АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему «Получение и оценка рекомбинантного белка на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D07201 – «Технология фармацевтического производства»

Соломадина Максима Валерьевича

Актуальность темы исследования. В декабре 2019 года пандемия COVID-19, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, приобрела глобальный характер, что обусловило необходимость разработки безопасных и эффективных вакцин. С момента объявления пандемии были разработаны различные технологические подходы для производства вакцин, включая рекомбинантные вирусные векторы и вакцины на основе рекомбинантных белков. В частности, использование бакуловирусной системы позволяет эффективно клонировать векторы и производить рекомбинантные белки, что делает её идеальной для разработки вакцин против широкого спектра патогенов, включая SARS-CoV-2.

Бакуловирусная система выделяется способностью к росту до высокой плотности в культурах клеток насекомых и неспособностью к репликации в клетках млекопитающих, что обеспечивает высокий уровень её биологической безопасности. В сравнении с другими производственными технологическими подходами она обладает значительными преимуществами – низкой стоимостью производства и высокой масштабируемостью, что особенно важно для снижения экономической нагрузки, связанной с глобальными вакцинационными программами. Эти аспекты подчёркивают не только медицинскую, но и технологическую значимость бакуловирусных систем в контексте фармацевтического производства.

С учётом появления новых штаммов вируса, способных уклоняться от иммунного ответа, вызванного существующими вакцинами, разработка адаптированных под множество штаммов вакцин становится критически важной. Применение бакуловирусной технологии для создания вакцины, способной индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, представляет собой перспективное направление в разработке фармацевтических препаратов. Исходя из вышеизложенного, для разработки экспериментальных образцов вакцин против COVID-19 использовались рекомбинантные белки S и RBD вируса SARS-CoV-2, полученные на основе бакуловирусной технологии.

Для обеспечения комплексного подхода к профилактике инфекции в настоящей работе была выбрана технологическая стратегия разработки двух различных лекарственных форм: для внутримышечного и для интраназального введения. Внутримышечная адъювантная форма направлена на формирование стойкого системного иммунитета и профилактику тяжёлого течения болезни. Однако SARS-CoV-2 первично инфицирует эпителий дыхательных путей, и парентеральное введение не способно индуцировать секреторные IgA антитела на слизистой оболочке для блокирования инфекции на этапе проникновения. Это обусловило необходимость разработки интраназальной формы.

Использование простых физико-коллоидных жидких форм (например, обычных растворов или суспензий) для интраназального введения белковых антигенов малоэффективно из-за их быстрой ферментативной деградации, короткого времени удержания на слизистой (мукоцилиарный клиренс) и слабого захвата антигенпрезентирующими клетками. Поэтому было принято технологическое решение: инкапсулировать антиген в полимерные хитозановые наночастицы. В отличие от других систем доставки, такие наночастицы обладают выраженной мукоадгезией, за счёт гидрофильной биополимерной матрицы обеспечивают контролируемое высвобождение антигена, а за счёт ковалентной конъюгации с D-маннозой – активный таргетный эндоцитоз макрофагами и дендритными клетками, многократно усиливая иммунный ответ.

Таким образом, в рамках настоящей работы раскрыты технологические аспекты приготовления двух экспериментальных вакцин – от получения активной фармацевтической субстанции до готовой лекарственной формы, включая финишные операции и упаковку. Разработаны две лекарственные формы: адъювантная для внутримышечного введения и лиофилизат на основе хитозановых наночастиц для приготовления интраназального раствора.

Диссертационная работа выполнена в русле приоритетных направлений развития науки Республики Казахстан, в частности, в области обеспечения национальной биологической безопасности и развития отечественной биотехнологической и фармацевтической отраслей. Разработка собственных высокотехнологичных рекомбинантных субъединичных вакцин является стратегически важным шагом в реализации государственной программы импортозамещения в фармацевтической отрасли. Это позволит удовлетворить потребность здравоохранения РК в безопасных иммунобиологических препаратах, снизить зависимость от зарубежных производителей и создать потенциал для экспорта на международные рынки.

Задачи исследования были реализованы в рамках грантового финансирования Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (проекты № AP09259609 и № AP09259192), выполняемого на базе Международного центра вакцинологии КазНАИУ. Существенная поддержка оказана КазНАИУ за счёт выделения собственных средств, в том числе на оплату доклинических GLP-исследований вакцины NARUVAX-C19/Nano.

Доклинические исследования безопасности разработанных экспериментальных образцов проведены на базе Испытательного центра Национального центра экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Разработка и физико-химическая характеристика наносомальной лекарственной формы, включая сканирующую электронную микроскопию, определение размера частиц и дзета-потенциала, а также лиофилизацию, выполнены на базе The Ohio State University (США). Результаты разработки вакцины NARUVAX-C19 получены совместно с компанией Vaxine Pty Ltd (г. Аделаида, Австралия), представитель которой выступает зарубежным научным консультантом настоящей работы.

Цель диссертационного исследования: разработка технологии приготовления двух экспериментальных вакцин против COVID-19 на основе рекомбинантных Spike/RBD белков, полученных с использованием бакуловирусной технологии, от получения активной фармацевтической субстанции до готовых лекарственных форм, и оценка их безопасности и эффективности.

Задачи исследования:

1. Провести анализ геномных последовательностей SARS-CoV-2 по данным базы GISAID, включая изоляты, циркулировавшие в Республике Казахстан, и сконструировать плазмиды со вставками иммунодоминантных антигенов (S-ECD, RBD) вируса SARS-CoV-2;
2. Сконструировать бакуловирусный вектор, провести экспрессию, очистку и концентрирование, а также контроль качества Spike/RBD белков (специфичность, чистота, концентрация, стерильность и бактериальные эндотоксины, реактивность в иммуноблоттинге);
3. Разработать технологию приготовления двух лекарственных форм экспериментальных вакцин против SARS-CoV-2 (обоснование состава, технологическая схема получения, финишные операции и упаковка): субъединичной вакцины для внутримышечного введения на основе рекомбинантного белка spike (Spike-белок) с внеклеточным доменом (ECD) и наноэмульсионным масляным адъювантом (SWE), а также формы на основе наночастиц в виде лиофилизата для изготовления раствора для интраназального применения, содержащего рецептор-связывающий домен (RBD), инкапсулированный в хитозано-маннозные наночастицы;

4. Оценить показатели качества (физико-химические и технологические характеристики) разработанных экспериментальных образцов внутримышечной и интраназальной вакцин, а также изучить их стабильность в процессе хранения;

5. Оценить безопасность, иммуногенность и протективную эффективность полученных рекомбинантных белков в составе двух разработанных лекарственных форм (экспериментальной субъединичной адъювантной внутримышечной вакцины и прототипа интраназальной нановакцины) на моделях лабораторных животных, провести анализ протективной эффективности по опубликованным результатам совместных исследований.

Методы исследования. В работе использованы биоинформатические, молекулярные, статистические, физико-химические, химические, фармакопейные, технологические, микробиологические и фармакологические методы в соответствии с требованиями нормативных документов, признанных и действующих на территории Республики Казахстан.

Конструирование целевых антигенов выполнено методами биоинформатического моделирования (in silico) и генной инженерии; биосинтез рекомбинантных белков – в суспензионной культуре клеток насекомых ExpiSf9™ с использованием бакуловирусной системы экспрессии. Выделение и очистка проведены методами металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA-матрице и гель-фильтрации; контроль качества – методами электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, вестерн-блоттинга, иммуноферментного анализа, определения бактериальных эндотоксинов и испытания на стерильность. Хитозано-маннозные наночастицы получены методом ионного гелеобразования и охарактеризованы методами динамического светорассеяния, определения дзета-потенциала и сканирующей электронной микроскопии. Безопасность, иммуногенность и протективная эффективность изучены в неклинических исследованиях in vivo и in vitro на моделях лабораторных животных, включая нечеловеческих приматов.

Детальное описание методов с указанием соответствующих общих фармакопейных статей приведено в подразделе 2.2 диссертации; статистическая обработка выполнена согласно ОФС 2.1.10.2 Фармакопеи ЕАЭС при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

Объекты исследования: технологический процесс получения субъединичных вакцинных препаратов против COVID-19 на основе рекомбинантных белков SARS-CoV-2, синтезируемых в бакуловирусной системе экспрессии, – от биосинтеза активной фармацевтической субстанции в суспензионной культуре клеток насекомых до готовых лекарственных форм для внутримышечного и интраназального введения. Материальными носителями служат рекомбинантный Spike-белок с внеклеточным доменом (S-ECD) и рецептор-связывающий домен (RBD) вируса SARS-CoV-2, а также полученные на их основе экспериментальные препараты: субъединичная вакцина NARUVAX-C19 для внутримышечного введения, содержащая Spike-белок и наноэмульсионный масляный адъювант SWE, и нановакцина NARUVAX-C19/Nano для интраназального введения, в которой рецептор-связывающий домен заключён в наночастицу хитозана, конъюгированную с маннозой.

Предмет исследования: способ получения рекомбинантных белков Spike/RBD на основе бакуловирусной технологии; технология получения и показатели качества экспериментальной субъединичной вакцины против SARS-CoV-2 – NARUVAX-C19 для внутримышечного введения на основе рекомбинантного белка Spike (Spike-белок) с внеклеточным доменом (ECD) и наноэмульсионным масляным адъювантом (SWE); технология получения и показатели качества экспериментальной нановакцины против SARS-CoV-2 – NARUVAX-C19/Nano для интраназального введения, содержащей рецептор-связывающий домен (RBD), заключённый в наночастицу хитозана, конъюгированную с маннозой; безопасность, иммуногенность, протективная эффективность и стабильность полученных рекомбинантных белков в составе субъединичной адъювантной внутримышечной и субъединичной интраназальной нановакцины против COVID-19 на моделях лабораторных животных, включая нечеловеческих приматов.

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

1. Отработанная бакуловирусная модель экспрессии на базе суспензионной клеточной линии ExpiSf9™ обеспечивает высокоэффективный биосинтез конформационно стабильных и функционально активных рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 (Spike S-ECD и RBD). Физико-химические и биологические свойства полученных целевых белков отвечают фармакопейным требованиям, предъявляемым к активным фармацевтическим субстанциям для конструирования безопасных иммуногенных внутримышечных и интраназальных вакцин.

2. Научно обоснованные технологические параметры культивирования клеточной линии ExpiSf9™ (множественность инфицирования MOI = 5, плотность клеток на момент инфицирования 6,5–7,0 × 10^6 клеток/мл, температура 27 °C, время экспрессии 72 ч) в сочетании с двухэтапной схемой очистки (металл-хелатная аффинная хроматография на Ni-NTA-матрице и гель-фильтрация) обеспечивают наибольший выход целевых рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 (1,5–2,0 мг/л для S-ECD и 2,0–2,4 мг/л для RBD) при достижении высокой степени очистки (более 95 %) и биологической безопасности – содержание бактериальных эндотоксинов не более 1,0 ЭЕ/мкг белка при фактически полученных 0,2 ЭЕ/мкг для S-ECD и 0,15 ЭЕ/мкг для RBD – с сохранением биологической активности.

3. Установленный в проведённых доклинических исследованиях профиль безопасности и ареактогенности экспериментальных вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano. Комплексные доклинические исследования в условиях GLP подтверждают принадлежность разработанных препаратов к классу относительно безвредных веществ. Вакцины не обладают острой и субхронической токсичностью при введении в дозах, в 10 раз превышающих терапевтические, лишены местно-раздражающего и аллергизирующего действия.

4. Отработанная биотехнологическая платформа на основе суспензионной культуры ExpiSf9™ обеспечивает стабильно высокий выход (1,5–2,0 мг/л) и хроматографическую чистоту (более 95 %) конформационно стабильного антигена S-ECD SARS-CoV-2. Рациональный дизайн инъекционной лекарственной формы NARUVAX-C19, основанный на использовании наноэмульсионного адъюванта Sepivac SWE в объёмном соотношении 50:50 с антигеном, обеспечивает отсутствие фазового разделения при хранении эмульсии типа «масло-в-воде» и формирование выраженного системного Th1/Th2-клеточного и гуморального иммунного ответа.

5. Технология направленной мукозальной доставки антигена, реализованная в нановакцине NARUVAX-C19/Nano посредством ионного гелеобразования хитозано-маннозных наночастиц. Данная полимерная наносистема характеризуется оптимальными физико-химическими параметрами (гидродинамический размер ~290 нм, ζ-потенциал ~+30 мВ, эффективность инкапсуляции RBD 66,8 %). Использование данной платформы обеспечивает мукоадгезию, защиту антигена от ферментативной деградации и его таргетный захват антигенпрезентирующими клетками слизистой оболочки дыхательных путей, индуцируя выраженный секреторный IgA-ответ.

6. Научно-технологическое обоснование стандартизации и масштабируемости производства разработанных вакцинных препаратов. Проведённая предвалидация трёх опытных партий субстанции RBD подтверждает воспроизводимость критических параметров качества (QbD); для субстанции S-ECD предвалидационные серии в рамках работы не выполнялись. Установленные показатели физико-химической и биологической стабильности лиофилизированной и инъекционной форм в процессе хранения формируют доказательную базу для утверждения нормативной документации и составляют основание для рассмотрения вопроса о переходе вакцин-кандидатов NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano к клиническим исследованиям I фазы.

Научная новизна работы. Технологический базис работы – бакуловирусная экспрессионная система, металл-хелатная аффинная хроматография, гель-фильтрация и метод ионного гелеобразования для получения хитозановых наночастиц – относится к

уровню техники и на новизну не претендует. Новизна настоящей работы состоит в конкретном сочетании и численных значениях параметров, при которых этот базис впервые доведён до завершённого технологического решения для двух лекарственных форм в условиях Республики Казахстан:

1. Для системы экспрессии ExpiSf9™ установлен и количественно обоснован рабочий диапазон критических параметров биосинтеза конформационно стабильных антигенов S-ECD и RBD SARS-CoV-2: при множественности инфицирования MOI = 5, плотности клеток на момент инфицирования 6,5–7,0 × 10^6 клеток/мл, температуре 27 °C и сборе через 72 ч достигается выход 1,5–2,0 мг/л для S-ECD и 2,0–2,4 мг/л для RBD при чистоте более 95 %. Снижение MOI до 3 уменьшает выход до 0,8–1,2 мг/л, повышение до 7 – до 1,0–1,4 мг/л при падении чистоты до 90–93 %.

2. Разработана и предвалидирована масштабируемая двухэтапная схема выделения и очистки (Downstream), включающая металл-хелатную аффинную хроматографию на Ni-NTA-матрице и гель-фильтрацию. Данный технологический подход позволил достичь высокой степени чистоты активной фармацевтической субстанции (более 95 %) и биологической безопасности (содержание бактериальных эндотоксинов не более 1,0 ЭЕ/мкг белка), удовлетворяющих фармакопейным требованиям.

3. Предложена и исследована на лабораторных моделях грызунов и макак-резусов экспериментальная субъединичная вакцина против COVID-19 (NARUVAX-C19), где в качестве иммуностимулирующего компонента используется наноэмульсионный масляный адъювант Sepivac SWE с типом эмульсии «масло в воде».

4. Показаны безопасность и иммуногенность экспериментальной вакцины NARUVAX-C19 для макак-резусов, у которых введение двух внутримышечных доз с интервалом в 2 недели привело к устойчивому широконейтрализующему гуморальному и Т-клеточному IFN-γ ответу.

5. Впервые на основе хитозано-маннозных наночастиц разработан прототип нановакцины против COVID-19 с интраназальным способом введения.

6. Установлено, что экспериментальная вакцина на основе рекомбинантного мономерного RBD белка, загруженного в наночастицы из хитозана, конъюгированного с маннозой (NARUVAX-C19/Nano), обеспечивает формирование у мышей антиген-специфичных IgA-антител и Th1-клеточного иммунного ответа при двукратной интраназальной иммунизации с интервалом в 21 день, а также защиту от инфицирования исходным штаммом вируса SARS-CoV-2 (линия D614G) на модели сирийских хомяков. В данном исследовании впервые установлено, что эффективность экспериментальной формы NARUVAX-C19/Nano достигалась при отсутствии в сыворотке детектируемых анти-RBD IgG (включая подклассы IgG1 и IgG2a), а также антител, блокирующих взаимодействие RBD–ACE2, и вируснейтрализующих антител.

7. Проведены доклинические исследования безопасности разработанных экспериментальных образцов вакцин на базе Испытательного центра Национального центра экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий МЗ РК (НЦЭЛС и МИ). Показано, что обе экспериментальные вакцины не оказывают токсического действия на организм, обладают хорошей переносимостью и не проявляют аллергизирующего действия в испытаниях на лабораторных животных, в том числе беременных особях. На основании успешных результатов доклинических исследований безопасности (проведённых в условиях соответствия стандартам GLP) экспериментальные образцы получили статус вакцин-кандидатов NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano; по заключению НЦЭЛС и МИ препараты признаны соответствующими требованиям безопасности для перехода к следующему этапу разработки.

Патентные исследования, проведённые в соответствии с ГОСТ Р 15.011-96 по международной патентной базе Google Patents с глубиной поиска с 2014 года (рубрики МПК A61K 39/215 и C12N 15/866), показали, что совокупность признаков, характеризующих интраназальную лекарственную форму на основе рецептор-связывающего домена SARS-

CoV-2, инкапсулированного в хитозановые наночастицы, конъюгированные с маннозой, в заявленном сочетании в проанализированных патентных документах не выявлена.

Практическая значимость работы. Разработаны две новые лекарственные формы экспериментальных вакцин против COVID-19, а также платформенный подход, потенциально применимый к другим вирусным инфекциям: адъювантная форма для внутримышечного введения и форма на основе наночастиц в виде лиофилизата для изготовления интраназального раствора.

Разработана и внедрена технология получения рекомбинантного белка Spike на основе бакуловирусной технологии для создания NARUVAX-C19 – экспериментальной субъединичной вакцины против COVID-19, раствора для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза, на основе рекомбинантного белка Spike (Spike-белок) с внеклеточным доменом (ECD) и наноэмульсионным масляным адъювантом (SWE). Разработан и внедрён лабораторный регламент.

Разработана и внедрена технология получения рекомбинантного белка RBD на основе бакуловирусной технологии для NARUVAX-C19/Nano – экспериментальной нановакцины против COVID-19, лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения, 0,5 мл/доза, содержащей рецептор-связывающий домен (RBD), заключённый в наночастицу хитозана, конъюгированную с маннозой. Разработан и внедрён лабораторный регламент.

Разработаны проекты нормативных документов (НД) и проведена стандартизация NARUVAX-C19 – экспериментальной субъединичной вакцины против COVID-19, раствора для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза, и NARUVAX-C19/Nano – экспериментальной нановакцины против COVID-19, лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения, 0,5 мл/доза; для обеих лекарственных форм определены условия и сроки хранения.

На базе Международного центра вакцинологии КазНАИУ (Республика Казахстан, г. Алматы) организован выпуск опытных партий обеих экспериментальных вакцин.

Личный вклад докторанта

Диссертант сконструировал рекомбинантный вектор для введения генов белков S и RBD SARS-CoV-2 в бакуловирусную систему. Данный этап включал выбор промотора, применение сигнального пептида мелиттина для направления целевого полипептида в секреторный путь, а также интеграцию регуляторных последовательностей, оптимизирующих фолдинг белка в клетках-продуцентах.

Диссертант проводил экспрессию белка в бакуловирусной системе. Работа включала: получение рекомбинантной бакмиды в компетентных клетках E. coli; определение титра вирусного стока; трансфекцию клеток-продуцентов и комплексный подбор параметров ферментации.

Вклад диссертанта заключается в разработке дизайна плазмидных конструкций, проведении полного технологического цикла наработки клеточной биомассы и очистки рекомбинантных белков. Соискателем лично проведены исследования по определению параметров стабильности полученных препаратов в процессе хранения, а также разработаны проекты НД и лабораторных регламентов на получение двух лекарственных форм экспериментальных вакцин. Наряду с технологической частью диссертант принимал непосредственное участие в анализе данных доклинических исследований, которые подтвердили безопасность и специфическую биологическую активность разработанных лекарственных форм.

Отдельные этапы работы выполнены с участием организаций-партнёров. Физико-химическая характеристика хитозано-маннозных наночастиц, сканирующая электронная микроскопия и отработка режима лиофилизации выполнены на базе The Ohio State University (США); диссертант участвовал в постановке задачи и интерпретации полученных данных. Доклинические исследования безопасности на грызунах проведены Испытательным центром НЦЭЛС и МИ МЗ РК в условиях GLP; диссертант участвовал в составлении программ исследований и анализе первичных данных отчётов. Доклиническое исследование

безопасности и иммуногенности вакцины NARUVAX-C19 на макаках-резусах выполнено ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»; диссертант обеспечивал наработку и контроль качества антигена, участвовал в анализе первичных данных отчёта и является первым автором публикации, подготовленной по результатам этого исследования. Исследования иммуногенности и протективности на моделях мышей и сирийских хомяков выполнены на базе Международного центра вакцинологии КазНАИУ совместно с Vaxine Pty Ltd (Австралия); диссертант обеспечивал наработку и контроль качества антигенов.

Выводы:

1. Методами биоинформатического моделирования (in silico) и генной инженерии сконструированы и наработаны в суспензионной культуре клеток насекомых ExpiSf9™ рекомбинантные белки вируса SARS-CoV-2: для инъекционной формы – полноразмерный экстраклеточный домен S-белка (S-ECD) с удалённым сайтом расщепления фурином, для интраназальной формы – рецептор-связывающий домен (RBD), включающий мутации варианта Omicron BA.5. Разработанный биотехнологический процесс (Upstream и Downstream) при множественности инфицирования MOI = 5, изотермическом режиме культивирования 27 °C и сборе культуральной жидкости через 72 часа после инфицирования позволил достичь выхода 1,5–2,0 мг/л культуральной жидкости для S-ECD и 2,0–2,4 мг/л для RBD при степени хроматографической чистоты более 95 % по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Физико-химические и биологические свойства полученных белков, включая содержание бактериальных эндотоксинов 0,2 ЭЕ/мкг белка для S-ECD и 0,15 ЭЕ/мкг белка для RBD при норме не более 1,0 ЭЕ/мкг белка, соответствуют требованиям, предъявляемым к активным фармацевтическим субстанциям.

2. Воспроизводимость технологического процесса подтверждена на трёх последовательных опытных сериях субстанции RBD; для субстанции S-ECD предвалидационные серии в рамках настоящей работы не выполнялись, вывод о воспроизводимости распространяется на неё в части общих стадий процесса и подлежит экспериментальному подтверждению на этапе масштабирования. Утверждены лабораторные регламенты, устанавливающие критические параметры процесса (MOI = 5, температурный профиль, параметры хроматографической очистки). Для корректного трансфера технологии в условия пилотных суспензионных биореакторов определены расчётные параметры перехода: коэффициент массопередачи кислорода (kLa) в диапазоне 5–10 $ч^{-1}$, уровень растворённого кислорода не ниже 40 % от сатурации воздуха, лимитирование удельной мощности перемешивания (P/V) и введение полоксамеров в состав питательной среды в качестве протекторов клеточных мембран. Технологический процесс разработан в соответствии с принципами «встроенного качества» (Quality by Design) и требованиями Правил надлежащей производственной практики.

3. На базе полученных субстанций разработаны составы и технологии получения двух лекарственных форм. Для внутримышечного введения создана вакцина NARUVAX-C19 – кинетически устойчивая композиция рекомбинантного белка с наноэмульсионным масляным адъювантом Sepivac SWE, сохранявшая физическую стабильность в исследованных условиях хранения. Для интраназального (мукозального) применения разработан прототип нановакцины NARUVAX-C19/Nano, технология которой базируется на методе ионного гелеобразования: инкапсуляция антигена в катионные хитозановые наночастицы, модифицированные D-маннозой, позволила получить коллоидную систему со средним гидродинамическим размером 290 нм, высоким положительным дзета-потенциалом (+30 мВ) и эффективностью включения белка около 66,8 %, что, по литературным данным, способствует защите антигена от деградации и потенциально обеспечивает его адресную доставку к антигенпрезентирующим клеткам за счёт взаимодействия маннозных остатков с маннозными рецепторами.

4. Проведён комплекс доклинических исследований безопасности в условиях аккредитованной GLP-лаборатории (НЦЭЛС и МИ МЗ РК), показавший, что обе лекарственные формы относятся к классу относительно безвредных веществ (VI класс токсичности). Признаков острой и субхронической токсичности при введении препаратов грызунам в дозах, в 10 раз превышающих терапевтические, не выявлено; вакцины не обладают местно-раздражающим и аллергизирующим действием. При введении беременным самкам пороков развития плода не зарегистрировано; выявленные при гистологическом исследовании единичные микрофокусы нарушений кровообращения и некроза в эмбриональных тканях отмечены для обеих лекарственных форм, включая не содержащую скваленовый адъювант, и их причинная связь с действием вакцинных препаратов или сопутствующих процедур применённым дизайном не установлена. Оценка репродуктивной токсичности в объёме сегмента II с соответствующими группами сравнения отнесена к самостоятельному этапу доклинической разработки.

5. Установлены специфическая иммуногенность и протективная эффективность внутримышечной вакцины NARUVAX-C19. Исследования на моделях мышей (BALB/c), сирийских хомяков и макак-резусов показали, что двукратная иммунизация индуцирует системный гуморальный ответ с формированием анти-S IgG и вируснейтрализующих антител к штаммам линий Wuhan и Delta, а также сбалансированный Th1/Th2-клеточный ответ. У нечеловеческих приматов выраженность патологических изменений в лёгких при заражении живым патогеном была снижена по сравнению с группой плацебо. Кросс-нейтрализующий эффект в отношении генетически удалённых штаммов свидетельствует о способности вакцины индуцировать перекрёстно-нейтрализующие антитела.

6. Впервые разработан и исследован прототип интраназальной нановакцины против COVID-19 на основе рекомбинантного белка RBD, инкапсулированного в хитозано-маннозные наночастицы. Установлено, что двукратное интраназальное введение препарата мышам и сирийским хомякам приводит к индукции антиген-специфичных секреторных IgA в дыхательных путях и формированию клеточного иммунного ответа с Th1-поляризацией (синтез IFN-γ, IL-2 и TNF-α). Показано, что доставка RBD-белка в составе хитозано-маннозных наночастиц обеспечивает защиту иммунизированных животных от развития патологии лёгких при заражении штаммом SARS-CoV-2, причём защитный эффект достигается при отсутствии детектируемых анти-RBD IgG в сыворотке. Вместе с тем установлено, что интраназальная форма не предотвращает передачу вируса контактным животным; формирование стерилизующего иммунитета при изолированном применении мукозального пути введения в проведённых экспериментах достигнуто не было.

7. Осуществлены фармацевтическая разработка и стандартизация двух лекарственных форм: разработаны проекты нормативных документов и спецификации контроля качества на промежуточную и готовую продукцию для инъекционной (NARUVAX-C19) и интраназальной (NARUVAX-C19/Nano) вакцин, обоснованы условия стабилизации лиофилизированной наноформы и параметры получения адъювантной формы. По результатам исследований стабильности установлены условия и сроки хранения: для NARUVAX-C19 – при температуре от 2 до 8 °C без замораживания, предварительный срок годности 12 месяцев, подлежащий подтверждению в исследовании стабильности на трёх сериях в соответствии с ICH Q1A(R2) и ICH Q5C; для лиофилизата NARUVAX-C19/Nano по предварительным данным – не менее 12 месяцев при температуре от минус 17 до минус 30 °C и не менее 6 месяцев при температуре от 2 до 8 °C. На базе Международного центра вакцинологии КазНАИУ (Республика Казахстан, г. Алматы) организован выпуск опытных партий двух вакцин-кандидатов для доклинических испытаний.

Таким образом, поставленная цель диссертационной работы достигнута. Полученные данные о безопасности, иммуногенности и протективной эффективности обеих лекарственных форм, установленные в условиях доклинических исследований на лабораторных животных, составляют основание для рассмотрения вопроса о переходе

вакцин-кандидатов NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano к клиническим исследованиям I фазы.

Апробация результатов диссертации

Основные положения, результаты и выводы диссертационной работы были представлены, доложены и получили положительную оценку на следующих международных научных форумах и конференциях:

– 16-й Международный вакцинный конгресс (16th Vaccine Congress, 12–14 сентября 2022 г., Рива-дель-Гарда, Италия) – постерный доклад с представлением результатов разработки вакцины NARUVAX-C19 совместно с международными партнёрами (Vaxine Pty Ltd, Австралия; The Ohio State University, США);

– Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и биологическая безопасность: достижения и перспективы развития», посвящённая 65-летию Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) МЗ РК (6–8 сентября 2023 г., г. Алматы, Республика Казахстан) – с публикацией материалов на тему «Оценка иммуногенности и протективной эффективности интраназальной субъединичной нановакцины против COVID-19 на лабораторных моделях».

Публикации по теме диссертации: По результатам исследования опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и 2 тезиса докладов в материалах международных научно-практических конференций:

– 1 статья в журнале Human Vaccines & Immunotherapeutics (WoS-Q1, IF-4.8, Scopus-68 %);

– 1 статья в журнале Scientific Reports (WoS-Q2, IF-4.6, Scopus-92 %);

– 1 статья в журнале Microorganisms (WoS-Q2, IF-4.9, Scopus-65 %).

Вклад докторанта в подготовку каждой публикации. В статье в журнале Human Vaccines & Immunotherapeutics (Solomadin M. et al., 2023, Т. 19, № 2, 2258571) докторант является первым автором – им выполнены разработка дизайна плазмидных конструкций, полный технологический цикл наработки клеточной биомассы и очистки рекомбинантного белка S-ECD, участие в анализе данных доклинических исследований и подготовка текста рукописи. В статье в журнале Scientific Reports (Tabynov K., Solomadin M., Turebekov N. et al., 2023, Т. 13, № 1, 12115) докторант является вторым автором – им выполнены получение и контроль качества рекомбинантного белка RBD, участие в анализе результатов и подготовке рукописи. В статье в журнале Microorganisms докторантом выполнены анализ результатов и подготовка рукописи. Тезисы 2 докладов подготовлены докторантом в части технологических результатов получения рекомбинантных белков и разработки лекарственных форм.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 196 страницах машинописного текста и содержит 54 таблицы, 52 рисунка, 98 источников отечественной и зарубежной литературы, а также 6 приложений. Структура включает: нормативные ссылки и список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, четыре раздела экспериментальной части (главы 3, 4, 5 и 6), выводы по разделам и заключение.

В приложениях А и Б приведены проекты нормативных документов на экспериментальные вакцины NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano, в приложениях В и Г – лабораторные регламенты на получение и оценку рекомбинантных белков Spike и RBD, в приложении Д – отчёт о научно-исследовательской работе, в приложении Е – копия постерного доклада.