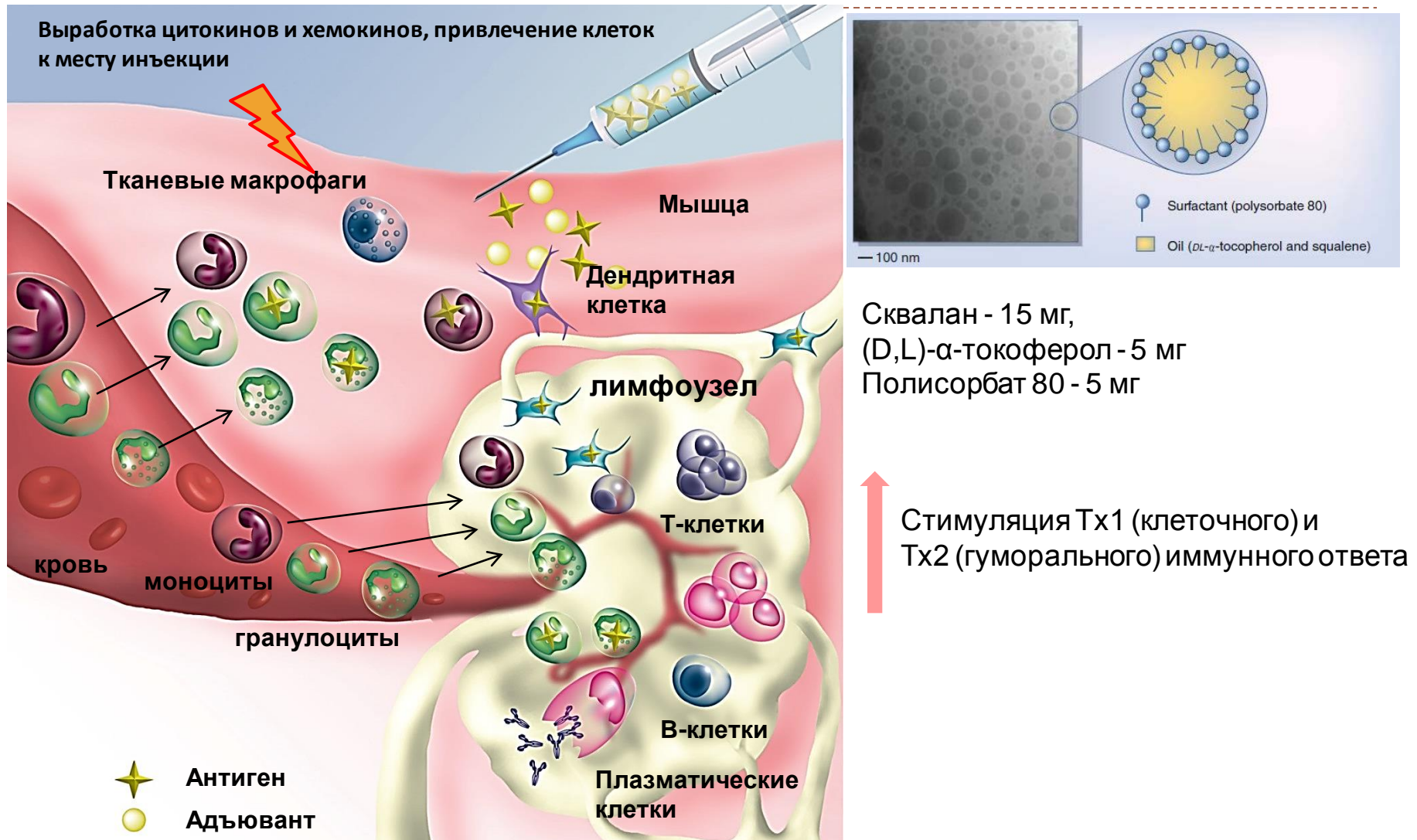
Адъюванты в составе вакцин

Адъювант	Состав	Год*	Основной механизм	Тип ответа
Соединения алюминия	Гидроксид алюминия, фосфат алюминия	1930-е	Эффект депо, стимуляция фагоцитоза АГ АПК, нарушение целостности мембраны ДК, активация комплемента, стимуляция и дифференцировка CD4+ Т-клеток	Tx2
MF59	Эмульсия сквалена	1997	Выработка цитокинов и хемокинов, привлечение клеток к месту инъекции.	Tx1/Tx2
AS04 (адъювантная система)	Монофосфарилированный липид А адсорбированный на гидроксиде алюминия	2009	MPL активирует врожденный иммунитет посредством взаимодействия с TLR4-рецептором.	Tx1/Tx2
AS03	Эмульсия сквалена	2013	Выработка цитокинов и хемокинов, привлечение клеток к месту инъекции.	Tx1/Tx2
AS01 (адъювантная система)	Монофосфарилированный липид А (MPL) + Сапонин	2015	Сапонин предположительно способствует поглощению АГ АПК путем связывания с поверхностными лектинами клеток	Tx1/Tx2
CpG 1018	Синтетический олигодезоксинуклеотид	2017	Стимуляция врожденного и адаптивного иммунитета посредством взаимодействия TLR9-рецептором	Tx1

Примечание – год лицензирования, АПК – антиген-презентирующая клетка, ДК – дендритная клетка, АГ - антиген

Эмульсионный адъювант на основе сквалена

Механизм усиления иммунного ответа



Программа регистрационных доклинических исследований

Фармакодинамика

Исследование иммуногенных свойств и длительности иммунного ответа на трех видах животных (мыши, кролики, сирийские хомячки);

Исследование клеточного иммунного ответа на мышах;

Изучение протективных свойств на модели **SARS-CoV-2** инфекции у сирийских хомячков;

Изучение общетоксических свойств

Исследование токсичности при однократном введении на трех видах (мыши, кролики, сирийские хомячки);

Исследование токсичности, местной переносимости, иммунотоксичности и фармакологической безопасности на трех видах животных (мыши, кролики, хомячки).

Исследование специфических видов токсичности

Изучение пирогенности на кроликах;

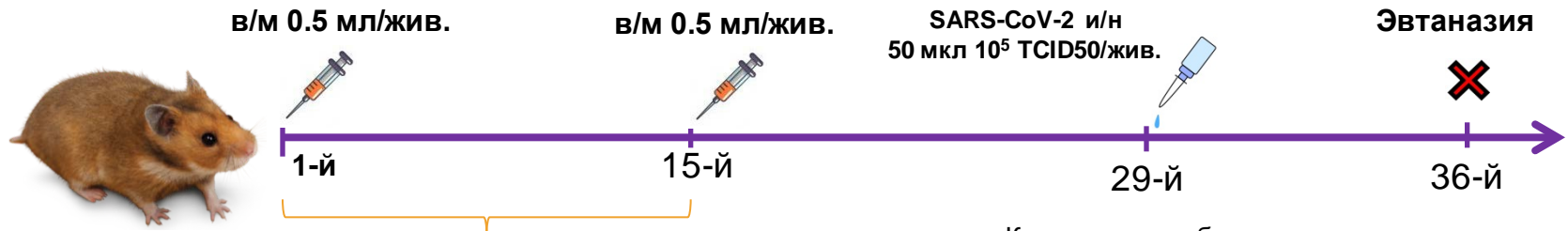
Исследование антигенных свойств на морских свинках;

Исследование репродуктивной токсичности (влияние на генеративную функцию) у крыс;

Исследование эмбриотоксического действия у крыс;

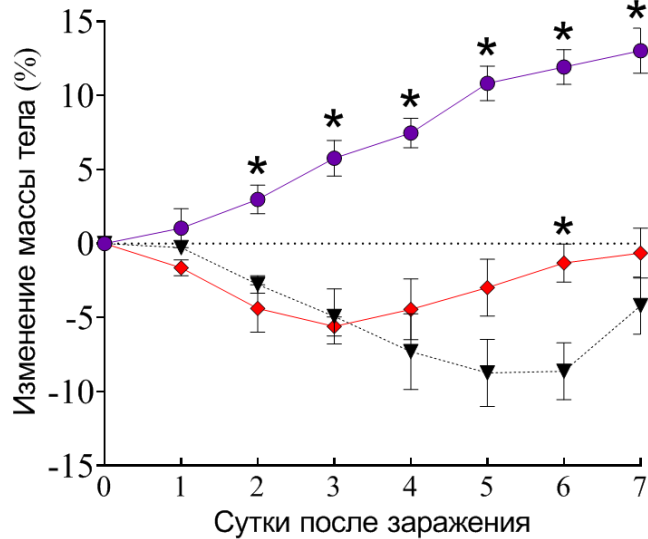
- World Health Organization et al. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines//WHO technical report series. – 2005. – Т. 927. – С. 31-63.
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 "О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения"
- Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 ноября 2019 г. № 202 "Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов"
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 "Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза"
- Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21 мая 2020 г. № 10 "О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения"
- Guideline I. C. H. N. T. Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals //ICH Guideline. – 2005. – С. S8.

Протективная активность на модели SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков



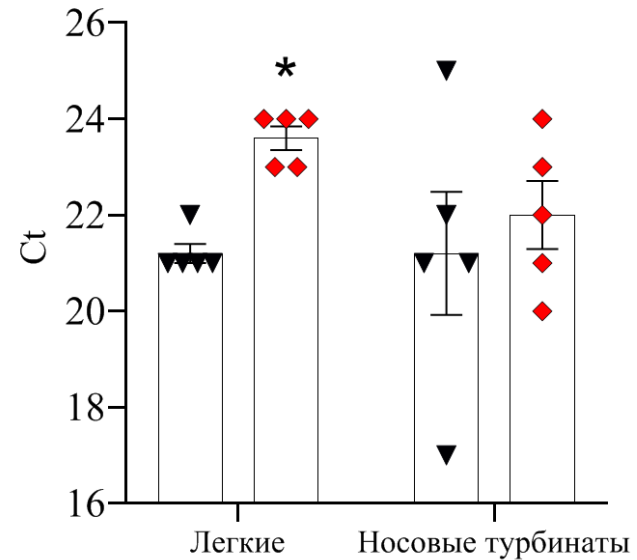
- Клиническое наблюдение
- Масса тела, массовый коэффициент легких
- Количество вируса в легких и носовых турбинатах
- Гистологический анализ легких

Масса тела после заражения



● Интактные ▼ Негативный контроль ◆ Вакцина
* - $p < 0.05$ vs контроль заражения (негативный контроль)

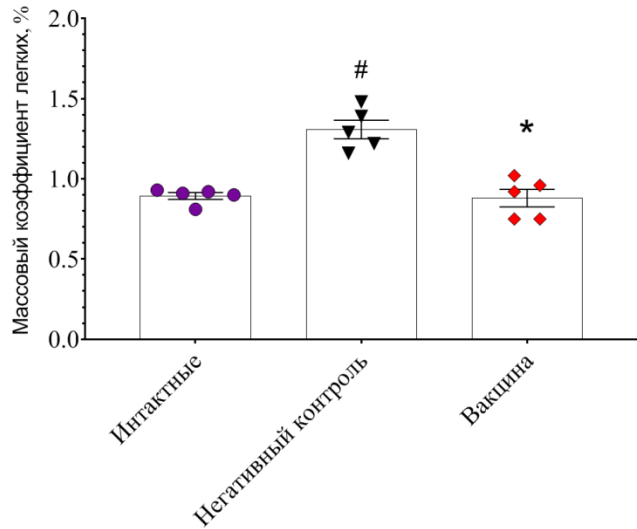
Количество вируса в тканях, ОТ-ПЦР



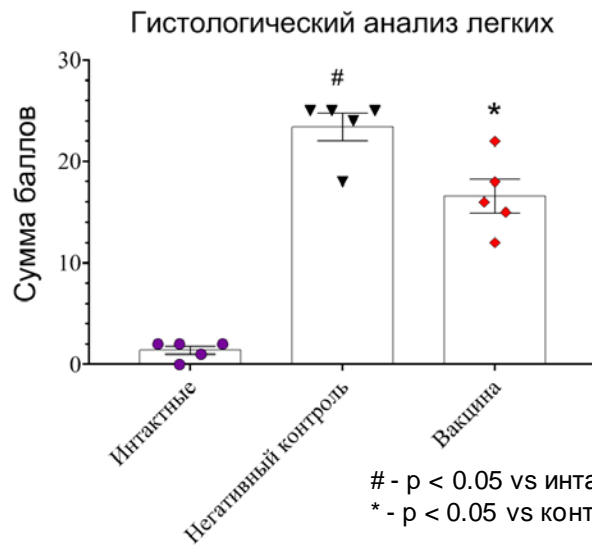
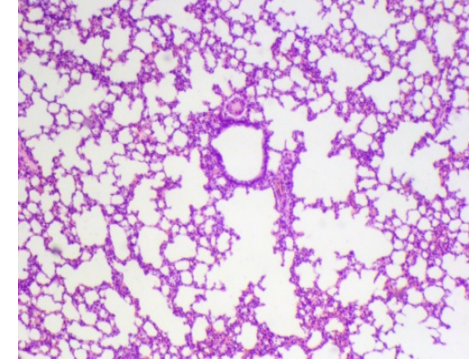
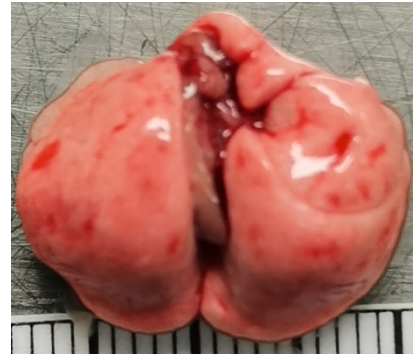
Ct - пороговый цикл флуоресценции
– чем выше Ct, тем меньше вируса

Заражение проведено на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», вирус SARS-CoV-2 : протитотипный шт. ПИК35 (клад Pango B.1.1, GISAID ID EPI_ISL_428852)

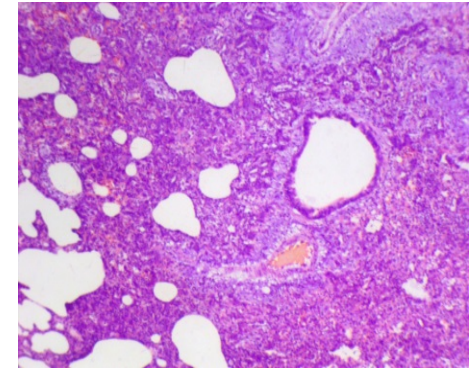
Протективная активность на модели SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков



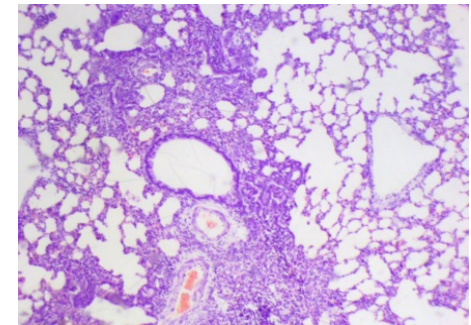
Интактные



Контроль



Вакцина

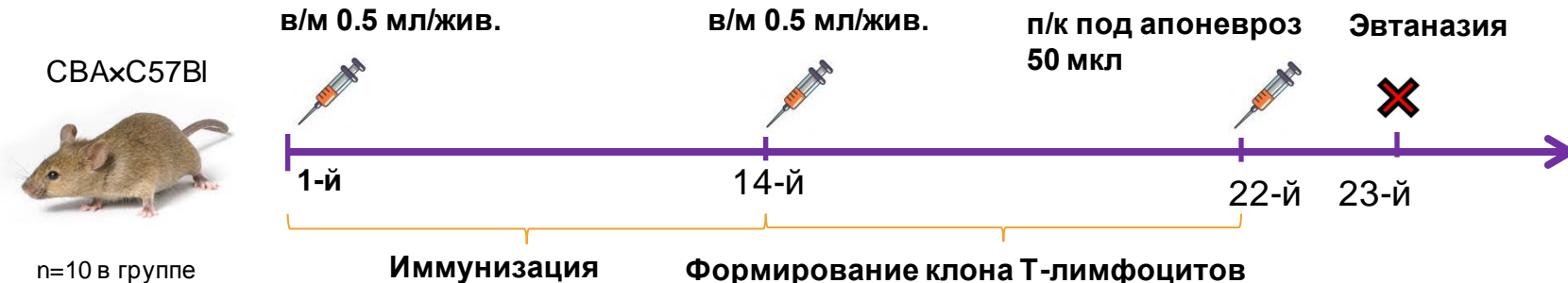


- $p < 0.05$ vs интактные
* - $p < 0.05$ vs контрольные

● Интактные ▼ Негативный контроль ◆ Вакцина

Увеличение 40x

Изучение клеточного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у мышей

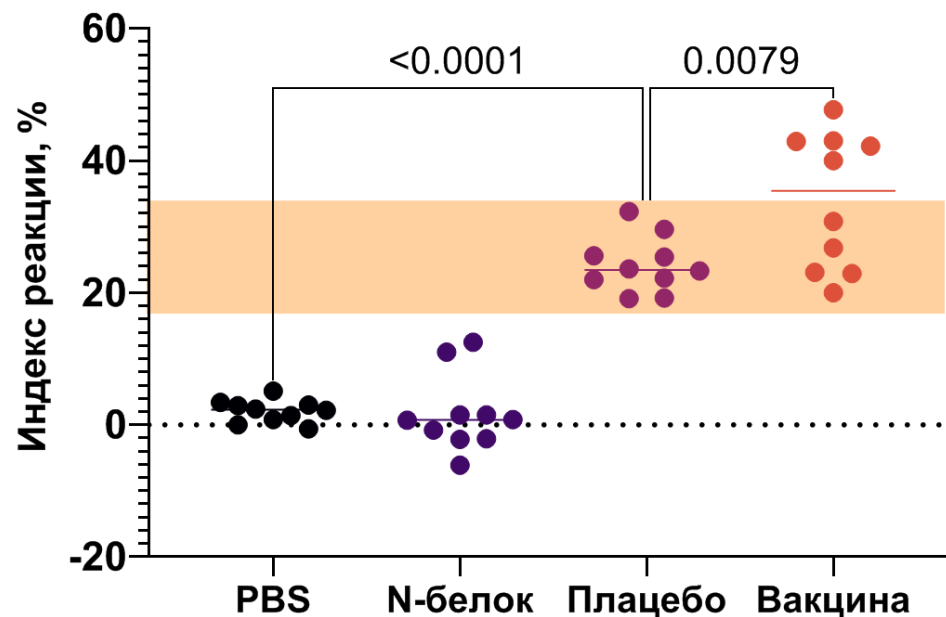


Индекс реакции ГЗТ

$$I_p = \frac{M_{оп} - M_k}{M_k} \times 100\%$$

где I_p – индекс реакции ГЗТ,
 $M_{оп}$ – масса «опытной» конечности (правая тазовая),
 M_k – масса «контрольной» конечности (левая тазовая).

Отек лапы, стадия разрешения



Изучение гуморального и клеточного иммунного ответа

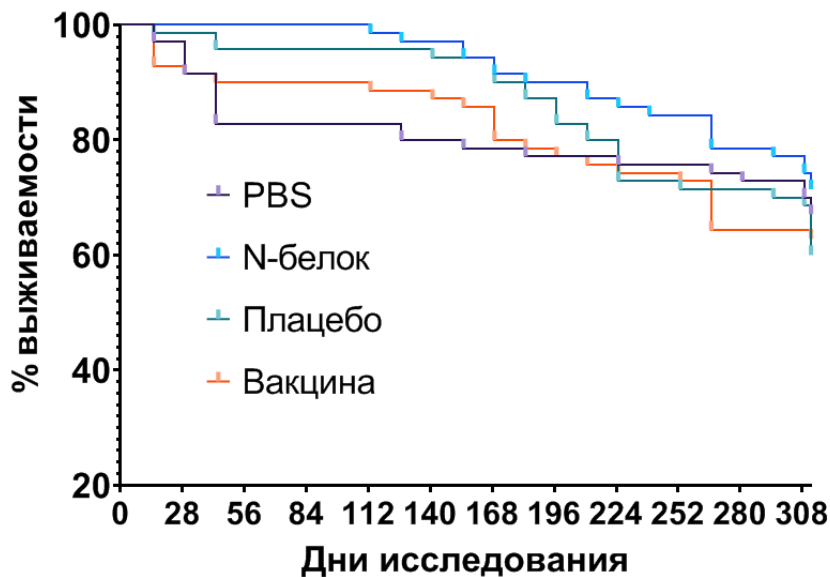
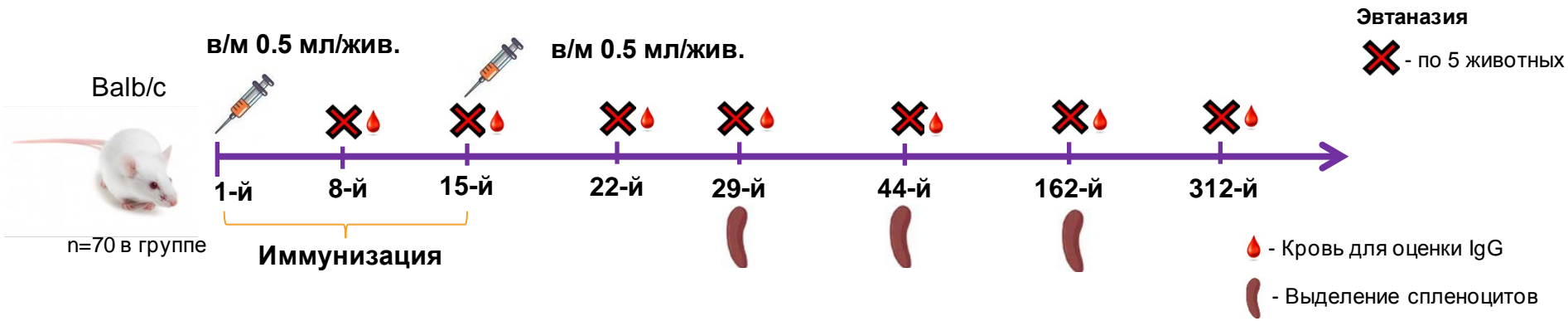
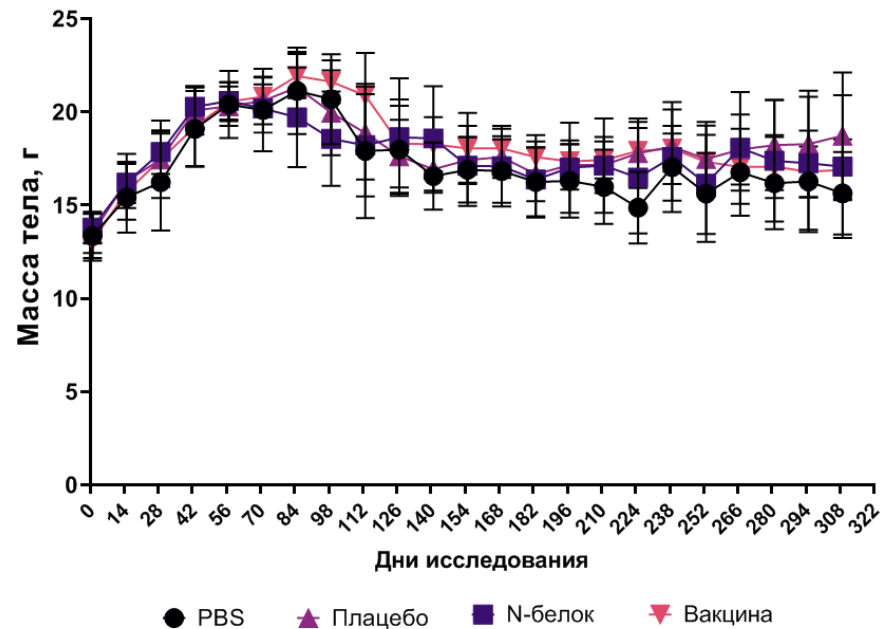
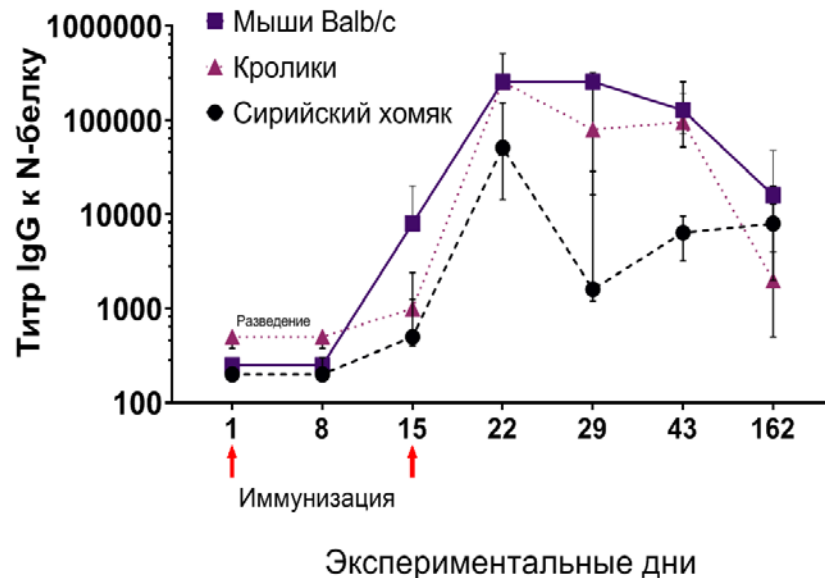
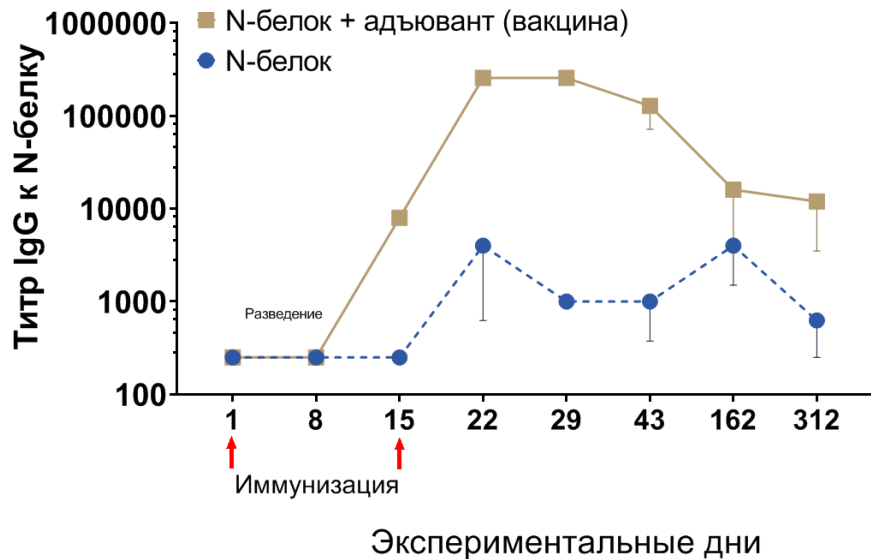


Диаграмма выживаемости Каплана-Мейера. Логранговый тест не выявил статистически значимых отличий кривых выживаемости ($p < 0.05$)



Изучение гуморального иммунного ответа



Метод непрямого ИФА

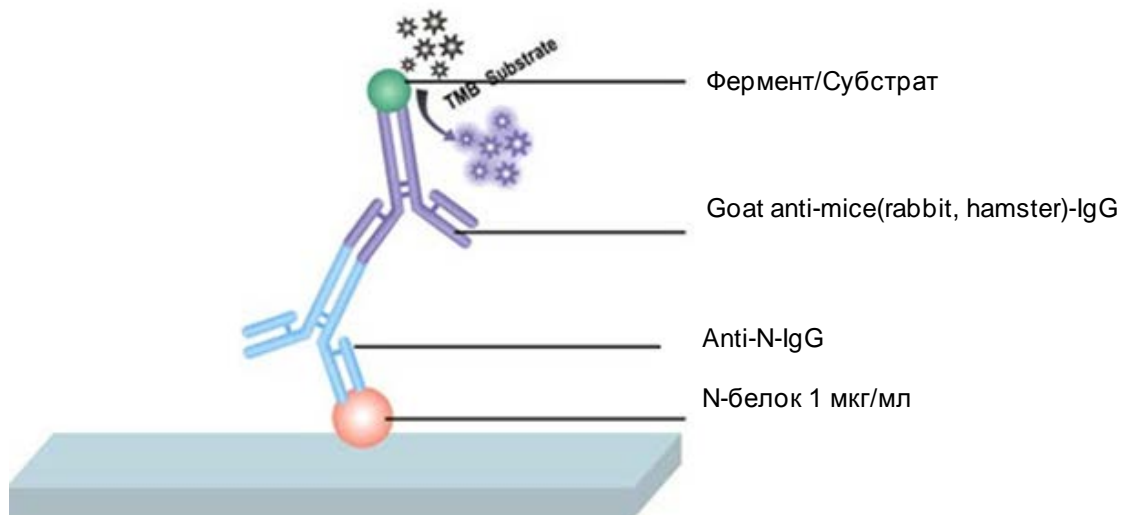
Разведения образцов

Мыши: 1:250 – 256000

Хомячки: 1: 200 – 204800

Кролики: 1:500 - 512000

Cut-off = $D_{Вик} + 0,05$



К вопросу о релевантности Сирийских хомячков для исследования вакцин для профилактики COVID 19

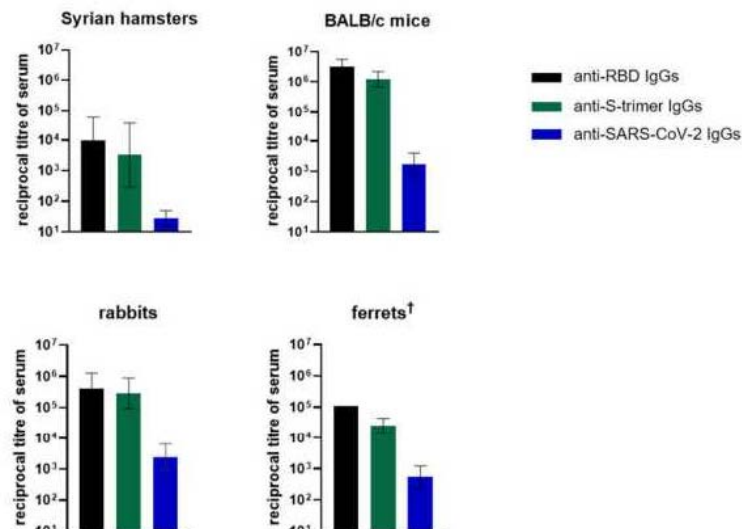


Article

Are Hamsters a Suitable Model for Evaluating the Immunogenicity of RBD-Based Anti-COVID-19 Subunit Vaccines?

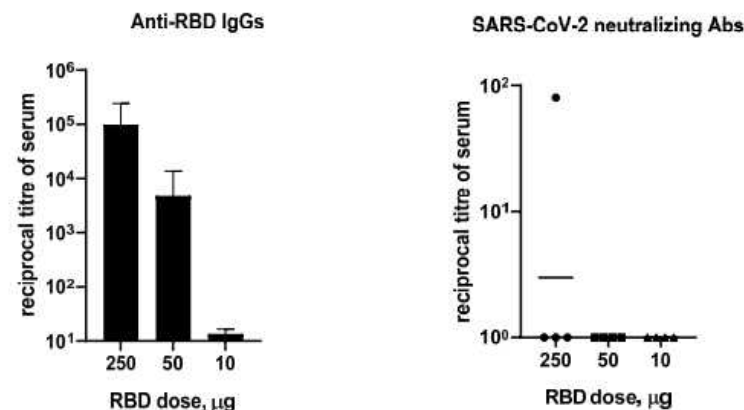
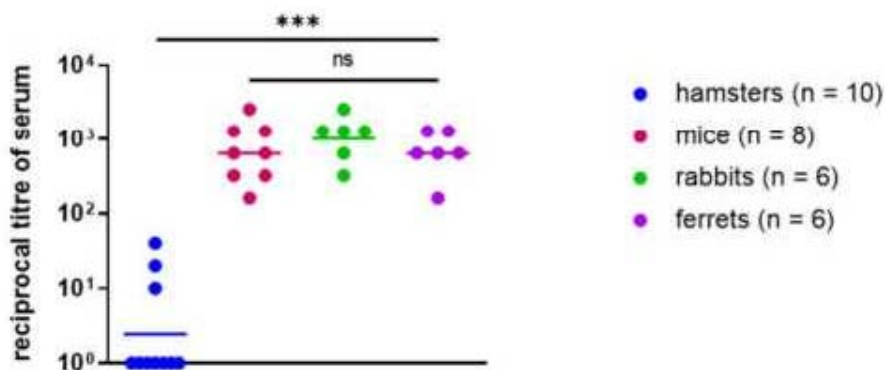
Iuliia A. Merkuleva ¹, Dmitry N. Shcherbakov ^{1,*}, Mariya B. Borgoyakova ¹, Anastasiya A. Isaeva ¹, Valentina S. Nesmeyanova ¹, Natalia V. Volkova ¹, Vazirbek S. Aripov ¹, Daniil V. Shanshin ¹, Larisa I. Karpenko ¹, Svetlana V. Belenkaya ¹, Elena I. Kazachinskaia ¹, Ekaterina A. Volosnikova ¹, Tatiana I. Esina ¹, Alexandr A. Sergeev ¹, Kseniia A. Titova ¹, Yulia V. Konyakhina ¹, Anna V. Zaykovskaya ¹, Oleg V. Pyankov ¹, Evgeniia A. Kolosova ^{1,2}, Olesya E. Viktorina ², Arseniia A. Shelemba ³, Andrey P. Rudometov ¹ and Alexander A. Ilyichev ¹

Viruses **2022**, *14*, 1060. <https://doi.org/10.3390/v14051060>



[†]IgA, IgG, IgM titers were evaluated

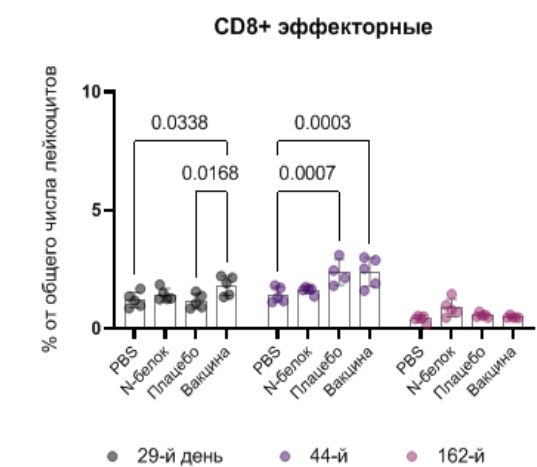
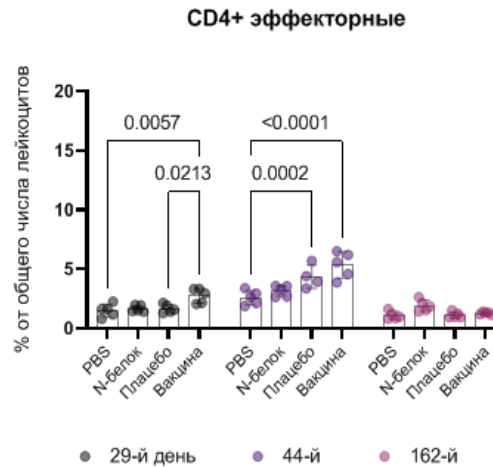
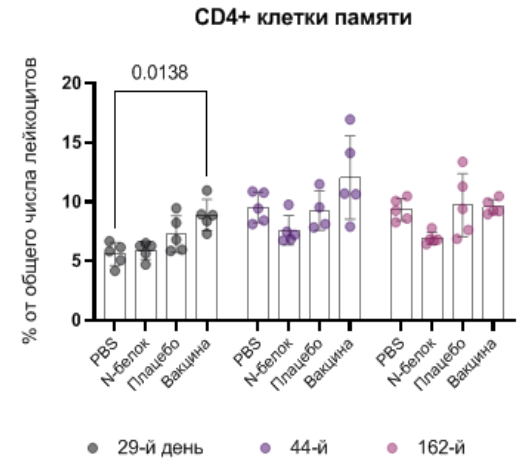
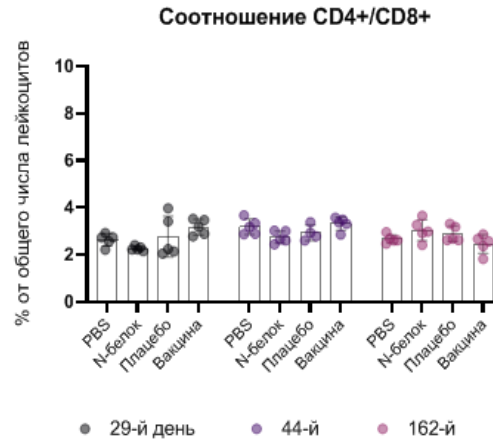
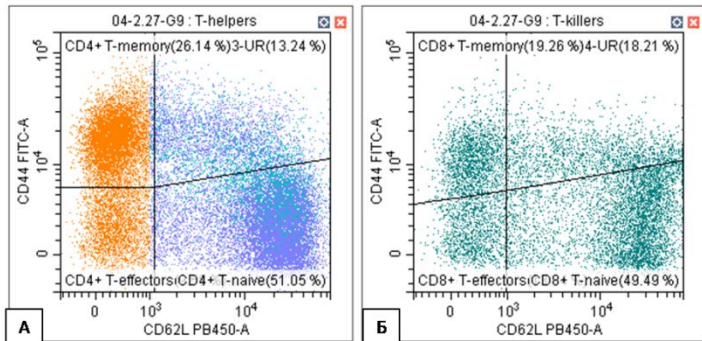
SARS-CoV-2 neutralizing Abs



Изучение клеточного иммунного ответа

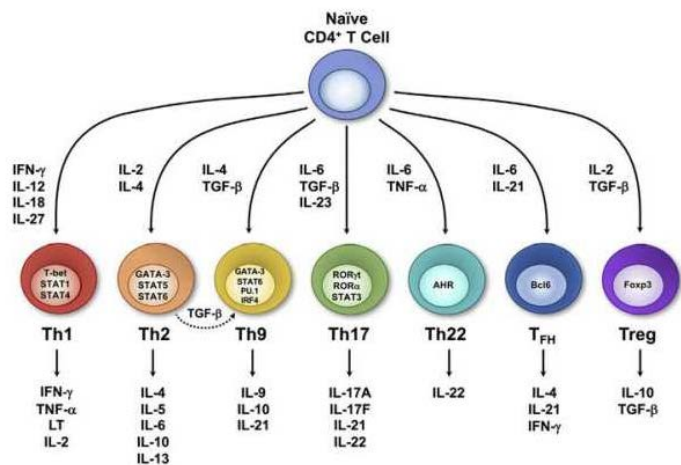
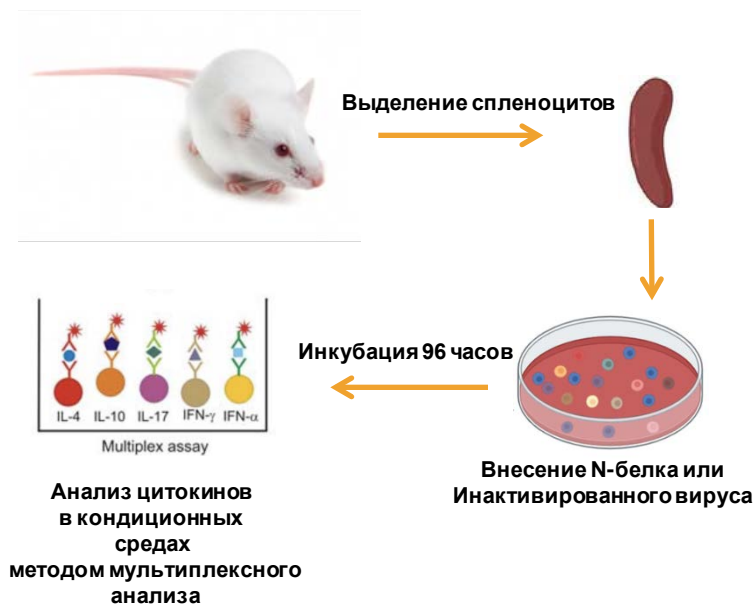
Таблица – Фенотипирование лимфоцитов

Субпопуляция	CD – маркер
Лейкоциты	CD45+
В-лимфоциты	CD45+CD19+
Т-лимфоциты	CD45+CD3+
Цитотоксические Т-лимфоциты	CD45+CD3+CD8+CD4-
Т-хелперы	CD45+CD3+CD8-CD4+
Наивные Т-лимфоциты	CD45+CD3+CD8+/CD4+CD44-CD62L+
Т-клетки памяти	CD45+CD3+CD8+/CD4+CD44-CD62L-
Эффекторные Т-лимфоциты	CD45+CD3+CD8+/CD4+CD44-CD62L-
Т-лимфоциты	(CD45+ CD3+ CD8- CD4+) CD62L+ CD25++



Отбор субпопуляций клеток по наличию специфических маркеров на клеточной мембране. Выполнено с привлечением ФГУП «НИИ ГЭПЧ» ФМБА России на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США) и панели антител Biolegend, США

Изучение клеточного иммунного ответа (стимуляция спленоцитов)



<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809819-6.00008-3>

Группы	N-белок	Инакт. вирус SARS-CoV-2
29-й день		
PBS	-	-
N-белок	-	-
Плацебо	-	-
Вакцина	↑ IFN γ IL-4 IL-6 IL-10 L-17	↑ IL-4
44-й день		
PBS	-	-
N-белок	-	-
Плацебо	-	-
Вакцина	↑ IFN γ IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 IL-17	↑ IFN γ IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 IL-17
162-й день		
PBS	-	-
N-белок	-	-
Плацебо	-	-
Вакцина	↑ IL-2 IL-6 IL-5	↑ IL-2 IL-6 IL-5

Выполнено с привлечением ФГУП «НИИ ГЭПЧ» ФМБА России на мультиплексном анализаторе BioPlex 200 (BioRad, США) и набора Milliplex MAP Mouse High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel (Merck/Millipore MHSTCMAG-70K)

Результаты оценки общетоксических свойств

Параметр	Мыши	Хомяки	Кролики
Общее состояние	норма	норма	норма
Открытое поле	норма	nd	nd
Офтальмоскопия	nd	nd	норма
Масса тела	норма	норма	норма
ЭКГ, ЧСС, АД	nd	nd	норма
Гематология	норма	норма	норма
Биохимия крови	норма	норма	норма
Массовые коэффициенты органов	норма	норма	норма
Гистологический анализ тканей	норма	норма	норма
Макроскопия места введения	норма	норма	норма
Микроскопия места введения	Воспаление*	Воспаление*	Воспаление*

- Соответствует профилю безопасности известных эмульсионных адъювантов и связано с их прямым механизмом действия Segal L. et al. Non-clinical safety and biodistribution of AS03-adjuvanted inactivated pandemic influenza vaccines //Journal of Applied Toxicology. – 2015. – Т. 35. – №. 12. – С. 1564-1576.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

www.doclinika.ru

info@doclinika.ru

*188663, Ленинградская область ,
Всеволожский район, гп Кузьмоловский,
ул. Заводская, д. 3, к. 245*

