Соломадин Максим Валерьевичтің
8D07201 – «Фармацевтикалық өндіріс технологиясы» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін ұсынған «Бакуловирустық технология негізінде COVID-19-ға қарсы вакцина жасау үшін рекомбинанттық ақуыз алу және оны бағалау» тақырыбындағы орындалған диссертациялық жұмысының

АННОТАЦИЯСЫ

Зерттеу тақырыбының өзектілігі

2019 жылдың желтоқсанында жаңа SARS-CoV-2 коронавирусы тудырған COVID-19 пандемиясы жаһандық сипат алды, бұл қауіпсіз және тиімді вакциналарды әзірлеу қажеттілігін туғызды. Пандемия жарияланған сәттен бастап вакциналар өндірудің түрлі технологиялық тәсілдері, оның ішінде рекомбинанттық вирустық векторлар мен рекомбинанттық ақуыздар негізіндегі вакциналар әзірленді. Атап айтқанда, бакуловирустық жүйені пайдалану векторларды тиімді клондауға және рекомбинанттық ақуыздар өндіруге мүмкіндік береді, бұл оны SARS-CoV-2-ні қоса алғанда, патогендердің кең спектріне қарсы вакциналар әзірлеу үшін қолайлы етеді.

Бакуловирустық жүйе жәндік жасушаларының дақылдарында жоғары тығыздыққа дейін өсу қабілетімен және сүтқоректілер жасушаларында репликацияға қабілетсіздігімен ерекшеленеді, бұл оның биологиялық қауіпсіздігінің жоғары деңгейін қамтамасыз етеді. Басқа өндірістік технологиялық тәсілдермен салыстырғанда оның елеулі артықшылықтары бар – өндіріс құнының төмендігі және масштабталу мүмкіндігінің жоғарылығы, бұл жаһандық вакцинация бағдарламаларымен байланысты экономикалық жүктемені азайту үшін аса маңызды. Бұл аспектілер бакуловирустық жүйелердің фармацевтикалық өндіріс контексіндегі медициналық қана емес, технологиялық та маңыздылығын көрсетеді.

Қолданыстағы вакциналар тудыратын иммундық жауаптан жалтара алатын вирустың жаңа штамдарының пайда болуын ескере отырып, көптеген штамдарға бейімделген вакциналарды әзірлеу аса маңызды болып отыр. Гуморальдық та, жасушалық та иммундық жауапты индукциялай алатын вакцина жасау үшін бакуловирустық технологияны қолдану фармацевтикалық препараттарды әзірлеудегі перспективалы бағыт болып табылады. Жоғарыда айтылғандарды негізге ала отырып, COVID-19-ға қарсы вакциналардың тәжірибелік үлгілерін әзірлеу үшін бакуловирустық технология негізінде алынған SARS-CoV-2 вирусының рекомбинанттық S және RBD ақуыздары пайдаланылды.

Инфекцияның алдын алуға кешенді тәсілді қамтамасыз ету мақсатында осы жұмыста екі түрлі дәрілік форманы – бұлшықет ішіне және интраназальды енгізуге арналған формаларды – әзірлеу технологиялық стратегиясы таңдалды. Бұлшықет ішіне енгізілетін адъювантты форма тұрақты жүйелік иммунитет қалыптастыруға және аурудың ауыр ағымының алдын алуға бағытталған. Алайда SARS-CoV-2 ең алдымен тыныс жолдарының эпителийін зақымдайды, ал парентеральды енгізу инфекцияны ену сатысында бөгеу үшін шырышты қабықта секреторлық IgA антиденелерін индукциялай алмайды. Бұл интраназальды форманы әзірлеу қажеттілігін туғызды.

Ақуыздық антигендерді интраназальды енгізу үшін қарапайым физика-коллоидтық сұйық формаларды (мысалы, әдеттегі ерітінділер немесе суспензияларды) пайдалану олардың жылдам ферменттік ыдырауына, шырышты қабықта ұстап тұру уақытының қысқалығына (мукоцилиарлық клиренс) және антиген ұсынушы жасушалармен әлсіз қармалуына байланысты тиімділігі төмен. Сондықтан антигенді полимерлі хитозан нанобөлшектеріне инкапсуляциялау туралы технологиялық шешім қабылданды. Басқа жеткізу жүйелерінен айырмашылығы, мұндай нанобөлшектер айқын мукоадгезияға ие, гидрофильді биополимерлі матрицаның есебінен антигеннің бақыланатын босап шығуын қамтамасыз етеді, ал D-маннозамен ковалентті конъюгациялану есебінен макрофагтар мен дендритті жасушалар арқылы белсенді нысаналы эндоцитозды қамтамасыз етіп, иммундық жауапты бірнеше есе күшейтеді.

Осылайша, осы жұмыс аясында екі тәжірибелік вакцинаны дайындаудың технологиялық аспектілері – белсенді фармацевтикалық субстанция алудан бастап дайын дәрілік формаға дейін, фиништік операциялар мен қаптаманы қоса алғанда – ашып көрсетілді. Екі дәрілік форма әзірленді: бұлшықет ішіне енгізуге арналған адъювантты форма және интраназальды ерітінді дайындауға арналған хитозан нанобөлшектері негізіндегі лиофилизат.

Диссертациялық жұмыс Қазақстан Республикасы ғылымын дамытудың басым бағыттары аясында, атап айтқанда ұлттық биологиялық қауіпсіздікті қамтамасыз ету және отандық биотехнологиялық әрі фармацевтикалық салаларды дамыту саласында орындалды. Жеке отандық жоғары технологиялық рекомбинанттық субъединицалық вакциналарды әзірлеу фармацевтикалық саладағы импортты алмастырудың мемлекеттік бағдарламасын іске асырудағы стратегиялық маңызды қадам болып табылады. Бұл ҚР денсаулық сақтау саласының қауіпсіз иммунобиологиялық препараттарға деген қажеттілігін қанағаттандыруға, шетелдік өндірушілерге тәуелділікті азайтуға және халықаралық нарықтарға экспорттау әлеуетін жасауға мүмкіндік береді.

Зерттеу міндеттері Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің гранттық қаржыландыруы аясында (№ AP09259609 және № AP09259192 жобалары) ҚазҰАЗУ Халықаралық вакцинология орталығының базасында орындалды. ҚазҰАЗУ тарапынан өз қаражаты есебінен, оның ішінде NARUVAX-C19/Nano вакцинасының клиникаға дейінгі GLP-зерттеулерін төлеуге елеулі қолдау көрсетілді.

Әзірленген тәжірибелік үлгілердің қауіпсіздігіне клиникаға дейінгі зерттеулер Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің Дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сараптау ұлттық орталығының Сынақ орталығы базасында жүргізілді. Наносомалық дәрілік форманы әзірлеу және физика-химиялық сипаттау, оның ішінде сканерлеуші электрондық микроскопия, бөлшектер мөлшері мен дзета-потенциалды анықтау, сондай-ақ лиофилизация The Ohio State University (АҚШ) базасында орындалды. NARUVAX-C19 вакцинасын әзірлеу нәтижелері Vaxine Pty Ltd компаниясымен (Аделаида қ., Австралия) бірлесіп алынды, оның өкілі осы жұмыстың шетелдік ғылыми консультанты болып табылады.

Зерттеу жұмысының мақсаты: бакуловирустық технологияны пайдалана отырып алынған рекомбинанттық Spike/RBD ақуыздары негізінде COVID-19-ға қарсы екі тәжірибелік вакцинаны дайындау технологиясын белсенді фармацевтикалық субстанция алудан бастап дайын дәрілік формаларға дейін әзірлеу және олардың қауіпсіздігі мен тиімділігін бағалау.

Зерттеу жұмысының міндеттері:

1. GISAID дерекқоры бойынша SARS-CoV-2 геномдық тізбектеріне, оның ішінде Қазақстан Республикасында циркуляциялаған изоляттарға талдау жүргізу және SARS-CoV-2 вирусының иммунодоминантты антигендері (S-ECD, RBD) кірістірілген плазмидаларды конструкциялау;

2. Бакуловирустық векторды конструкциялау, Spike/RBD ақуыздарының экспрессиясын, тазартылуы мен концентрленуін, сондай-ақ сапасын бақылауды (өзіндік ерекшелігі, тазалығы, концентрациясы, стерильділігі және бактериялық эндотоксиндері, иммуноблоттингтегі реактивтілігі) жүргізу;

3. SARS-CoV-2-ге қарсы тәжірибелік вакциналардың екі дәрілік формасын дайындау технологиясын (құрамын негіздеу, алудың технологиялық схемасы, фиништік операциялар және қаптама) әзірлеу: жасушадан тыс домені (ECD) бар рекомбинанттық spike ақуызы (Spike-ақуыз) және наноэмульсиялық майлы адъювант (SWE) негізіндегі бұлшықет ішіне енгізуге арналған субъединицалық вакцина, сондай-ақ хитозан-маннозды нанобөлшектерге инкапсуляцияланған рецептор-байланыстырушы доменді (RBD) қамтитын, интраназальды қолдануға арналған ерітінді дайындауға арналған лиофилизат түріндегі нанобөлшектер негізіндегі форма;

4. Әзірленген бұлшықет ішілік және интраназальды вакциналардың тәжірибелік үлгілерінің сапа көрсеткіштерін (физика-химиялық және технологиялық сипаттамаларын) бағалау, сондай-ақ олардың сақтау кезіндегі тұрақтылығын зерттеу;

5. Әзірленген екі дәрілік форма (тәжірибелік субъединицалық адъювантты бұлшықет ішілік вакцина және интраназальды нановакцина прототипі) құрамындағы алынған рекомбинанттық ақуыздардың қауіпсіздігін, иммуногенділігін және протективті тиімділігін зертханалық жануарлар модельдерінде бағалау, бірлескен зерттеулердің жарияланған нәтижелері бойынша протективті тиімділікке талдау жүргізу.

Зерттеу әдістері. Жұмыста Қазақстан Республикасының аумағында танылған және қолданыстағы нормативтік құжаттардың талаптарына сәйкес биоинформатикалық, молекулалық, статистикалық, физика-химиялық, химиялық, фармакопеялық, технологиялық, микробиологиялық және фармакологиялық әдістер пайдаланылды.

Нысаналы антигендерді конструкциялау биоинформатикалық модельдеу (in silico) және гендік инженерия әдістерімен орындалды; рекомбинанттық ақуыздардың биосинтезі бакуловирустық экспрессия жүйесін пайдалана отырып, ExpiSf9™ жәндік жасушаларының суспензиялық дақылында жүргізілді. Бөліп алу және тазарту Ni-NTA матрицасындағы металл-хелатты аффинді хроматография және гель-фильтрация әдістерімен жүргізілді; сапаны бақылау натрий додецилсульфаты қатысындағы полиакриламид гелінде электрофорез, вестерн-блоттинг, иммуноферменттік талдау, бактериялық эндотоксиндерді анықтау және стерильділікке сынақ әдістерімен жүзеге асырылды. Хитозан-маннозды нанобөлшектер иондық гельтүзілу әдісімен алынып, динамикалық жарық шашырау, дзета-потенциалды анықтау және сканерлеуші электрондық микроскопия әдістерімен сипатталды. Қауіпсіздік, иммуногенділік және протективті тиімділік зертханалық жануарлардың, оның ішінде адам емес приматтардың модельдерінде in vivo және in vitro клиникалық емес зерттеулерде зерттелді.

Әдістердің толық сипаттамасы тиісті жалпы фармакопеялық баптарды көрсете отырып диссертацияның 2.2-тармақшасында келтірілген; статистикалық өңдеу ЕАЭО Фармакопеясының 2.1.10.2 ЖФБ сәйкес $p < 0,05$ маңыздылықтың сыни деңгейінде орындалды.

Зерттеу объектілері: бакуловирустық экспрессия жүйесінде синтезделетін SARS-CoV-2 рекомбинанттық ақуыздары негізінде COVID-19-ға қарсы субъединицалық вакциналық препараттарды алудың технологиялық процесі – жәндік жасушаларының суспензиялық дақылында белсенді фармацевтикалық субстанцияның биосинтезінен бастап бұлшықет ішіне және интраназальды енгізуге арналған дайын дәрілік формаларға дейін. Материалдық алып жүрушілер ретінде SARS-CoV-2 вирусының жасушадан тыс домені бар рекомбинанттық Spike-ақуызы (S-ECD) және рецептор-байланыстырушы домені (RBD), сондай-ақ солардың негізінде алынған тәжірибелік препараттар қызмет етеді: Spike-ақуызы мен наноэмульсиялық майлы адъювант SWE бар бұлшықет ішіне енгізуге арналған NARUVAX-C19 субъединицалық вакцинасы және рецептор-байланыстырушы домені маннозамен конъюгацияланған хитозан нанобөлшегіне жабық интраназальды енгізуге арналған NARUVAX-C19/Nano нановакцинасы.

Зерттеу пәні: бакуловирустық технология негізінде рекомбинанттық Spike/RBD ақуыздарын алу тәсілі; жасушадан тыс домені (ECD) бар рекомбинанттық Spike ақуызы (Spike-ақуыз) және наноэмульсиялық майлы адъювант (SWE) негізіндегі бұлшықет ішіне енгізуге арналған SARS-CoV-2-ге қарсы NARUVAX-C19 тәжірибелік субъединицалық вакцинасын алу технологиясы мен сапа көрсеткіштері; рецептор-байланыстырушы домені (RBD) маннозамен конъюгацияланған хитозан нанобөлшегіне жабық, интраназальды енгізуге арналған SARS-CoV-2-ге қарсы NARUVAX-C19/Nano тәжірибелік нановакцинасын алу технологиясы мен сапа көрсеткіштері; субъединицалық адъювантты бұлшықет ішілік және субъединицалық интраназальды нановакцина құрамындағы алынған рекомбинанттық ақуыздардың қауіпсіздігі, иммуногенділігі, протективті тиімділігі және тұрақтылығы зертханалық жануарлардың, оның ішінде адам емес приматтардың модельдерінде.

Қорғауға шығарылатын мәселелер:

1. ExpiSf9™ суспензиялық жасуша желісі базасындағы пысықталған бакуловирустық экспрессия моделі SARS-CoV-2 конформациялық тұрақты және функционалдық белсенді рекомбинанттық антигендерінің (Spike S-ECD және RBD) жоғары тиімді биосинтезін қамтамасыз етеді. Алынған нысаналы ақуыздардың физика-химиялық және биологиялық қасиеттері қауіпсіз иммуногенді бұлшықет ішілік және интраназальды вакциналарды конструкциялауға арналған белсенді фармацевтикалық субстанцияларға қойылатын фармакопеялық талаптарға жауап береді.

2. ExpiSf9™ жасуша желісін өсірудің ғылыми негізделген технологиялық параметрлері (жұқтыру еселігі MOI = 5, жұқтыру сәтіндегі жасуша тығыздығы 6,5–7,0 × 10^6 жасуша/мл, температура 27 °C, экспрессия уақыты 72 сағ) екі сатылы тазарту схемасымен (Ni-NTA матрицасындағы металл-хелатты аффинді хроматография және гель-фильтрация) үйлесімде SARS-CoV-2 нысаналы рекомбинанттық антигендерінің ең жоғары шығымын (S-ECD үшін 1,5–2,0 мг/л және RBD үшін 2,0–2,4 мг/л) жоғары тазарту дәрежесіне (95 %-дан жоғары) және биологиялық қауіпсіздікке – бактериялық эндотоксиндер мөлшері ақуыздың 1,0 ЭБ/мкг-нан аспайды, іс жүзінде S-ECD үшін 0,2 ЭБ/мкг және RBD үшін 0,15 ЭБ/мкг алынды – қол жеткізе отырып, биологиялық белсенділігін сақтай отырып қамтамасыз етеді.

3. NARUVAX-C19 және NARUVAX-C19/Nano тәжірибелік вакциналарының жүргізілген клиникаға дейінгі зерттеулерде анықталған қауіпсіздік және ареактогенділік профилі. GLP жағдайындағы кешенді клиникаға дейінгі зерттеулер әзірленген препараттардың салыстырмалы түрде зиянсыз заттар класына жататынын растайды. Вакциналар емдік дозадан 10 есе асатын дозада енгізілгенде жедел және субсозылмалы уыттылыққа ие емес, жергілікті тітіркендіргіш және аллергизациялаушы әсерден ада.

4. ExpiSf9™ суспензиялық дақылы негізіндегі пысықталған биотехнологиялық платформа SARS-CoV-2 конформациялық тұрақты S-ECD антигенінің тұрақты жоғары шығымын (1,5–2,0 мг/л) және хроматографиялық тазалығын (95 %-дан жоғары) қамтамасыз етеді. Антигенмен 50:50 көлемдік қатынастағы Sepivac SWE наноэмульсиялық адъювантын пайдалануға негізделген NARUVAX-C19 инъекциялық дәрілік формасының ұтымды дизайны «май суда» типті эмульсияны сақтау кезінде фазалық бөлінудің болмауын және айқын жүйелік Th1/Th2-жасушалық әрі гуморальдық иммундық жауаптың қалыптасуын қамтамасыз етеді.

5. Хитозан-маннозды нанобөлшектердің иондық гельтүзілуі арқылы NARUVAX-C19/Nano нановакцинасында жүзеге асырылған антигенді нысаналы мукозальды жеткізу технологиясы. Бұл полимерлі наножүйе оңтайлы физика-химиялық параметрлермен сипатталады (гидродинамикалық мөлшері ~290 нм, ζ-потенциалы ~+30 мВ, RBD инкапсуляциясының тиімділігі 66,8 %). Осы платформаны пайдалану мукоадгезияны, антигенді ферменттік ыдыраудан қорғауды және оның тыныс жолдарының шырышты қабығындағы антиген ұсынушы жасушалармен нысаналы қармалуын қамтамасыз ете отырып, айқын секреторлық IgA-жауапты индукциялайды.

6. Әзірленген вакциналық препараттар өндірісін стандарттау мен масштабтаудың ғылыми-технологиялық негіздемесі. RBD субстанциясының үш тәжірибелік партиясына жүргізілген алдын ала валидация сапаның сыни параметрлерінің (QbD) қайталанымдылығын растайды; S-ECD субстанциясы үшін жұмыс аясында алдын ала валидациялық сериялар орындалмады. Лиофилизацияланған және инъекциялық формалардың сақтау кезіндегі физика-химиялық және биологиялық тұрақтылығының анықталған көрсеткіштері нормативтік құжаттаманы бекітуге дәлелдемелік база қалыптастырады және NARUVAX-C19 әрі NARUVAX-C19/Nano вакцина-кандидаттарының I фаза клиникалық зерттеулеріне көшу мәселесін қарастыруға негіз болады.

Жұмыстың ғылыми жаңалығы. Жұмыстың технологиялық негізі – бакуловирустық экспрессия жүйесі, металл-хелатты аффинді хроматография, гель-фильтрация және хитозан нанобөлшектерін алудың иондық гельтүзілу әдісі – техника деңгейіне жатады және жаңалыққа үміткер емес. Осы жұмыстың жаңалығы – аталған негіз Қазақстан Республикасы

жағдайында екі дәрілік форма үшін аяқталған технологиялық шешімге алғаш рет жеткізілген параметрлердің нақты үйлесімі мен сандық мәндерінде:

1. ExpiSf9™ экспрессия жүйесі үшін SARS-CoV-2 конформациялық тұрақты S-ECD және RBD антигендерінің биосинтезіндегі сыни параметрлердің жұмыс диапазоны анықталып, сандық тұрғыда негізделді: жұқтыру еселігі MOI = 5, жұқтыру сәтіндегі жасуша тығыздығы 6,5–7,0 × 10^6 жасуша/мл, температура 27 °C және 72 сағ өткеннен кейін жинау кезінде S-ECD үшін 1,5–2,0 мг/л және RBD үшін 2,0–2,4 мг/л шығымға 95 %-дан жоғары тазалықта қол жеткізіледі. MOI мәнін 3-ке дейін төмендету шығымды 0,8–1,2 мг/л-ге дейін азайтады, 7-ге дейін арттыру тазалықтың 90–93 %-ға дейін төмендеуі кезінде 1,0–1,4 мг/л-ге дейін азайтады.

2. Ni-NTA матрицасындағы металл-хелатты аффинді хроматографияны және гель-фильтрацияны қамтитын масштабталатын екі сатылы бөліп алу және тазарту (Downstream) схемасы әзірленіп, алдын ала валидациядан өткізілді. Бұл технологиялық тәсіл фармакопеялық талаптарды қанағаттандыратын белсенді фармацевтикалық субстанцияның жоғары тазалық дәрежесіне (95 %-дан жоғары) және биологиялық қауіпсіздігіне (бактериялық эндотоксиндер мөлшері ақуыздың 1,0 ЭБ/мкг-нан аспайды) қол жеткізуге мүмкіндік берді.

3. Иммуностимуляциялаушы компонент ретінде «май суда» эмульсия типті Sepivac SWE наноэмульсиялық майлы адъюванты пайдаланылған COVID-19-ға қарсы NARUVAX-C19 тәжірибелік субъединицалық вакцинасы ұсынылып, кеміргіштер мен резус макакаларының зертханалық модельдерінде зерттелді.

4. NARUVAX-C19 тәжірибелік вакцинасының резус макакалары үшін қауіпсіздігі мен иммуногенділігі көрсетілді: екі апта аралықпен екі бұлшықет ішілік доза енгізу тұрақты кең бейтараптандырушы гуморальдық және Т-жасушалық IFN-γ жауабына әкелді.

5. Хитозан-маннозды нанобөлшектер негізінде COVID-19-ға қарсы интраназальды енгізу тәсілі бар нановакцина прототипі алғаш рет әзірленді.

6. Маннозамен конъюгацияланған хитозаннан жасалған нанобөлшектерге жүктелген рекомбинанттық мономерлі RBD ақуызы негізіндегі тәжірибелік вакцина (NARUVAX-C19/Nano) 21 күн аралықпен екі рет интраназальды иммундау кезінде тышқандарда антигенге өзіндік ерекшелігі бар IgA-антиденелердің және Th1-жасушалық иммундық жауаптың қалыптасуын, сондай-ақ сириялық хомяктар моделінде SARS-CoV-2 вирусының бастапқы штамымен (D614G желісі) жұқтырудан қорғауды қамтамасыз ететіні анықталды. Осы зерттеуде NARUVAX-C19/Nano тәжірибелік формасының тиімділігі қан сарысуында анықталатын анти-RBD IgG (оның ішінде IgG1 және IgG2a ішкі кластары), сондай-ақ RBD–ACE2 өзара әрекеттесуін бөгейтін антиденелер мен вирус бейтараптандырушы антиденелер болмаған жағдайда қол жеткізілгені алғаш рет анықталды.

7. Әзірленген тәжірибелік вакцина үлгілерінің қауіпсіздігіне клиникаға дейінгі зерттеулер ҚР ДСМ Дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сараптау ұлттық орталығының (ДДМБСҰО) Сынақ орталығы базасында жүргізілді. Екі тәжірибелік вакцинаның да организмге уытты әсер етпейтіні, жақсы төзімділікке ие екені және зертханалық жануарларда, оның ішінде жүкті даралардағы сынақтарда аллергизациялаушы әсер көрсетпейтіні анықталды. Қауіпсіздікке клиникаға дейінгі зерттеулердің (GLP стандарттарына сәйкестік жағдайында жүргізілген) сәтті нәтижелері негізінде тәжірибелік үлгілер NARUVAX-C19 және NARUVAX-C19/Nano вакцина-кандидаттары мәртебесін алды; ДДМБСҰО қорытындысы бойынша препараттар әзірлеудің келесі кезеңіне көшу үшін қауіпсіздік талаптарына сәйкес деп танылды.

ГОСТ Р 15.011-96 талаптарына сәйкес Google Patents халықаралық патенттік дерекқоры бойынша 2014 жылдан бергі іздеу тереңдігімен (ХПЖ A61K 39/215 және C12N 15/866 айдарлары) жүргізілген патенттік зерттеулер маннозамен конъюгацияланған хитозан нанобөлшектеріне инкапсуляцияланған SARS-CoV-2 рецептор-байланыстырушы домені негізіндегі интраназальды дәрілік форманы сипаттайтын белгілер жиынтығының мәлімделген үйлесімде талданған патенттік құжаттарда анықталмағанын көрсетті.

Алынған нәтижелердің практикалық маңызы

COVID-19-ға қарсы тәжірибелік вакциналардың екі жаңа дәрілік формасы, сондай-ақ басқа вирустық инфекцияларға да әлеуетті қолданылатын платформалық тәсіл әзірленді: бұлшықет ішіне енгізуге арналған адъювантты форма және интраназальды ерітінді дайындауға арналған лиофилизат түріндегі нанобөлшектер негізіндегі форма.

Жасушадан тыс домені (ECD) бар рекомбинанттық Spike ақуызы (Spike-ақуыз) және наноэмульсиялық майлы адъювант (SWE) негізіндегі COVID-19-ға қарсы NARUVAX-C19 тәжірибелік субъединицалық вакцинасын, бұлшықет ішіне енгізуге арналған ерітіндіні, 0,5 мл/доза жасау үшін бакуловирустық технология негізінде рекомбинанттық Spike ақуызын алу технологиясы әзірленіп, енгізілді. Зертханалық регламент әзірленіп, енгізілді.

Маннозамен конъюгацияланған хитозан нанобөлшегіне жабық рецептор-байланыстырушы доменді (RBD) қамтитын COVID-19-ға қарсы NARUVAX-C19/Nano тәжірибелік нановакцинасы, интраназальды енгізуге арналған ерітінді дайындауға арналған лиофилизат, 0,5 мл/доза үшін бакуловирустық технология негізінде рекомбинанттық RBD ақуызын алу технологиясы әзірленіп, енгізілді. Зертханалық регламент әзірленіп, енгізілді.

COVID-19-ға қарсы NARUVAX-C19 тәжірибелік субъединицалық вакцинасына, бұлшықет ішіне енгізуге арналған ерітіндіге, 0,5 мл/доза және COVID-19-ға қарсы NARUVAX-C19/Nano тәжірибелік нановакцинасына, интраназальды енгізуге арналған ерітінді дайындауға арналған лиофилизатқа, 0,5 мл/доза нормативтік құжаттардың (НҚ) жобалары әзірленіп, стандарттау жүргізілді; екі дәрілік форма үшін де сақтау шарттары мен мерзімдері анықталды.

ҚазҰАЗУ Халықаралық вакцинология орталығының базасында (Қазақстан Республикасы, Алматы қ.) екі тәжірибелік вакцинаның да тәжірибелік партияларын шығару ұйымдастырылды.

Докторанттың жеке үлесі:

Диссертант SARS-CoV-2 S және RBD ақуыздарының гендерін бакуловирустық жүйеге енгізуге арналған рекомбинанттық векторды конструкциялады. Бұл кезең промоторды таңдауды, нысаналы полипептидті секреторлық жолға бағыттау үшін мелиттин сигналдық пептидін қолдануды, сондай-ақ продуцент жасушаларында ақуыздың фолдингін оңтайландыратын реттеуші тізбектерді интеграциялауды қамтыды.

Диссертант бакуловирустық жүйеде ақуыз экспрессиясын жүргізді. Жұмыс мыналарды қамтыды: E. coli компетентті жасушаларында рекомбинанттық бакмида алу; вирустық стоктың титрін анықтау; продуцент жасушаларын трансфекциялау және ферментация параметрлерін кешенді түрде іріктеу.

Диссертанттың үлесі плазмидалық конструкциялардың дизайнын әзірлеуде, жасушалық биомассаны жинақтаудың және рекомбинанттық ақуыздарды тазартудың толық технологиялық циклін жүргізуде. Ізденуші алынған препараттардың сақтау кезіндегі тұрақтылық параметрлерін анықтау бойынша зерттеулерді жеке өзі жүргізді, сондай-ақ тәжірибелік вакциналардың екі дәрілік формасын алуға НҚ және зертханалық регламенттердің жобаларын әзірледі. Технологиялық бөлікпен қатар диссертант әзірленген дәрілік формалардың қауіпсіздігі мен өзіндік ерекшелігі бар биологиялық белсенділігін растаған клиникаға дейінгі зерттеулердің деректерін талдауға тікелей қатысты.

Жұмыстың жекелеген кезеңдері серіктес ұйымдардың қатысуымен орындалды. Хитозан-маннозды нанобөлшектерді физика-химиялық сипаттау, сканерлеуші электрондық микроскопия және лиофилизация режимін пысықтау The Ohio State University (АҚШ) базасында орындалды; диссертант міндет қоюға және алынған деректерді интерпретациялауға қатысты. Кеміргіштердегі қауіпсіздікке клиникаға дейінгі зерттеулерді ҚР ДСМ ДДМБСҰО Сынақ орталығы GLP жағдайында жүргізді; диссертант зерттеу бағдарламаларын жасауға және есептердің бастапқы деректерін талдауға қатысты. NARUVAX-C19 вакцинасының резус макакаларындағы қауіпсіздігі мен иммуногенділігіне клиникаға дейінгі зерттеуді «Медициналық приматология ғылыми-зерттеу институты» ФМБҒМ орындады; диссертант антигенді жинақтау мен сапасын бақылауды қамтамасыз

етті, есептің бастапқы деректерін талдауға қатысты және осы зерттеу нәтижелері бойынша дайындалған жарияланымның бірінші авторы болып табылады. Тышқандар мен сириялық хомяктар модельдеріндегі иммуногенділік пен протективтілік зерттеулері ҚазҰАЗУ Халықаралық вакцинология орталығының базасында Vaxine Pty Ltd (Австралия) компаниясымен бірлесіп орындалды; диссертант антигендерді жинақтау мен сапасын бақылауды қамтамасыз етті.

Қорытындылар:

1. Биоинформатикалық модельдеу (in silico) және гендік инженерия әдістерімен ExpiSf9™ жәндік жасушаларының суспензиялық дақылында SARS-CoV-2 вирусының рекомбинанттық ақуыздары конструкцияланып, жинақталды: инъекциялық форма үшін фуринмен ыдырату сайты жойылған S-ақуыздың толық өлшемді жасушадан тыс домені (S-ECD), интраназальды форма үшін Omicron BA.5 вариантының мутацияларын қамтитын рецептор-байланыстырушы домен (RBD). Әзірленген биотехнологиялық процесс (Upstream және Downstream) жұқтыру еселігі MOI = 5, 27 °C изотермиялық өсіру режимі және жұқтырудан кейін 72 сағаттан соң дақылдық сұйықтықты жинау кезінде натрий додецилсульфаты қатысындағы полиакриламид гелінде электрофорез деректері бойынша 95 %-дан жоғары хроматографиялық тазалық дәрежесінде S-ECD үшін 1,5–2,0 мг/л және RBD үшін 2,0–2,4 мг/л дақылдық сұйықтық шығымына қол жеткізуге мүмкіндік берді. Алынған ақуыздардың физика-химиялық және биологиялық қасиеттері, оның ішінде бактериялық эндотоксиндер мөлшері S-ECD үшін ақуыздың 0,2 ЭБ/мкг және RBD үшін 0,15 ЭБ/мкг болуы (1,0 ЭБ/мкг-дан аспау нормасы кезінде), белсенді фармацевтикалық субстанцияларға қойылатын талаптарға сәйкес келеді.

2. Технологиялық процестің қайталанымдылығы RBD субстанциясының үш дәйекті тәжірибелік сериясында расталды; S-ECD субстанциясы үшін осы жұмыс аясында алдын ала валидациялық сериялар орындалмады, қайталанымдылық туралы тұжырым оған процестің ортақ сатылары бөлігінде таралады және масштабтау кезеңінде эксперименттік растауды талап етеді. Процестің сыни параметрлерін (MOI = 5, температуралық профиль, хроматографиялық тазарту параметрлері) белгілейтін зертханалық регламенттер бекітілді. Технологияны пилоттық суспензиялық биореакторлар жағдайына дұрыс трансфер ету үшін ауысудың есептік параметрлері анықталды: оттегінің массаберілу коэффициенті (kLa) 5–10 сағ$^{-1}$ диапазонында, еріген оттегі деңгейі ауа қанығуының 40 %-ынан төмен емес, араластырудың үлестік қуатын (P/V) шектеу және жасуша мембраналарының протекторлары ретінде қоректік орта құрамына полоксамерлерді енгізу. Технологиялық процесс «кіріктірілген сапа» (Quality by Design) қағидаттарына және Тиісті өндірістік практика қағидаларының талаптарына сәйкес әзірленді.

3. Алынған субстанциялар негізінде екі дәрілік форманы алудың құрамдары мен технологиялары әзірленді. Бұлшықет ішіне енгізуге арналған NARUVAX-C19 вакцинасы жасалды – рекомбинанттық ақуыздың Sepivac SWE наноэмульсиялық майлы адъювантымен кинетикалық тұрақты композициясы, ол зерттелген сақтау жағдайларында физикалық тұрақтылығын сақтады. Интраназальды (мукозальды) қолдануға арналған NARUVAX-C19/Nano нановакцинасының прототипі әзірленді, оның технологиясы иондық гельтүзілу әдісіне негізделген: антигенді D-маннозамен модификацияланған катиондық хитозан нанобөлшектеріне инкапсуляциялау орташа гидродинамикалық мөлшері 290 нм, оң дзета-потенциалы жоғары (+30 мВ) және ақуыз қосылуының тиімділігі шамамен 66,8 % болатын коллоидтық жүйе алуға мүмкіндік берді, бұл әдеби деректер бойынша антигенді ыдыраудан қорғауға ықпал етеді және манноза қалдықтарының манноза рецепторларымен өзара әрекеттесуі есебінен оның антиген ұсынушы жасушаларға нысаналы жеткізілуін әлеуетті түрде қамтамасыз етеді.

4. Аккредиттелген GLP-зертхана (ҚР ДСМ ДДМБСҰО) жағдайында қауіпсіздікке клиникаға дейінгі зерттеулер кешені жүргізілді, ол екі дәрілік форманың да салыстырмалы түрде зиянсыз заттар класына (VI уыттылық класы) жататынын көрсетті. Препараттарды кеміргіштерге емдік дозадан 10 есе асатын дозада енгізгенде жедел және субсозылмалы

уыттылық белгілері анықталмады; вакциналар жергілікті тітіркендіргіш және аллергизациялаушы әсерге ие емес. Жүкті аналықтарға енгізгенде ұрықтың даму ақаулары тіркелмеді; гистологиялық зерттеуде анықталған эмбриондық тіндердегі қан айналымы бұзылыстары мен некроздың жекелеген микрофокустары екі дәрілік форма үшін де, оның ішінде сквaленді адъюванты жоқ форма үшін де байқалды, ал олардың вакциналық препараттардың немесе ілеспе рәсімдердің әсерімен себептік байланысы қолданылған дизайнмен анықталмады. Репродуктивтік уыттылықты тиісті салыстыру топтарымен II сегмент көлемінде бағалау клиникаға дейінгі әзірлеудің дербес кезеңіне жатқызылды.

5. NARUVAX-C19 бұлшықет ішілік вакцинасының өзіндік ерекшелігі бар иммуногенділігі және протективті тиімділігі анықталды. Тышқандар (BALB/c), сириялық хомяктар және резус макакалары модельдеріндегі зерттеулер екі рет иммундау анти-S IgG және Wuhan әрі Delta желілерінің штамдарына вирус бейтараптандырушы антиденелердің қалыптасуымен жүйелік гуморальдық жауапты, сондай-ақ теңгерімді Th1/Th2-жасушалық жауапты индукциялайтынын көрсетті. Адам емес приматтарда тірі патогенмен жұқтыру кезіндегі өкпедегі патологиялық өзгерістердің айқындығы плацебо тобымен салыстырғанда төмендеді. Генетикалық алшақ штамдарға қатысты кросс-бейтараптандырушы әсер вакцинаның айқаспалы бейтараптандырушы антиденелерді индукциялау қабілетін көрсетеді.

6. Хитозан-маннозды нанобөлшектерге инкапсуляцияланған рекомбинанттық RBD ақуызы негізінде COVID-19-ға қарсы интраназальды нановакцинаның прототипі алғаш рет әзірленіп, зерттелді. Препаратты тышқандар мен сириялық хомяктарға екі рет интраназальды енгізу тыныс жолдарында антигенге өзіндік ерекшелігі бар секреторлық IgA индукциясына және Th1-поляризациясы бар жасушалық иммундық жауаптың (IFN-γ, IL-2 және TNF-α синтезі) қалыптасуына әкелетіні анықталды. RBD-ақуызын хитозан-маннозды нанобөлшектер құрамында жеткізу иммундалған жануарларды SARS-CoV-2 штамымен жұқтыру кезінде өкпе патологиясының дамуынан қорғайтыны көрсетілді, бұл ретте қорғаныш әсеріне қан сарысуында анықталатын анти-RBD IgG болмаған жағдайда қол жеткізіледі. Сонымен қатар интраназальды форманың вирустың байланыстағы жануарларға берілуін болдырмайтыны анықталды; мукозальды енгізу жолын оқшау қолдану кезінде стерилизациялаушы иммунитеттің қалыптасуына жүргізілген эксперименттерде қол жеткізілген жоқ.

7. Екі дәрілік форманың фармацевтикалық әзірлемесі мен стандартталуы жүзеге асырылды: инъекциялық (NARUVAX-C19) және интраназальды (NARUVAX-C19/Nano) вакциналар үшін аралық және дайын өнімге нормативтік құжаттардың жобалары мен сапаны бақылау спецификациялары әзірленді, лиофилизацияланған наноформаны тұрақтандыру шарттары мен адъювантты форманы алу параметрлері негізделді. Тұрақтылық зерттеулерінің нәтижелері бойынша сақтау шарттары мен мерзімдері анықталды: NARUVAX-C19 үшін – мұздатпай 2-ден 8 °C-қа дейінгі температурада, алдын ала жарамдылық мерзімі 12 ай, ол ICH Q1A(R2) және ICH Q5C сәйкес үш серияда тұрақтылық зерттеуінде расталуға тиіс; NARUVAX-C19/Nano лиофилизаты үшін алдын ала деректер бойынша – минус 17-ден минус 30 °C-қа дейінгі температурада кемінде 12 ай және 2-ден 8 °C-қа дейінгі температурада кемінде 6 ай. ҚазҰАЗУ Халықаралық вакцинология орталығының базасында (Қазақстан Республикасы, Алматы қ.) клиникаға дейінгі сынақтар үшін екі вакцина-кандидаттың тәжірибелік партияларын шығару ұйымдастырылды.

Осылайша, диссертациялық жұмыстың алға қойылған мақсатына қол жеткізілді. Зертханалық жануарлардағы клиникаға дейінгі зерттеулер жағдайында анықталған екі дәрілік форманың да қауіпсіздігі, иммуногенділігі және протективті тиімділігі туралы алынған деректер NARUVAX-C19 және NARUVAX-C19/Nano вакцина-кандидаттарының I фаза клиникалық зерттеулеріне көшу мәселесін қарастыруға негіз болады.

Диссертация нәтижелерінің апробациядан өтуі

Диссертациялық жұмыстың негізгі мәселелері, нәтижелері мен қорытындылары мынадай халықаралық ғылыми форумдар мен конференцияларда ұсынылып, баяндалды және оң баға алды:

– 16-шы Халықаралық вакциналық конгресс (16th Vaccine Congress, 2022 жылғы 12–14 қыркүйек, Рива-дель-Гарда, Италия) – NARUVAX-C19 вакцинасын халықаралық серіктестермен (Vaxine Pty Ltd, Австралия; The Ohio State University, АҚШ) бірлесіп әзірлеу нәтижелерін ұсынған постерлік баяндама түрінде;

– ҚР ДСМ Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институтының (БҚПҒЗИ) 65 жылдығына арналған «Биотехнология және биологиялық қауіпсіздік: жетістіктер мен даму перспективалары» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясы (2023 жылғы 6–8 қыркүйек, Алматы қ., Қазақстан Республикасы) – «COVID-19-ға қарсы интраназальды субъединицалық нановакцинаның иммуногенділігі мен протективті тиімділігін зертханалық модельдерде бағалау» тақырыбындағы материалдарды жариялаумен.

Жарияланымдар. Зерттеу нәтижелері бойынша 5 ғылыми еңбек жарияланған, оның ішінде Web of Science және Scopus базаларында индекстелетін халықаралық рецензияланатын ғылыми журналдарда 3 мақала және халықаралық ғылыми-практикалық конференциялардың материалдарында 2 баяндама тезисі:

– Human Vaccines & Immunotherapeutics журналында 1 мақала (WoS-Q1, IF-4.8, Scopus-68 %);

– Scientific Reports журналында 1 мақала (WoS-Q2, IF-4.6, Scopus-92 %);

– Microorganisms журналында 1 мақала (WoS-Q2, IF-4.9, Scopus-65 %).

Докторанттың әрбір жарияланымды дайындауға қосқан үлесі. Human Vaccines & Immunotherapeutics журналындағы мақалада (Solomadin M. et al., 2023, Т. 19, № 2, 2258571) докторант бірінші автор болып табылады – ол плазмидалық конструкциялардың дизайнын әзірлеуді, жасушалық биомассаны жинақтаудың және S-ECD рекомбинанттық ақуызын тазартудың толық технологиялық циклін, клиникаға дейінгі зерттеулердің деректерін талдауға қатысуды және қолжазба мәтінін дайындауды орындады. Scientific Reports журналындағы мақалада (Tabynov K., Solomadin M., Turebekov N. et al., 2023, Т. 13, № 1, 12115) докторант екінші автор болып табылады – ол RBD рекомбинанттық ақуызын алуды және сапасын бақылауды, нәтижелерді талдауға және қолжазбаны дайындауға қатысуды орындады. Microorganisms журналындағы мақалада докторант нәтижелерді талдауды және қолжазбаны дайындауды орындады. 2 баяндама тезисін докторант рекомбинанттық ақуыздарды алу және дәрілік формаларды әзірлеу технологиялық нәтижелері бөлігінде дайындады.

Диссертация құрылымы және көлемі:

Диссертациялық жұмыс компьютермен терілген мәтіннің 196 бетінде баяндалған, 54 кесте, 52 сурет, отандық және шетелдік әдебиеттің 98 дереккөзі, сондай-ақ 6 қосымшадан тұрады. Құрылымы мыналарды қамтиды: нормативтік сілтемелер мен қысқартулар тізімі, кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, эксперименттік бөлімнің төрт бөлімі (3, 4, 5 және 6-тараулар), бөлімдер бойынша қорытындылар және түйін.

А және Б қосымшаларында NARUVAX-C19 және NARUVAX-C19/Nano тәжірибелік вакциналарына нормативтік құжаттардың жобалары, В және Г қосымшаларында Spike және RBD рекомбинанттық ақуыздарын алуға және бағалауға арналған зертханалық регламенттер, Д қосымшасында ғылыми-зерттеу жұмысы туралы есеп, Е қосымшасында постерлік баяндаманың көшірмесі келтірілген.