НАО «КАРАГАНДИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 579.64:577.21:615.371:578.834.1

На правах рукописи

СОЛОМАДИН МАКСИМ ВАЛЕРЬЕВИЧ

Получение и оценка рекомбинантного белка на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19

8D07201 – «Технология фармацевтического производства»

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Научные консультанты: Табынов К.К., к.в.н., профессор (Международный центр вакцинологии КазНАИУ)

Зарубежный научный консультант: Nikolai Petrovsky, MBBS, PhD, профессор (Vaxine Pty, г. Аделаида, Австралия)

Республика Казахстан,
Караганда, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ 2
НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ 4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 7
ВВЕДЕНИЕ 11
1 Обзор литературы 20
1.1 Маркетинговый и клинико-экономический анализ рынка вакцин против COVID-19 24
1.2 Заключение по эффективности, безопасности, иммунному ответу и логистике существующих вакцин против COVID-19 27
1.3 Выбор белка (антигена) для разработки субъединичных вакцин 29
1.4 Способы введения вакцин 31
1.5 Перспективы применения бакуловирусной технологии для получения рекомбинантного белка 33
2 Материалы и методы исследования 38
2.1 Материалы исследования 38
2.1.1 Объекты исследования 38
2.1.2 Биологические агенты и тест-системы 39
2.1.3 Вспомогательные вещества и реактивы 40
2.1.4 Аппаратурная схема и производственное оборудование 44
2.1.5 Экспериментальные животные 46
2.2 Методы исследования 55
3 Технология получения активной фармацевтической субстанции: получение рекомбинантных белков S/RBD SARS-CoV-2 в бакуловирусной системе (I этап технологии приготовления экспериментальных вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano) 64
3.1 Описание клеточной линии-продуцента *ExpiSf9*™ 64
3.2 Обоснование общей стратегии процесса культивирования 66
3.3 Конструирование рекомбинантного белка RBD вируса SARS-CoV-2 68
3.4 Результаты *in silico* конструирования целевых антигенов 72
3.5 Оценка ростовых свойств и продуктивности системы экспрессии белков Spike и RBD SARS-CoV-2 с использованием системы ExpiSf™ 73
3.6 Технологические параметры генерации и титрования рабочего банка бакуловируса 74
3.7 Выделение и очистка белка 82
3.8 Финишные операции и упаковка активной фармацевтической субстанции (промежуточного продукта) 86
3.9 Спецификация качества и контроль производственных параметров 86
3.10 Охрана окружающей среды и техника биологической безопасности 89
3.11 Предвалидация технологического процесса производства рекомбинантного белка SARS-CoV-2 RBD с полигистидиновой меткой, экспрессированного в системе *ExpiSf9*™ 90

4 Разработка состава и технологии получения готовых лекарственных форм экспериментальных вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano (II этап технологии приготовления) 98
4.1 Разработка состава и технологии получения инъекционной лекарственной формы субъединичной вакцины NARUVAX-C19 99
4.1.1 Обоснование состава 99
4.1.2 Технологическая схема получения 100
4.1.3 Финишные операции и упаковка 101
4.1.4 Показатели качества готовой формы 102
4.1.5 Стабильность инъекционной формы NARUVAX-C19 104
4.2 Получение нановакцины NARUVAX-C19/Nano, на основе рекомбинантных белков и хитозановых наночастиц 105
4.2.1 Физико-химические характеристики наночастиц 105
4.2.2 Технологическая схема получения нановакцины 106
4.2.3 Финишные операции и упаковка 108
4.2.4 Стабильность при хранении 108
4.3 Оценка совместимости активной фармацевтической субстанции со вспомогательными веществами 110
4.4 Материальный баланс технологического процесса 111
4.5 Оценка материальной себестоимости производства 116
4.6 Оценка профиля примесей 118
5 Фармакологические исследования 129
5.1 Фармакологические исследования субъединичной вакцины NARUVAX-C19 на грызунах 130
5.2 Исследование безопасности субъединичной вакцины NARUVAX-C19 на макаках 144
5.3 Фармакологические исследования субъединичной вакцины NARUVAX-C19/Nano на грызунах 156
6 Изучение иммуногенности вакцины NARUVAX-C19 176
6.1 Гуморальный иммунный ответ у мышей (BALB/c) 176
6.2 Изучение иммуногенности вакцины NARUVAX-C19/Nano 179
6.3 Обсуждение результатов исследования 181
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 188
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 191
Приложение А 197
Приложение Б 198
Приложение В 199
Приложение Г 200
Приложение Д 201
Приложение Е 202

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

Международные договоры, правовые акты и документы Евразийского экономического союза (ЕАЭС):

– Хельсинкская декларация и нормативы OECD: Этические и правовые стандарты обращения с лабораторными животными;

– Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»;

– Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»;

– Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза»;

– Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21 мая 2020 года № 10 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения»;

– ЕАЭС МР 1.3.2.2.11–2021: Методические рекомендации Евразийского экономического союза по проведению доклинических исследований безопасности.

Нормативные правовые акты Республики Казахстан:

– Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 16 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-20 «Об утверждении правил разработки производителем лекарственных средств и согласования государственной экспертной организацией нормативного документа по качеству лекарственных средств при экспертизе лекарственных средств»;

– Приказ и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик».

Фармакопея Евразийского экономического союза (Ф ЕАЭС):

– ОФС 2.1.2.3 и ОФС 2.2.3 «Потенциометрическое определение pH» / «Потенциометрия»;

– ОФС 2.1.2.24 «Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»;

– ОФС 2.1.2.28 «Жидкостная хроматография»;

– ОФС 2.1.2.29 «Определение нуклеотидной последовательности»;

– ОФС 2.1.2.30 и ОФС 2.2.31 «Электрофорез» (в т.ч. в восстановительных условиях);

– ОФС 2.1.2.32 «Количественное определение общего белка»;

– ОФС 2.1.6.1 «Стерильность» / «Прямой посев»;
– ОФС 2.1.6.6 «Микробиологическая чистота»;
– ОФС 2.1.6.7 «Аномальная токсичность»;
– ОФС 2.1.6.9 «Пирогенность»;
– ОФС 2.1.6.10 и ОФС 2.6.14 «Бактериальные эндотоксины»;
– ОФС 2.1.6.11 «Определение количества и жизнеспособности клеток насекомых»;
– ОФС 2.1.6.12 «Стерильность клеточных культур»;
– ОФС 2.1.6.18 «Амплификация»;
– ОФС 2.1.9.1 «Прозрачность и степень мутности жидкостей»;
– ОФС 2.1.9.2 «Степень окрашивания жидкостей»;
– ОФС 2.1.9.17 «Видимые механические включения»;
– ОФС 2.1.10.2 «Статистическая обработка результатов биологических испытаний и количественных определений»;
– ОФС 2.2.1.13 «Вода очищенная»;
– ОФС 2.5.1.1 «Стерилизующая фильтрация».

Государственные и межгосударственные стандарты (ГОСТ):

– ГОСТ 17768-90 (и 17768-90Е) «Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение»;
– ГОСТ 7625–86 «Бумага этикеточная»;
– ГОСТ 14192-96 «Маркировка грузов»;
– ГОСТ 10929-76 «Перекись водорода»;
– ГОСТ 5962-2013 «Спирт этиловый»;
– ГОСТ 25664-88 «Синтетические моющие средства»;
– ГОСТ 1770-74Е «Посуда мерная лабораторная стеклянная».

Международные руководства (ICH, WHO, EMA):

– ICH S6(R1) «Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals»: Международное руководство по доклинической оценке безопасности биотехнологических препаратов;
– ICH M3(R2) «Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals»: Руководство по неклиническим исследованиям безопасности для проведения клинических испытаний;
– ICH Q5 «Quality of Biotechnological Products»: Международные руководства по качеству биотехнологических препаратов;
– ICH Q5B «Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products»: Руководство по анализу экспрессионных конструкций в клетках, используемых для производства рекомбинантных белков;
– ICH Q5C «Stability Testing of Biotechnological/Biological Products»: Руководство по испытаниям стабильности биотехнологических и биологических препаратов;
– ICH Q5D «Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products»: Руководство по получению и

характеризации клеточных субстратов, используемых для производства биотехнологических препаратов;

– ICH Q8(R2) «Pharmaceutical Development»: Международное руководство по фармацевтической разработке;

– WHO TRS 927, Annex 1 «WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines»: Руководство ВОЗ по доклинической оценке вакцин (использовалось для обоснования выбора животных моделей и дозировок);

– EMA/CHMP/IWP/83508/2011: Руководство Европейского агентства по лекарственным средствам (использовано при дизайне исследований иммуногенности).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ACE2	ангиотензин-превращающий фермент 2
Ad26.COV2.S	аденовирусная векторная вакцина против COVID-19 (Johnson & Johnson)
ALB	альбумин
ALP	щелочная фосфатаза
Alpha	изолят Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2
ALT / АЛТ	аланинаминотрансфераза
APS	персульфат аммония (реактив для электрофореза)
AST / АСТ	аспартатаминотрансфераза
Bac-to-Bac	бакуловирусная система клонирования и экспрессии
BBIBP-CorV	инактивированная вакцина Sinopharm против COVID-19
Beta	бета-штамм SARS-CoV-2
BEVS	бакуловирусная система экспрессии (Baculovirus Expression Vector System)
BNT162b2	мРНК-вакцина Pfizer-BioNTech против COVID-19
BSA	бычий сывороточный альбумин
$CD4^+$	Т-лимфоциты-хелперы
$CD8^+$	цитотоксические Т-лимфоциты
CFSE	карбоксифлуоресцеин сукцинимидил эфир (краситель для проточной цитометрии)
CHO	клетки яичника китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary)
CHOL	холестерин
CoronaVac	инактивированная вакцина Sinovac против COVID-19
COVID-19	коронавирусная болезнь 2019 года
CpG	цитозин-фосфат-гуанин (иммуномодулирующий олигонуклеотид)
CRE / Krea	креатинин
DLS / ДЛС	динамическое светорассеяние
E. coli	кишечная палочка (Escherichia coli)
ECD	внеклеточный домен (Extracellular domain)
ELISPOT	твердофазный иммуноферментный анализ (Enzyme-Linked ImmunoSpot)
EU	см. ЭЕ
Expi293F	клеточная линия млекопитающих для экспрессии белков
ExpiSf Enhancer	усилитель экспрессии для клеток насекомых
Flublok®	рекомбинантная субъединичная вакцина против гриппа
Gamma	гамма-штамм SARS-CoV-2
GISAID	Глобальная инициатива по обмену всеми данными о гриппе и коронавирусах
GLB	глобулин
GLP	надлежащая лабораторная практика (Good Laboratory Practice)

ACE2	ангиотензин-превращающий фермент 2
GLU / Gluk	глюкоза
GMP	надлежащая производственная практика (Good Manufacturing Practice)
GMT	средняя геометрическая титра (Geometric mean titer)
GPCR	рецепторы, сопряжённые с G-белками
HCT	гематокрит
HEK293	эмбриональные клетки почки человека
HEK293T	модифицированная клеточная линия HEK293
HGB	гемоглобин
High Five	клеточная линия насекомых Trichoplusia ni
His-tag	полигистидиновая метка
HLA-A02:01	молекула главного комплекса гистосовместимости класса I
HPLC / ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
HR1, HR2	гептадные повторы белка Spike
IFN-γ	интерферон гамма
IgA, IgG	иммуноглобулины A и G
IL	интерлейкин (IL-2, IL-4, IL-6 и т.д.)
Janssen	торговое наименование вакцины Johnson & Johnson
LAL	ЛАЛ-тест (Limulus amebocyte lysate)
Lancet	международный медицинский научный журнал
LDH	лактатдегидрогеназа
LYM	лимфоциты
MHC-I	главный комплекс гистосовместимости I класса
MID	смесь моноцитов, эозинофилов и базофилов
MOI	множественность инфицирования (Multiplicity of Infection)
mRNA / мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
NARUVAX-C19	условное наименование экспериментальной субъединичной вакцины против COVID-19 для внутримышечного введения
NARUVAX-C19/Nano	условное наименование экспериментальной интраназальной нановакцины против COVID-19
NEJM	The New England Journal of Medicine
NEUT	нейтрофилы
Ni-NTA	никель-нитрилотриуксусная кислота
NVX-CoV2373	субъединичная вакцина Novavax против COVID-19
Omicron	омикрон-штамм SARS-CoV-2
ORF8	вспомогательный белок коронавируса SARS-CoV-2
P. pastoris	дрожжи Pichia pastoris
PBS	фосфатно-солевой буфер (Phosphate-buffered saline)
PCR / ПЦР	полимеразная цепная реакция
PDI	индекс полидисперсности (Polydispersity index)
PLT	тромбоциты

ACE2	ангиотензин-превращающий фермент 2
PMSF	фенилметилсульфонилфторид
PTM / ПТМ	посттрансляционные модификации
RBC	эритроциты (Red blood cells)
RBD	рецептор-связывающий домен
RBM	мотив связывания с рецептором
RNA / РНК	рибонуклеиновая кислота
Spike-белок / Spike	шиповидный белок коронавируса SARS-CoV-2
S1, S2	субъединицы белка Spike
SARS-CoV	коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома
SARS-CoV-2	коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2-го типа
SDS-PAGE	электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
Sf9	клеточная линия насекомых Spodoptera frugiperda
sIgA	секреторный иммуноглобулин А
sVNT	суррогатный тест нейтрализации вируса (Surrogate virus neutralization test)
SWE	масляный эмульсионный адъювант «масло-в-воде» (Sepivac SWE)
TB	общий билирубин
TCID50	50 % тканевая цитопатическая инфицирующая доза
TEM / ТЭМ	трансмиссионная электронная микроскопия
TG	триглицериды
Th1, Th2, Th17	Т-лимфоциты хелперы 1, 2 и 17 типов
TMPRSS2	трансмембранная сериновая протеаза 2
TNF-α	фактор некроза опухоли альфа
TP	общий белок (Total protein)
UREA	мочевина
VLP	вирусоподобные частицы
VNT	реакция нейтрализации вируса (Virus neutralization test)
WBC	лейкоциты (White blood cells)
WHO / ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
WT-RBD	рецептор-связывающий домен исходного штамма вируса
XBB	рекомбинантный штамм SARS-CoV-2
АПК	антигенпрезентирующие клетки
АУИ	антителозависимое усиление инфекции
АФС	активная фармацевтическая субстанция
в/бр	внутрибрюшинно
в/м	внутримышечно
ГЛФ	готовая лекарственная форма
ГЗТ	гиперчувствительность замедленного типа
ГФ РК	Государственная фармакопея РК

ACE2	ангиотензин-превращающий фермент 2
ДМСО	диметилсульфоксид
ЕАЭС	Евразийский экономический союз
и/н	интраназально
ивч	инфекционные вирусные частицы
ЛД50	полулетальная доза
МЗ РК	Министерство здравоохранения Республики Казахстан
НД	нормативная документация
НЦЭЛС и МИ	Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий
ПД	профилактическая доза
СОП	стандартная операционная процедура
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
ТК	технологическая карта
Т-РПЛТ	Т-клетки резидентной памяти легочной ткани
Ф ЕАЭС	Фармакопея Евразийского экономического союза
ЦПД	цитопатическое действие
ЭБ	эритроциты барана
ЭЕ	эндотоксиновая единица
β-лист	бета-слой вторичной структуры белка
ζ-потенциал	дзета-потенциал

ВВЕДЕНИЕ

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 ее 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 подчеркивают не только медицинскую, но и технологическую значимость бакуловирусных систем в контексте фармацевтического производства.

С учетом 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 тяжелого 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 счет гидрофильной биополимерной матрицы обеспечивают контролируемое высвобождение антигена, а за счет 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, и представлены на 16-м Международном вакцинном конгрессе.

Цель работы: 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) анализ геномных последовательностей SARS-CoV-2 по данным базы GISAID, включая изоляты, циркулировавшие в Республике Казахстан, и конструирование плазмид со вставками иммунодоминантных антигенов (S-ECD, RBD) вируса SARS-CoV-2;

2) конструирование бакуловирусного вектора, экспрессия, очистка и концентрирование, а также контроль качества Spike/RBD белков (специфичность, чистота, концентрация, стерильность и бактериальные эндотоксины, и реактивность в иммуноблоттинге);

3) разработка технологии 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) оценка показателей качества (физико-химических и технологических характеристик) разработанных экспериментальных образцов внутримышечной и интраназальной вакцин, а также изучение их стабильности в процессе хранения;

5) оценка безопасности, иммуногенности и протективной эффективности полученных рекомбинантных белков в составе двух разработанных лекарственных форм (экспериментальной субъединичной адъювантной внутримышечной вакцины и прототипа интраназальной нановакцины) на моделях лабораторных животных, анализ протективной эффективности по опубликованным результатам совместных исследований.

Объект 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 объекта 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, содержащая рецептор-связывающий домен (RBD), заключенный 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 приматах.

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

Научная новизна работы:

Технологический базис работы — бакуловирусная экспрессионная система, металлохелатная 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.

– 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 6,5–7,0×10⁶ 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 %;

– 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;

– 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»;

– 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;

– впервые на основе хитозано-маннозных наночастиц разработан прототип нановакцины против COVID-19 с интраназальным способом введения;

– 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;

– 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.

Сведения о патентных исследованиях:

Патентные исследования проведены в соответствии с ГОСТ Р 15.011-96 «Система разработки и постановки продукции на производство. Патентные исследования. Содержание и порядок проведения» на этапе выбора направления работы и при обосновании принимаемых технических решений.

Поиск выполнен по международной патентной базе Google Patents, обеспечивающей доступ к документам Ведомства по патентам и товарным знакам США, Европейского патентного ведомства и Всемирной организации интеллектуальной собственности. Глубина поиска – с 2014 года по настоящее

время. Область поиска ограничена рубриками Международной патентной классификации, охватывающими вакцины на основе антигенов коронавирусов (A61K 39/215) и бакуловирусные векторы (C12N 15/866), а также смежными рубриками по адъювантным композициям, полимерным наноносителям и белкам семейства Coronaviridae.

Анализ отобранных документов показал, что экспрессия антигенов SARS-CoV-2 в бакуловирусной системе и применение сквален-содержащих эмульсионных адъювантов относятся к известному уровню техники. Использованные в работе платформы – экспрессионная система Bac-to-Bac™ с клеточной линией ExpiSf9™ и наноэмульсионный адъювант Sepivac SWE™ – применялись как приобретённые коммерческие продукты в штатном режиме, предусмотренном их производителями, без воспроизведения способов изготовления.

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, что согласуется с положением о научной новизне данного технического решения. Заявка на выдачу охранного документа в рамках настоящей работы не подавалась; результаты, относящиеся к интраназальной лекарственной форме, раскрыты в публикации

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 внедрен 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), заключенный в наночастицу хитозана, конъюгированную с маннозой. Разработан и внедрен лабораторный регламент;

– разработан проект нормативного документа (НД) и проведена стандартизация NARUVAX-C19 – экспериментальной субъединичной вакцины против COVID-19, раствора для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза, определен срок ее хранения;

– разработан проект НД и проведена стандартизация NARUVAX-C19/Nano – экспериментальной нановакцины против COVID-19, лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения, 0,5 мл/доза, определен срок ее хранения;

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

Личный вклад автора в исследование

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, отработка режима лиофилизации — выполнена 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.

Основные положения, выносимые на защиту:

– 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;

– 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;

– 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;

– отработанная биотехнологическая платформа на основе суспензионной культуры *ExpiSf9*™ обеспечивает стабильно высокий выход (1,5–2,0 мг/л) и хроматографическую чистоту (>95 %) конформационно стабильного антигена S-ECD SARS-CoV-2. Рациональный дизайн инъекционной лекарственной формы NARUVAX-C19, основанный на использовании наноэмульсионного адъюванта Sepivac SWE в объемном 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;

– инновационная 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;

– 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.

Апробация результатов диссертации

Основные положения, результаты и выводы диссертационной работы были представлены, доложены и получили положительную оценку на следующих международных научных форумах и конференциях: на 16-м Международном вакцинном конгрессе (16th Vaccine Congress, 12–14 сентября 2022 г., Рива-дель-Гарда, Италия) – в виде постерного доклада с представлением результатов разработки вакцины NARUVAX-C19 совместно с международными партнерами (Vaxine Pty Ltd, Австралия; The Ohio State University, США); на Международной научно-практической конференции «Биотехнология и биологическая безопасность: достижения и перспективы развития», посвященной 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

– 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 (IF-4.9, WoS-Q2, Scopus-65 %).

По материалам диссертации также опубликованы тезисы 2 докладов в материалах международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа включает в себя 196 страниц машинного текста в компьютерном наборе, 54 таблицы, 52 рисунка, 98 источников отечественной и зарубежной литературы и 6 приложений. Работа состоит из нормативных ссылок и списка сокращений, введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, 4-х разделов экспериментальной части (главы 3, 4, 5 и 6), выводов по разделам и заключения. 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 – отчет о научно-исследовательской работе, в приложении Е – копия постерного доклада.

1 Обзор литературы

В декабре 2019 года вспышка пневмонии, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2 (вирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2-го типа), привела к серьезной пандемии, охватившей Китай и другие страны мира. С начала пандемии медицинские работники ввели миллиарды доз вакцины против COVID-19. Учитывая острую потребность мирового здравоохранения в безопасных и эффективных вакцинах, за 7-месячный период с момента объявления Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) пандемии COVID-19 было предложено 180 разрабатываемых вакцин (по состоянию за 9 сентября 2020 года) на основе следующих шести основных технологических подходов: живые аттенуированные вирусы; рекомбинантные вирусные векторные вакцины; инактивированные или убитые вирусы; вакцины на основе рекомбинантных белковых субъединиц; вирусоподобные частицы (VLPs) и вакцины на основе нуклеиновых кислот (ДНК или мРНК). По состоянию на март 2024 года в мире насчитывается 382 экспериментальные вакцины против SARS-CoV-2, из которых 32 % основаны на субъединичной технологии [1].

Продолжение разработки вакцин против SARS-CoV-2 остается критическим из-за появления новых вариантов вируса, которые обладают увеличенной трансмиссивностью или способностью уклоняться от иммунного ответа, вызванного существующими вакцинами. Разработка так называемых «универсальных вакцин», нацеленных на обеспечение защиты от множества штаммов вируса SARS-CoV-2, а также будущих коронавирусов, становится особенно актуальной. Это подразумевает использование инновационных подходов, таких как конструкции химерных иммуногенов и наночастиц, которые могут индуцировать выработку широкоспектральных нейтрализующих антител и обеспечивать кросс-защиту от различных вариантов SARS-CoV-2 [2–4].

Возможность ускоренного цикла разработки вакцины против SARS-CoV-2 возникла во время резкого роста фундаментальных научных знаний, в том числе в таких областях, как геномика и структурная биология, которые поддерживают новую эру в разработке вакцин [5].

Принимая во внимание, что COVID-19 вакцины разрабатываются для достижения конечной цели – глобальной массовой иммунизации, безопасность вакцин имеет первостепенное значение. Любые признаки недостаточного внимания к безопасности могут также подстегнуть движение против вакцинации, что поставит под угрозу в целом всю кампанию по иммунизации. Безопасность вакцины, как правило, определяется дизайном вакцины (включая выбор технологии и антигена), выбором адъюванта, режимом и способом введения вакцины [6].

Бакуловирус широко используется как инструмент для производства рекомбинантного белка в клетках насекомых, поражая насекомых в природе, вирус не является патогенным для человека [7]. Благодаря своей биобезопасности, высокой способности к клонированию, низкой цитотоксичности и нерепликационной природе трансдуцированных клеток

бакуловирус используется в качестве вектора производства белков для широкого спектра применения. Бакуловирусная экспрессионная система позволяет быстро разрабатывать и масштабировать процессы производства вакцин, что особенно важно в случаях быстрого реагирования на вспышки инфекционных заболеваний.

Использование бакуловирусной технологии производства дает множество преимуществ. Во-первых, технологическая система BEVS имеет встроенные меры безопасности, которые привлекательны с точки зрения регулирования. Бакуловирусы заражают только клетки насекомых, но не позвоночных [7]; более того, в ходе испытаний на безопасность, проведенных Генеральным директоратом по здравоохранению и защите прав потребителей Европейской комиссии в 2008 году, не было выявлено негативного влияния бакуловирусов на здоровье человека и патогенных, канцерогенных или генотоксических изменений в клетках млекопитающих [8]. Кроме того, бакуловирусы не могут ни реплицироваться внутри трансдуцированных клеток, ни интегрировать свою ДНК в геном хозяина без селективного давления [9]. Во-вторых, геном бакуловируса может вмещать мультигенные вставки, позволяя при этом осуществлять посттрансляционные модификации, необходимые для правильного функционирования белка. Например, бакуловирусная система подходит для экспрессии сложных или трудно экспрессируемых белков, таких как гликопротеины, рецепторы, связанные с G-белками (GPCRs), вирусоподобных частиц (VLPs) и белковых машин [10]. Сравнительное исследование показало лучшую экспрессию белка в клеточной линии насекомых High Five™, чем в системе клеток человека Expi293F, что говорит о том, что система клеток High five особенно подходит для получения трудно экспрессируемых белков [11]. Выбор бакуловирусной системы экспрессии рекомбинантных белков дополнительно был обусловлен тем, что она больше подходит для масштабирования 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 [12].

Кроме того, одна и та же клеточная линия насекомых применима для поливалентного биосинтеза различных рекомбинантных продуктов для получения множества продуктов, особенно в технологиях одноразового использования, требующих быстрого производства.

Наиболее перспективными кандидатами, достигшими III фазы клинических исследований вакцин против COVID-19, в настоящее время выступают препараты, основанные на новых технологиях рекомбинантных нереплицируемых аденовирусных векторов и мРНК, или же классические цельновирионные инактивированные вакцины, технология производства которых требует работы с высоковирулентным патогеном в условиях повышенного уровня биобезопасности (BSL-3). Каждая из указанных технологических платформ имеет свои неоспоримые как преимущества, так и недостатки [13], которые могут либо вывести их на стадию массового производства, или наоборот. Учитывая уже выявленные и потенциальные

проблемы с вышеизложенными вакцинными системами (серьезные нежелательные явления у волонтеров с вакциной AstraZeneca [14]; необходимость хранения и транспортировки мРНК вакцины при минус 70 °C [15]; дороговизна процесса производства инактивированных вакцины в условиях BSL-3, а также риск наличия не полностью убитых вирусных частиц), вероятность их широкомасштабного практического применения под вопросом. В долгосрочной перспективе рынок COVID-19 вакцин с большой степенью вероятности будет принадлежать технологиям на основе рекомбинантных белков, которые на протяжении последнего десятилетия хорошо зарекомендовали себя как эффективная и при этом самая безопасная (на примере вакцин против опоясывающего лишая, менингококка, вируса папилломы человека и гепатита В [16]).

Вирус SARS-CoV-2 имеет 4 структурных белка, такие как S (спайк), белок N (нуклеокапсид), M (матричный) и E (оболочечный). N-белок полностью покрывает РНК вируса, который заключен в липидную оболочку, полученную из мембраны клетки-хозяина, в которую вставлены три других белка (S, M и E). В случае SARS-CoV было показано, что только антитела, направленные на белок S, который состоит из S1 и S2 доменов, могут нейтрализовать вирус и предотвратить инфицирование [17]. Субъединица S1 содержит рецептор-связывающий домен (RBD), который связывается с клеточным рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). Антитела, которые связываются с RBD белка S1, блокируют его взаимодействие с ACE2, и таким образом препятствуют проникновению вируса в клетку [18,19]. В результате, все экспериментальные вакцины против SARS-CoV-2, находящиеся в разработке, включают, по крайней мере, часть белка S. Они могут быть ограничены только субъединицей S1 или RBD. Следует отметить, что не нейтрализующие или слабо нейтрализующие антитела (преимущественно с цельновирионной убитой вакциной) к другим вирусным белкам могут вызывать антителозависимое усиление инфекции [20].

SARS-CoV-2 является патогеном слизистых оболочек, и поэтому защита против него требует не только наличия нейтрализующих антител, но и формирования врожденного и адаптивного клеточного иммунитета [21]. К тому же, перекрестная защита от мутированных вариантов коронавируса может обеспечивать только наличие Т-клеточного иммунного ответа [22]. Путь вакцинации играет решающую роль в формировании необходимого типа иммунитета [23]. Парентеральный (внутримышечный) способ введения, используемый со всеми экспериментальными вакцинами, находящимися на стадии клинических исследований, не способен индуцировать секреторные IgA-антитела на слизистой оболочке вакцинированных, и, следовательно, блокировать инфекцию на этапе проникновения патогена в организм. Более того, этот способ введения не способен индуцировать Т-клетки резидентной памяти легочной ткани (Т-РПЛТ) [24], наличие которых обеспечивает надежную защиту от SARS-CoV [25]. Системный иммунный ответ, включая индуцирование IgA-антительного и Т-РПЛТ ответов возможен только при мукозальном способе иммунизации [21–25]. Интраназальная иммунизация

является наиболее перспективной среди мукозальных методов, и преимущество его заключается в том, что он требует более низких доз и антигены не подвергаются воздействию экстремального pH или пищеварительных ферментов, имеет большую площадь всасывания [26].

Вышеприведенный анализ используемых на сегодня технологий производства, вирусных антигенов и режимов иммунизации показал, что для получения самой безопасной SARS-CoV-2 вакцины необходимо разрабатывать субъединичную вакцину на основе рекомбинантного S белка или ее фрагмента RBD с интраназальным способом введения. К сожалению, данный технологический подход в виде традиционных жидких форм при интраназальном введении демонстрирует низкую иммуногенную эффективность [26,27]. Однако этот недостаток легко устраняется с помощью включения подходящих средств мукозальной доставки белковых субъединиц на основе наночастиц, которые способны защитить вакцину от преждевременной деградации, повысить ее стабильность и обладают хорошими адъювантными свойствами, а также обеспечивают целенаправленную доставку иммуногена в антигенпрезентирующие клетки (АПК) [28,29].

Среди большого разнообразия наночастицеобразующих полимеров для интраназальной доставки – хитозан является наиболее оптимальным и дешевым природным материалом. Хитозан биосовместим и биодоступен, и его положительно заряженные аминогруппы электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженной сиаловой кислотой слизи и эпителиальными поверхностями, становясь слизистым транспортным средством [30]. Конъюгация хитозановых наночастиц с D-маннозой, выступающей лигандом к маннозным рецепторам С-типа (CD206), экспрессируемым на поверхности антигенпрезентирующих клеток [31], способна также придать этому комплексу еще и выраженное адъювантное действие [32–34].

Исходя из требований, изложенных выше, для повышения безопасности и обеспечения мукозального иммунитета в дополнение к гуморальному и клеточному иммунитету, наряду с инъекционной вакциной была предложена технологическая платформа для разработки интраназальной вакцины с применением наночастиц с маннозой в качестве адъюванта. Манноза может специфически связываться с дендритными клетками и активировать их через рецептор маннозы, что имеет решающее значение для запуска мощного иммунного ответа. Такое нацеливание особенно эффективно для интраназальных вакцин, поскольку помогает вызвать сильный иммунный ответ слизистой оболочки, что крайне важно для респираторных патогенов, таких как SARS-CoV-2. Кроме того, модифицированные маннозой наночастицы могут улучшить стабильность и доставку вакцины, обеспечивая эффективное представление антигена иммунной системе.

Таким образом, стремительное распространение SARS-CoV-2 выявило острую мировую потребность в создании эффективных, безопасных и масштабируемых вакцин. В данном разделе была подчёркнута необходимость применения инновационных вакцинных технологий, в частности, рекомбинантных субъединичных вакцин на основе бакуловирусной

технологии. В следующем разделе представлен подробный литературный обзор существующих вакцин против COVID-19, который обосновывает выбор нашего подхода к разработке вакцины.

1.1 Маркетинговый и клинико-экономический анализ рынка вакцин против COVID-19

Разработка вакцин против COVID-19 идет по нескольким научным направлениям. На сегодняшний день существуют вакцины, основанные на мРНК-технологии, вирусных векторах, инактивированных вирусных частицах и субъединичных белках. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки, определяющиеся методами активации иммунного ответа, сложностью производства и требуемыми условиями хранения. Разнообразие препаратов позволило адаптировать вакцинацию к различным группам населения и условиям применения, включая сложные логистические задачи в странах с ограниченной инфраструктурой. Глубокое понимание характеристик каждой из этих вакцинных платформ является основой для оптимального выбора стратегии массовой вакцинации, особенно в условиях постоянной эволюции вируса и появления новых вариантов.

Особое значение в оценке вакцин имеет показатель их эффективности, измеряющий способность вакцины предотвращать симптомы COVID-19 и снижать вероятность тяжелого течения заболевания. Эффективность вакцин варьируется в зависимости от технологии производства и условий проведения клинических исследований, а также от восприимчивости различных популяций и присутствия новых штаммов SARS-CoV-2. Например, мРНК-вакцины демонстрируют высокие показатели эффективности, что делает их предпочтительными для применения в группах риска и при активной циркуляции вируса. Однако важно учитывать не только абсолютные значения эффективности, но и динамическую адаптацию вакцин к эволюционирующему вирусу, что требует постоянного анализа и модификации вакцинных композиций.

Безопасность вакцин также занимает центральное место в их оценке, поскольку массовая иммунизация требует всесторонней проверки на наличие побочных эффектов и реакции организма. Для различных типов вакцин характерен определенный профиль безопасности, связанный с их биологической конструкцией и методами введения. Вакцины на основе мРНК и вирусных векторов обладают более выраженными побочными эффектами, включая редкие, но серьезные осложнения. В то же время инактивированные и субъединичные вакцины обычно имеют менее выраженные побочные реакции, что делает их более предпочтительными для уязвимых групп населения. В данной главе анализируются доступные данные по безопасности каждого типа вакцин, что позволяет определить их пригодность для разных категорий людей и условий применения.

Не менее важны и логистические аспекты, включая условия хранения и транспортировки вакцин. Вакцины на основе мРНК требуют строгих температурных условий, что затрудняет их использование в странах с ограниченной инфраструктурой. В отличие от них, инактивированные и

субъединичные вакцины могут храниться при более высоких температурах, что облегчает их транспортировку и массовое применение. Данный раздел направлен на детализированный анализ всех типов вакцин, чтобы предоставить целостное представление об их сильных и слабых сторонах.

В связи с этим целесообразно углубленно изучить эффективность, профили безопасности, особенности формируемого иммунного ответа, а также логистические характеристики каждого из указанных технологических подходов на примере двух репрезентативных препаратов для каждого типа.

мРНК-вакцины

Pfizer-BioNTech (BNT162b2, Comirnaty)

Pfizer-BioNTech стала первой коммерчески доступной мРНК-вакциной против COVID-19. В ходе клинических испытаний фазы III она показала 95 % эффективность в предотвращении симптоматического COVID-19 среди участников, не имевших предшествующей инфекции SARS-CoV-2. Эти данные, опубликованные в *New England Journal of Medicine*, также подтверждают высокую эффективность вакцины против тяжелых форм заболевания [35]. Побочные эффекты вакцины Pfizer-BioNTech включают боль в месте инъекции (84,1 %), усталость (62,9 %) и головную боль (55,1 %). Были зафиксированы редкие случаи миокардита, особенно у молодых мужчин, что требует дальнейшего изучения и наблюдения [36]. Вакцина стимулирует выработку высоких уровней нейтрализующих антител и активирует CD4+ Т-клетки, обеспечивая как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [37]. Тем не менее, ее хранение требует температуры -70 °C, что создает дополнительные сложности для транспортировки и хранения.

Moderna (mRNA-1273)

Вакцина Moderna mRNA-1273 продемонстрировала эффективность 94,1 % в клинических испытаниях фазы III. Данные, опубликованные в *NEJM,* подчеркивают, что вакцина Moderna эффективна против легких и тяжелых форм COVID-19 [38]. Наиболее частые побочные эффекты включают боль в месте инъекции (91,6 %), усталость (68,5 %) и головную боль (63,0 %) [39]. Миокардит был зарегистрирован как редкий побочный эффект, аналогично Pfizer-BioNTech, что требует осторожности при применении вакцины у молодых мужчин [36]. Иммунный ответ, вызванный вакциной Moderna, характеризуется высокой концентрацией нейтрализующих антител и значительной активацией Т-клеток, что усиливает её способность к защите от SARS-CoV-2 и его мутаций [40]. В отличие от Pfizer-BioNTech, она требует температуры хранения -20 °C, что делает ее более доступной в плане логистики.

Векторные вакцины

AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19, Vaxzevria)

Эффективность вакцины AstraZeneca составляет около 70,4 %. Эти данные, опубликованные в *Lancet*, подчеркивают, что вакцина эффективна как против легких, так и тяжелых форм COVID-19, а также зависит от интервала между дозами [41]. Побочные эффекты включают усталость (53,1 %) и головную боль (52,6 %), но редкие случаи тромбоза с тромбоцитопенией

вызывают особое внимание к безопасности вакцины, особенно у женщин моложе 50 лет [42]. Иммунный ответ на AstraZeneca состоит из выраженного гуморального и клеточного компонентов, что обеспечивает долговременную защиту от вируса. Данные исследований Folegatti et al. подтверждают её способность активировать Т-клетки и выработку антител [43]. Вакцина стабильна при 2–8 °C, что делает её удобной для использования в регионах с ограниченной холодовой цепью [41].

Johnson & Johnson (Ad26.COV2.S, Janssen)

Эффективность вакцины Johnson & Johnson составляет 66,9 %, что позволяет использовать её для предотвращения умеренных и тяжелых форм COVID-19. Эти данные опубликованы в *NEJM* [44]. Вакцина характеризуется хорошим профилем безопасности, хотя зафиксированы редкие случаи тромбозов [45]. Наиболее распространенными побочными эффектами являются головная боль (38,9 %) и усталость (38,2 %) [44]. Стимулируя как гуморальный, так и клеточный иммунитет, Johnson & Johnson создает длительную защиту от COVID-19, что подтверждено в исследовании Stephenson [46]. Вакцина стабильна при 2–8 °C, что значительно облегчает её транспортировку [44].

Инактивированные вакцины

Sinopharm (BBIBP-CorV)

Sinopharm демонстрирует эффективность около 79 % в предотвращении симптоматического COVID-19, что подтверждено в ОАЭ [47]. Профиль безопасности Sinopharm указывает на низкую частоту побочных эффектов, таких как боль в месте инъекции и умеренная лихорадка, что делает её предпочтительной для массовой вакцинации уязвимых групп населения [48]. Хотя клеточный иммунитет, вызванный Sinopharm, менее выражен по сравнению с другими вакцинами, вакцина индуцирует стабильный гуморальный ответ с выработкой антител [49]. Она может храниться при 2–8 °C, что делает её более доступной для использования в развивающихся странах.

Sinovac (CoronaVac)

Вакцина Sinovac продемонстрировала эффективность, варьирующуюся от 50,4 % до 83,5 %, что зависит от условий испытаний и региональных различий [50]. Sinovac имеет благоприятный профиль безопасности, минимизируя риск побочных эффектов. Наиболее частыми симптомами после вакцинации являются головная боль и легкая усталость [51]. Хотя клеточный иммунный ответ слабее, вакцина вызывает значительный гуморальный ответ, способствуя выработке антител, что помогает защитить от COVID-19. Хранение при 2–8 °C облегчает её транспортировку.

Субъединичные вакцины

Novavax (NVX-CoV2373)

Вакцина Novavax показала эффективность 89,7 %, что делает её одной из наиболее перспективных вакцин против COVID-19. Исследование в *NEJM* подтверждает её эффективность против новых штаммов SARS-CoV-2 [52]. Вакцина вызывает низкий уровень побочных эффектов, таких как боль в месте инъекции, головная боль и усталость, что делает её более приемлемой для широкого круга населения [52]. NVX-CoV2373 обеспечивает сильный

иммунный ответ с выработкой нейтрализующих антител и активацией CD4+ Т-клеток [53]. Вакцина стабильна при 2–8 °С, что значительно упрощает её хранение и транспортировку.

На сегодняшний день предлагаются различные вакцинные препараты, среди которых особенно перспективны субъединичные вакцины, обладающие высоким профилем безопасности и удобством производства. Настоящее исследование сфокусировано именно на использовании бакуловирусной экспрессионной системы, обладающей рядом ключевых преимуществ для получения сложных рекомбинантных белков.

Особое внимание следует уделить анализу отечественного фармацевтического рынка Республики Казахстан. В период острой фазы пандемии для массовой иммунизации населения применялись преимущественно препараты зарубежного производства, получившие регистрационные удостоверения МЗ РК: векторные (Спутник V, РФ), инактивированные (Hayat-Vax/Sinopharm и CoronaVac, Китай), а также мРНК-вакцины (Comirnaty/Pfizer, США/Германия). Выдающимся достижением отечественной науки стала разработка и внедрение инактивированной вакцины QazVac [54,55]. Тем не менее, потребность здравоохранения РК в высокотехнологичных рекомбинантных субъединичных препаратах, особенно для безыгольного (мукозального) применения, остается неудовлетворенной. Абсолютное большинство разрабатываемых сегодня инновационных вакцин представлено зарубежными производителями. В связи с этим, создание отечественных лекарственных форм субъединичных вакцин с использованием передовых систем доставки является стратегически важной задачей. Это не только обеспечит национальную биологическую безопасность, но и станет важным шагом в реализации государственной программы импортозамещения в фармацевтической отрасли с последующим потенциалом экспорта на международные рынки.

1.2 Заключение по эффективности, безопасности, иммунному ответу и логистике существующих вакцин против COVID-19

Эффективность

Эффективность вакцин против COVID-19 варьируется в зависимости от применяемой технологии и особенностей популяций, на которых они тестировались. мРНК-вакцины, такие как Pfizer-BioNTech и Moderna, продемонстрировали выдающиеся результаты: их эффективность в предотвращении симптоматического COVID-19 достигает 95 % и 94,1 % соответственно. Эти показатели делают их особенно ценными для защиты людей, находящихся в группе высокого риска тяжелого течения болезни. Векторные вакцины, например AstraZeneca и Johnson & Johnson, также показали хорошую эффективность – в среднем от 66 % до 70 %, – обеспечивая при этом надежную защиту от тяжелых форм заболевания и необходимости госпитализации. Инактивированные вакцины, такие как Sinopharm и Sinovac, имеют более низкие показатели эффективности, варьирующиеся от 50 % до 79 %, что, вероятно, потребует введения дополнительных доз для поддержания долгосрочной защиты. Субъединичные вакцины, такие как Novavax, с

эффективностью 89,7 %, выделяются своим потенциалом: они обеспечивают достойную защиту, оставаясь при этом стабильными и универсальными в применении.

Безопасность

С точки зрения безопасности инактивированные и субъединичные вакцины имеют явное преимущество благодаря низкой частоте серьезных побочных эффектов, таких как миокардит или тромбозы. Это делает их подходящими для людей с хроническими заболеваниями и уязвимых групп населения. Напротив, мРНК- и векторные вакцины, несмотря на их высокую эффективность, чаще вызывают системные побочные реакции – усталость, головные боли, боль в месте укола, – а в редких случаях связаны с более серьезными осложнениями, такими как миокардит или тромбозы, особенно у лиц моложе 50 лет. Эти риски требуют тщательного наблюдения и, возможно, предварительного медицинского обследования перед вакцинацией.

Иммунный ответ

мРНК и векторные вакцины отличаются мощным иммунным ответом, который включает как гуморальные, так и клеточные компоненты. Они обеспечивают высокий уровень нейтрализующих антител и стимулируют долговременную активность Т-клеток, что крайне важно для защиты от вируса и его мутаций. Инактивированные вакцины, напротив, в основном индуцируют гуморальный иммунитет, но их способность активировать клеточный ответ ограничена, из-за чего они менее эффективны против быстро мутирующих штаммов. Субъединичные вакцины выделяются своей способностью вызывать сильный гуморальный ответ, а при использовании адъювантов их можно адаптировать для стимуляции клеточного иммунитета, что делает их перспективным инструментом в борьбе с вирусными инфекциями.

Логистика и хранение

Логистические аспекты играют ключевую роль в доступности вакцин. мРНК-вакцины требуют хранения при экстремально низких температурах (-70 °C для Pfizer-BioNTech и -20 °C для Moderna), что создает значительные трудности в регионах с ограниченной инфраструктурой. Векторные, инактивированные и субъединичные вакцины, напротив, стабильны при стандартных холодильных температурах (2–8 °C), что облегчает их массовое применение, особенно в странах с развивающейся системой здравоохранения. Особенно выделяются субъединичные вакцины: их простые требования к хранению и транспортировке дают им преимущество для глобального распространения, в том числе в условиях ограниченных ресурсов.

Перспективы применения субъединичных вакцин в медицине

Субъединичные вакцины представляют собой одно из самых передовых направлений в разработке профилактических мер против инфекционных заболеваний. Их конструкция, основанная на использовании отдельных антигенных белков вируса, обеспечивает точную активацию иммунного ответа без рисков, связанных с генетическим материалом или живыми агентами. Рассмотрим ключевые причины, почему они являются наиболее перспективными для будущих вакцин:

1) субъединичные вакцины состоят из очищенных белков вируса, что исключает возможность репликации и минимизирует риск побочных эффектов. Это делает их безопасными для широкого круга людей, включая пожилых и иммунокомпрометированных пациентов, что особенно важно в условиях пандемии;

2) стабильность при 2–8 °C позволяет использовать субъединичные вакцины даже в регионах с ограниченной инфраструктурой, расширяя их доступность для развивающихся стран и удаленных территорий;

3) технология субъединичных вакцин позволяет быстро включать новые антигенные белки для защиты от мутирующих штаммов SARS-CoV-2 и других вирусов, что критически важно в условиях изменчивости патогенов;

4) вакцины идеально подходят для повторных прививок, усиливая иммунитет без значительных побочных реакций, что делает их практичным решением для долгосрочной защиты населения.

Таким образом, субъединичные вакцины выделяются как оптимальный выбор для разработки будущих вакцинных лекарственных форм. Их безопасность, простота логистики, гибкость и пригодность для массового применения делают их незаменимым инструментом для длительного контроля над такими вирусами, как SARS-CoV-2, и предотвращения будущих пандемий. Эти качества позволяют рассматривать субъединичные вакцины как основу для создания новых поколений вакцин, способных отвечать вызовам современной медицины.

1.3 Выбор белка (антигена) для разработки субъединичных вакцин

Вирус SARS-CoV-2 и его Spike-белок

Вирус SARS-CoV-2 имеет сферическую форму с характерными шиповидными белками, выступающими над поверхностью, что придаёт ему вид короны, откуда и происходит название «коронавирус». Эти шиповидные белки играют ключевую роль в проникновении вируса в клетки хозяина. Spike-белок представляет собой тримерный шиповидный гликопротеин, состоящий из 1273 аминокислотных остатков. Через трансмембранный домен он прикрепляется к вирусной мембране. Вирус использует этот белок для прикрепления и слияния с клетками хозяина.

Spike-белок состоит из двух сегментов: S1 (14–685 аминокислотных остатков) и S2 (686–1273 аминокислотных остатков). Рецептор-связывающий домен (RBD), расположенный в сегменте S1, связывается с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) на поверхности клеток хозяина. После этого белок расщепляется фуриноподобной протеазой или трансмембранной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2) либо катепсинами B и L на участке S1/S2 [56]. Это расщепление приводит к диссоциации сегмента S1 и активирует участок S2, вызывая необратимое сворачивание белка в постфузионную конформацию. Постфузионная структура формируется за счёт взаимодействия гептадных повторов HR1 и HR2 [57], что необходимо для слияния вирусной и клеточной мембран [56].

Иммунный ответ и вакцины на основе белка Spike

Поскольку Spike-белок связывается с рецептором ACE2 и инициирует проникновение в клетку, наличие нейтрализующих антител, связывающихся с белком spike, может блокировать это взаимодействие и предотвратить проникновение вируса в клетки хозяина. Поэтому вакцины, индуцирующие выработку антител против белка шипа, могут обеспечить защиту от SARS-CoV-2 [58]. Вакцины на основе шиповатого белка могут вызывать выраженный иммунный ответ, включая выработку нейтрализующих антител, а также клеточный иммунный ответ с участием Т-клеток [43]. Несмотря на то, что эти вакцины обеспечивают как немедленную, так и длительную защиту от инфекции, последние исследования подчеркивают наличие мутаций в РБД, которые постоянно приводят к появлению новых вариантов, что требует создания вакцин, способных обеспечить широкую перекрестную защиту. Исследование показало, что мутация S982A в альфа-варианте значительно влияет на стабильность и конформацию пептида при связывании с HLA-A02:01 по сравнению с оригинальным пептидом S976-984. Исследование также показало, что CD8+ Т-клетки специфичные к пептиду S975, проявляют слабую перекрестную реактивность по отношению к мутантным пептидам [59]. Аналогично, такие мутации, как K444T и N460K в омикроне [60], K417 N/T [61], E484K в бета и гамма [62], усиливают способность варианта уклоняться от иммунного ответа, индуцированного вакцинами. Lustig et al. сообщили о взаимосвязи между уровнями IgG против предкового штамма SARS-CoV-2 (WT-RBD) и уровнями нейтрализующих антител против современных циркулирующих вариантов XBB. По сравнению с 2022 годом, в 2023 году наблюдались значительно более высокие титры нейтрализующих антител против вариантов XBB. Этот сдвиг был объяснен увеличением воздействия вариантов, связанных с XBB, в 2023 году, что привело к выработке специфических антител против этих вариантов, в то время как уровень IgG к WT-RBD снизился.

Хотя не все вакцины основаны на очищенном S-белке, он по-прежнему важен для ряда других применений. Его используют для получения антител для диагностических анализов [63–65], изучения конформации белка [66], взаимодействия с рецепторами хозяина [62,67] и механизмов проникновения вируса, а также для исследования эволюции вируса, включая мутации, влияющие на трансмиссивность, иммуногенность [68], антигенность и эффективность вакцин. Кроме того, очищенные S-белки используются в серологических анализах для выявления антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови пациентов [69–71]. Кроме того, spike-белки исследуются для скрининга малых молекул ингибиторов, которые могут препятствовать проникновению или репликации вируса [72]. Во всех этих случаях достижение высокого уровня экспрессии белка-шипа без необходимости проведения длительных этапов очистки имеет важное значение для обеспечения экономической жизнеспособности производства вакцин. Эффективная экспрессия и масштабируемость спайкового белка достигаются с помощью различных доступных систем экспрессии [72]. Такие технологии, как системы экспрессии рекомбинантных белков, культуры клеток и платформы на основе мРНК, также

позволяют быстро генерировать антигены шиповидных белков, ускоряя сроки разработки вакцин. В данном обзоре рассматриваются исследования, проведенные в области получения белка шипа в различных системах экспрессии.

Разработка эффективных субъединичных вакцин против SARS-CoV-2 требует тщательного выбора антигенной мишени, способной индуцировать сильный и специфический иммунный ответ. Основными кандидатами на роль антигена являются спайковый белок (Spike-белок), его рецептор-связывающий домен (RBD), нуклеокапсидный белок (N-белок), мембранный белок (M-белок) и вспомогательный белок ORF8. Каждый из этих белков обладает уникальными характеристиками, влияющими на их потенциал в вакцинологии. Основными кандидатами являются:

1) спайковый белок (Spike-белок) – ключевой компонент вируса, отвечающий за связывание с ACE2. Антитела против S-белка способны нейтрализовать вирус. Однако его высокая мутационная активность может снижать эффективность вакцин;

2) рецептор-связывающий домен (RBD) – часть S-белка, непосредственно взаимодействующая с ACE2. Вакцины на основе RBD индуцируют высокоспецифичный иммунный ответ, но могут быть менее эффективными из-за ограниченной длины пептидной цепи;

3) нуклеокапсидный белок (N-белок) – внутренний компонент вируса, защищающий его РНК-геном. N-белок обладает высокой консервативностью среди штаммов SARS-CoV-2, но менее доступен для антител;

4) мембранный белок (M-белок) – структурный компонент оболочки вируса. Он перспективен для создания вакцин с перекрёстной реактивностью;

5) вспомогательный белок ORF8 – участвует в модуляции иммунного ответа хозяина и подавляет экспрессию молекул MHC-I.

Тщательный анализ характеристик каждого белка и их взаимодействия с иммунной системой позволит создать эффективные и безопасные вакцины, способные обеспечить долгосрочную защиту от SARS-CoV-2 и его вариантов.

Белок Spike-белок и особенно его рецептор-связывающий домен (RBD) являются ключевыми мишенями для разработки вакцин, так как индуцируют выраженный нейтрализующий иммунный ответ. Поэтому именно эти антигены были выбраны для конструирования рекомбинантных вакцин в настоящем исследовании.

1.4 Способы введения вакцин

В отличие от традиционного парентерального введения, которое индуцирует преимущественно системный иммунитет, мукозальная (в частности, интраназальная) вакцинация позволяет сформировать первый эшелон защиты непосредственно во входных воротах инфекции – на слизистой оболочке респираторного тракта.

Как показывают исследования, такой подход обеспечивает не только синтез секреторных антител класса IgA, но и генерацию Т-клеток резидентной памяти легочной ткани, критически важных для перекрестной защиты от мутирующих штаммов коронавируса. Тем не менее, основным

технологическим барьером жидких интраназальных форм является низкая биодоступность белковых антигенов из-за их быстрой деградации и мукоцилиарного клиренса. Для преодоления этого ограничения в современной фармацевтической разработке применяются полимерные системы доставки.

Оптимальным кандидатом среди них выступает хитозан – биосовместимый катионный полимер. За счет положительного заряда он электростатически взаимодействует с сиаловыми кислотами эпителия, обеспечивая сильную мукоадгезию и увеличивая время контакта антигена со слизистой. Более того, направленная функционализация хитозановых наночастиц D-маннозой позволяет реализовать таргетную доставку иммуногена. Макрофаги и дендритные клетки слизистых оболочек экспрессируют кальций-зависимые маннозные рецепторы (CD206), через которые происходит активный захват наночастиц, что придает такой системе выраженные адъювантные свойства и запускает выраженный иммунный ответ.

Маркетинговый анализ рынка интраназальных иммунобиологических препаратов

Анализ фармацевтического рынка показывает высокую клинико-экономическую востребованность интраназальных лекарственных форм для профилактики и лечения респираторных вирусных инфекций. В настоящее время в медицинской практике широко применяются такие препараты, как бактериальные лизаты (ИРС-19), пептидные иммуномодуляторы (Тимоген спрей, Тималин), а также препараты на основе рекомбинантного интерферона (Гриппферон, Назоферон и др.). Несмотря на существенные различия в составе действующего вещества и механизмах действия (неспецифическая стимуляция иммунитета или прямое противовирусное действие), все эти препараты объединены общей терапевтической целью и способом введения. Их высокая эффективность обусловлена доставкой активного компонента непосредственно во входные ворота инфекции – на слизистую оболочку дыхательных путей. Многолетний успешный опыт применения перечисленных коммерческих препаратов подтверждает технологическую, медицинскую и рыночную целесообразность разработки интраназальной формы субъединичной вакцины против SARS-CoV-2.

Технологическое обоснование выбора полимерных наносистем для мукозальной доставки

Выбор оптимального носителя является критическим этапом фармацевтической разработки интраназальной формы. Среди доступных технологических подходов выделяются липидные наночастицы (LNP) и полимерные частицы (например, на основе PLGA или хитозана). Использование LNP сопряжено со строгими логистическими ограничениями, ввиду необходимости ультранизких температур хранения, а наночастицы PLGA в процессе деградации создают локальную кислую среду, способную денатурировать белковый антиген. В связи с этим хитозан представляет собой наиболее оптимальный, биосовместимый и экономически рентабельный природный полимер для интраназальной доставки. Благодаря положительному заряду аминогрупп хитозан обладает выраженной мукоадгезией – он

электростатически взаимодействует с отрицательно заряженной сиаловой кислотой муцинов слизистой оболочки, значительно увеличивая время удержания препарата в носовой полости (снижая эффект мукоцилиарного клиренса). Для обеспечения активной таргетной доставки хитозановые наночастицы были конъюгированы с D-маннозой. Дендритные клетки и макрофаги слизистых оболочек активно экспрессируют кальций-зависимые маннозные рецепторы (CD206). Таким образом, комбинация хитозана и маннозы не просто выполняет транспортную функцию, но и обладает синергизмом с действующим веществом: она защищает рекомбинантный белок от ферментативной деградации, обеспечивает мукоадгезию и осуществляет направленный рецептор-опосредованный захват антигена иммунными клетками, выступая в роли мощного мукозального адъюванта.

1.5 Перспективы применения бакуловирусной технологии для получения рекомбинантного белка

Экспрессия spike белка в кишечной палочке

Кишечная палочка (*E. coli*) является одним из наиболее популярных и экономически выгодных организмов-хозяев для получения рекомбинантных белков. Это объясняется её способностью быстро расти и обеспечивать высокие уровни экспрессии, что делает её удобной для масштабного промышленного производства. В частности, спайковые белки, полученные с помощью этой бактерии, широко применяются в структурных исследованиях, для получения антигенов и разработки вакцин. Обычно в *E. coli* экспрессируют не весь spike-белок целиком, а его отдельные фрагменты или конструкции, слитые с рецептор-связывающим доменом (RBD) [73]. Рецептор-связывающий домен (RBD) – это участок spike-белка, который меняет свою пространственную структуру при взаимодействии с рецепторами клетки-хозяина. Структурно RBD состоит из двух основных элементов: мотива связывания с рецептором (RBM), представленного удлинённой петлёй, которая непосредственно контактирует с рецептором ACE2 хозяина, и основного субдомена, образованного пятицепочечным антипараллельным β-листом с короткими спиралями и петлями [74]. Именно RBD представляет собой ключевую мишень для нейтрализующих антител как при естественном течении инфекции, так и при вакцинации. Большинство исследований посвящено именно экспрессии и очистке RBD, а не полного spike-белка. При этом иммуногенность полученных конструкций проверяется на животных моделях как с использованием адъювантов, так и без них. Важным преимуществом использования *E. coli* является высокая продуктивность процесса и низкие затраты по сравнению с аналогичными подходами на основе клеток млекопитающих или дрожжей. В ряде исследований были созданы химерные белки SARS-CoV-2, содержащие различные эпитопы вируса или слитые с другими белками; их иммуногенность была успешно подтверждена молекулярными методами анализа.

В качестве примера можно привести конструкцию RBD-C9R, где к С-концу рецептор-связывающего домена (RBD) был присоединён специальный пептид (SEP), повышающий растворимость белка. Данный белок успешно экспрессировали в *E. coli* и использовали для иммунизации мышей.

Исследования показали, что у животных развивался иммунный ответ по типу Т-хелперных клеток второго типа, сопровождаемый высокими титрами антител класса IgG в сыворотке крови. Кроме того, иммуноферментный анализ подтвердил эффективное взаимодействие полученного антигена как с собственной формой белка, так и со spike-белком S1, экспрессированным в клетках млекопитающих [75]. Однако следует учитывать ограничения бактериальной системы: несмотря на способность фрагментов spike-белка взаимодействовать с рецепторами ACE2 и антителами хозяина, *E. coli* не обладает необходимым клеточным аппаратом для полноценного сворачивания сложных эукариотических белков и проведения посттрансляционных модификаций (ПТМ). В результате экспрессируемые в *E. coli* фрагменты spike-белка лишены гликозилирования и других PTM, которые критически важны для формирования нативной структуры и полноценной функциональности антигена. Интересный подход был предложен Мацунагой с соавторами: они экспрессировали RBD в грамположительной бактерии *Brevibacillus choshinensis* без использования каких-либо дополнительных меток для повышения растворимости белка. Полученный таким образом RBD по своей структуре оказался близок к аналогичному домену из эукариотических систем экспрессии. Было показано также эффективное связывание полученного бактериального RBD с антителом C121, экспрессированным на той же системе. При этом RBD исходного типа демонстрировал более высокое сродство к антителу по сравнению с вариантом Omicron [76].

Экспрессия spike белка в дрожжах

Дрожжевые системы экспрессии обеспечивают корректное сворачивание эукариотических белков и выполнение посттрансляционных модификаций (ПТМ), включая гликозилирование, которые имеют важное значение для формирования нативной структуры и функциональной активности S-белков. Эти системы характеризуются высокими уровнями экспрессии и хорошей масштабируемостью, что делает их подходящими как для фундаментальных исследований, так и для промышленного производства. Например, при сравнении выхода рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2 в дрожжевой системе *P. pastoris* и клеточной линии млекопитающих HEK-293T было показано, что из *P. pastoris* возможно получить более 45 мг/л белка с чистотой около 90 % [77].

Помимо использования *P. pastoris* для получения RBD, в ряде исследований полный spike-белок [78] или его рецептор-связывающий домен (RBD) экспонировали на поверхности клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Такой подход потенциально может стать экономически выгодным решением для крупномасштабного производства вакцинных препаратов. Например, Арора и коллеги разработали систему на основе *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующую полный spike-белок SARS-CoV-2 и формирующую вирусоподобные частицы (VLP). Полученные частицы были тщательно охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и динамического светорассеяния (ДЛС) [79]. Однако стоит отметить, что

дрожжевые системы не всегда способны обеспечить полностью нативный профиль гликозилирования по сравнению с системами клеток млекопитающих, что может влиять на антигенные свойства полученных белков.

Экспрессия spike белка в клетках млекопитающих

Клеточные линии млекопитающих обеспечивают оптимальную среду для правильного сворачивания сложных эукариотических белков и проведения необходимых посттрансляционных модификаций, включая гликозилирование. Это позволяет получать функционально активные белки-шипы с нативной структурой. Такие клеточные линии широко используются для производства рекомбинантных белков терапевтического назначения, включая вакцинные препараты. Например, рецептор-связывающий домен spike-белка SARS-CoV-2 успешно экспрессировали в клеточных линиях CHO и HEK293. Структурный анализ выявил различия в профиле гликозилирования: RBD, полученный из клеток HEK293, характеризовался антенным фукозилированием, повышенным уровнем сиалилирования и смесью гликанов сердцевины 1 и сердцевины 2, включая O-гликозилирование по остатку T323 [66]. Несмотря на преимущества клеток млекопитающих в обеспечении правильного сворачивания и посттрансляционных модификаций, такие системы имеют ряд недостатков: они значительно дороже и более трудоемки по сравнению с микробными системами экспрессии. Кроме того, клетки млекопитающих характеризуются более низкой скоростью роста и меньшим выходом целевого белка, что ограничивает их применение при организации крупномасштабного производства.

Экспрессия spike белка в бакуловирусной системе

Система бакуловирусных векторов экспрессии (BEVS) представляет собой одну из наиболее перспективных биотехнологических систем для создания биопрепаратов, включая субъединичные вакцины. Эта технология обладает рядом ключевых преимуществ:

Во-первых, система BEVS отличается высокой безопасностью, что особенно важно для регулирования и лицензирования. Бакуловирусы заражают исключительно клетки насекомых, не воздействуя на другие виды позвоночных, в том числе млекопитающих [9]. Исследование Европейской комиссии (2008) подтвердило отсутствие патогенных, канцерогенных и генотоксических эффектов бакуловирусов на клетки человека [8]. Эти данные делают BEVS привлекательной для безопасного производства вакцин, поскольку ДНК бакуловирусов не интегрируется в геном клетки-хозяина и не реплицируется в ней при отсутствии селективного давления [9].

Во-вторых, бакуловирусы обладают способностью включать большие генные вставки, что позволяет экспрессировать мультигенные комплексы и крупные белки. Эта особенность делает BEVS удобной для работы со сложными белками, включая ферменты, вирусоподобные частицы (VLPs) и рецепторы, связанные с G-белками (GPCRs) [10]. BEVS оказалась более эффективной для производства трудных в экспрессии белков в клеточной линии насекомых High Five™, чем в системе клеток человека Expi293F, что подтверждено [11] в сравнительном исследовании.

Ещё одно важное преимущество – это возможность масштабирования в бессывороточной среде. Клетки насекомых можно выращивать в суспензии, что упрощает процесс масштабирования и снижает затраты на очистку конечного продукта. Например, клетки SF+ успешно использовались для производства белков в объёмах от 2 до 21 000 литров [12]. Отсутствие сыворотки также упрощает очистку конечного продукта и исключает необходимость работы с живыми патогенами.

Кроме того, технологическая система BEVS быстро адаптируется к новым вызовам, таким как эпидемии или пандемии. В отличие от традиционных платформ для производства инактивированных вакцин, BEVS не требует работы с опасными патогенами, что значительно сокращает время подготовки и делает процесс более безопасным [8]. На рынке уже существуют одобренные препараты, созданные с использованием этой технологии, такие как Flublok® и NVX-CoV2373.

Недостатки и ограничения бакуловирусной технологии

Несмотря на явные преимущества, система BEVS также сталкивается с рядом проблем. Во-первых, цитопатические эффекты бакуловирусов вызывают лизис клетки-хозяина, что ограничивает выход конечного продукта. Эти эффекты могут снизить продуктивность системы по сравнению с экспрессией в клетках млекопитающих [80]. Кроме того, N-гликозилирование белков, экспрессируемых в клетках насекомых, отличается от такового в клетках млекопитающих, что может оказывать влияние на иммуногенность и стабильность рекомбинантного белка [81]. Иммунные реакции также представляют собой сложность для использования BEVS в терапевтических целях. При введении рекомбинантные белки, полученные с помощью бакуловирусов, могут вызывать выброс воспалительных цитокинов и активацию пути комплемента. Такие иммунные реакции могут привести к снижению экспрессии трансгенов и нестабильности вирусного генома, что ограничивает долговечность эффекта [80].

Наконец, несмотря на высокую производительность, система BEVS требует постоянной оптимизации. Современные исследования сосредоточены на улучшении вирусных векторов, модификации генома бакуловирусов и совершенствовании клеток-хозяев для повышения эффективности системы. Эти молекулярные улучшения расширяют возможности BEVS и повышают её потенциал для создания биопрепаратов [80].

В данном разделе был проведён подробный анализ существующих технологических подходов к разработке и применению вакцин против COVID-19, включая детальное сравнение препаратов на основе мРНК, вирусных векторов, инактивированных вирусов и рекомбинантных белковых субъединиц. Были рассмотрены их преимущества и недостатки по таким ключевым аспектам, как эффективность профилактики, профиль безопасности, устойчивость иммунного ответа и логистические особенности применения. Маркетинговый анализ отечественного фармацевтического рынка показал высокую зависимость от зарубежных производителей и острую необходимость в реализации программ импортозамещения.

В связи с этим особое внимание было уделено субъединичным вакцинам, которые показали значительный коммерческий и медицинский потенциал благодаря своей высокой безопасности, хорошей иммуногенности, стабильности при хранении и простоте транспортировки. В рамках обзора был проведён анализ выбора антигенов, в частности Spike-белка и его рецептор-связывающего домена (RBD), а также обоснован выбор мукозального пути иммунизации. Анализ коммерчески успешных интраназальных иммуномодуляторов подтвердил перспективность данного способа введения.

Установлено, что эффективность интраназальных вакцин может быть многократно повышена за счёт использования инновационных систем доставки – хитозановых наночастиц, конъюгированных с маннозой, которые обеспечивают мукоадгезию, защиту антигена от деградации и его таргетную доставку к антигенпрезентирующим клеткам. Таким образом, проведённый клинико-экономический и технологический обзор литературы подчёркивает актуальность разработки отечественных субъединичных вакцин с использованием традиционного и мукозального путей введения. Сформулированные выводы послужили научно-технологическим обоснованием для выбора методов исследования, которые описаны в следующем разделе диссертации.

2 Материалы и методы исследования

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Объекты исследования

– Рекомбинантный белок S-ECD – экстраклеточный домен полноразмерного Spike белка вируса SARS-CoV-2 (изолят Wuhan-Hu-1); – Рекомбинантный белок RBD рецептор-связывающий домен спайкового белка SARS-CoV-2 (вариант Omicron BA.5).

Физико-химические и биологические свойства обеих субстанций представляют собой прозрачные растворы в фосфатно-солевом буфере (PBS) без видимых механических включений. Для поддержания термодинамической стабильности белковых глобул и предотвращения их агрегации водородный показатель (pH) строго регламентирован в узком физиологическом диапазоне от 7,0 до 7,4. Концентрация целевого белка, определяемая спектрофотометрически, варьируется в зависимости от молекулярной массы и уровня экспрессии. Сводная спецификация показателей качества обеих активных фармацевтических субстанций приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Сводная спецификация показателей качества рекомбинантных АФС (белки RBD и Spike)

Наименование показателя	Нормативные требования для RBD	Нормативные требования для Spike	Метод контроля
Описание	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость	Визуальный контроль
Идентификация (электрофорез)	Молекулярная масса гликозилированной формы по данным SDS-PAGE – 25–28 кДа	Молекулярная масса гликозилированной формы по данным SDS-PAGE – 140–160 кДа	ОФС 2.2.31 Фармакопеи ЕАЭС (SDS-PAGE в восстановительных условиях)
Специфичность	Положительная реакция с анти-RBD антителами	Положительная реакция с анти-Spike антителами	Иммуноблоттинг (Western Blot)
Количественное определение	От 1,0 до 2,0 мг/мл	От 0,5 до 1,0 мг/мл	Спектрофотометрия при 280 нм
Водородный показатель (pH)	7,0 – 7,4	7,0 – 7,4	ОФС 2.2.3 Фармакопеи ЕАЭС (Потенциометрия)
Извлекаемый объем	Не менее 1,0 мл	Не менее 1,0 мл	Гравиметрический/волюметрический метод
Бактериальные эндотоксины	Не более 1,0 ЭЕ/мкг белка	Не более 1,0 ЭЕ/мкг белка	Метод с рекомбинантным фактором С (рФС)
Стерильность	Стерильно	Стерильно	ОФС 2.1.6.1 Фармакопеи ЕАЭС (Прямой посев, 14 суток)
Остаточная ДНК	<10 нг на дозу	<10 нг на дозу	Флуоресценция ДНК

В качестве первичной упаковки для АФС (промежуточного продукта) используются стерильные апирогенные полипропиленовые микропробирки вместимостью 1,5 мл с резьбовой крышкой, объём заполнения 1 мл. Транспортная упаковка и этикетирование осуществляются в соответствии с ГОСТ 17768-90Е. Оптимальный режим хранения, гарантирующий отсутствие протеолитической деградации и сохранение антигенной структуры в течение заявленного срока годности, обеспечивается в защищенном от света месте при температуре -20 °C.

– Субъединичная вакцина NARUVAX-C19 – адъювантированная лекарственная форма для внутримышечного введения на основе белков S-ECD или RBD в сочетании с эмульсионным адъювантом Sepivac SWE™;

– Нановакцина NARUVAX-C19/Nano – интраназальная лекарственная форма, представляющая собой рекомбинантный RBD-белок, инкапсулированный в модифицированные маннозой хитозановые наночастицы с добавлением адъюванта CpG 55.2;

– Препарат сравнения RBD-Alum – контрольная адъювантированная композиция для внутримышечного введения на основе рекомбинантного белка RBD в сочетании с гидроксидом алюминия (Alum), используемая в качестве положительного контроля системного иммунного ответа.

2.1.2 Биологические агенты и тест-системы

– Клеточная линия *ExpiSf9*™ (*Spodoptera frugiperda*) (Thermo Fisher Scientific, США);

– Компетентные клетки *Escherichia coli* штамма MAX Efficiency™ DH10Bac™ (Thermo Fisher Scientific, США);

– Бакуловирусная экспрессионная система Bac-to-Bac™ (Thermo Fisher Scientific, США), включающая вектор pFastBac™ Dual;

– Генетические последовательности антигенов SARS-CoV-2, соответствующие штамму Wuhan-Hu-1 (для белка Spike) и варианту Omicron BA.5 (для домена RBD), депонированные в международной базе данных GISAID под регистрационными номерами EPI_ISL_514127, EPI_ISL_514126, EPI_ISL_514093;

– Рекомбинантные бакуловирусы (штаммы поколения P1), характеризующиеся инфекционным титром в диапазоне от $1{,}61 \times 10^8$ до $1{,}69 \times 10^8$ ивч/мл.

Формула расчёта титра:

$$T = (N \times P / D) \times 0{,}01, \quad (1)$$

где T – титр вируса, ивч/мл;
N – количество клеток;
P – процент позитивных клеток;
D – разведение.

Пример для образца «80»:

$$T = (1\times10^6 \times 1{,}61) / (0{,}0001 \times 100) = 1{,}61\times10^8 \text{ ивч/мл}$$

Расчет MOI для оптимизации экспрессии

Множественность заражения (MOI) рассчитывали по формуле:

$$V = (MOI \times \rho \times V_к) / T, \quad (2)$$

где V – необходимый объем вируса, мл;
MOI – множественность инфицирования;
ρ – плотность клеток, клеток/мл;
Vк – объем культуры, мл;
T – титр вируса, ивч/мл.

Практический пример (для 30 мл культуры с плотностью 4×10^6 клеток/мл при MOI=5):

$$V = 5 \times (30 \times 4 \times 10^6) / 1{,}61\times10^8 = 3{,}73 \text{ мл}$$

– Вирусные тест-штаммы SARS-CoV-2: эпидемические изоляты, относящиеся к генетическим линиям Wuhan и Delta. Данные изоляты использовались для оценки вируснейтрализующей активности сывороток *in vitro* и для экспериментального заражения животных *in vivo*.

Использование исходного штамма (WT D614G) и варианта Delta для оценки вируснейтрализующей активности *in vitro* и протективной эффективности *in vivo*, притом, что активные компоненты разработанных препаратов представлены антигеном S-ECD на основе исходного штамма Wuhan-Hu-1 и антигеном RBD на основе варианта Omicron BA.5, было заложено в дизайн исследования целенаправленно. Основной целью такого подхода являлась демонстрация широты формируемого иммунного ответа и способности разработанной вакцины индуцировать выработку перекрестно-нейтрализующих антител. Подтверждение протективной активности против генетически отдаленного предкового штамма и высокопатогенного варианта Delta доказывает потенциал вакцины обеспечивать широкую перекрестную защиту, что отвечает современным требованиям к созданию универсальных вакцин против SARS-CoV-2.

2.1.3 Вспомогательные вещества и реактивы

Химическая схема производства рекомбинантных белков RBD и Spike исключает стадии прямого химического синтеза или модификации макромолекул, полностью опираясь на процессы матричного биосинтеза в эукариотических живых системах.

Для минимизации вариабельности от серии к серии и исключения риска контаминации адвентивными агентами, в регламенте используется исключительно химически определенное сырье, лишенное сыворотки крови и экстрактов животного или дрожжевого происхождения.

Сводная спецификация основного и вспомогательного сырья, унифицированная для производственных циклов обоих целевых антигенов, представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Спецификация сырья и материалов для производства рекомбинантных мономерных белков SARS-CoV-2 (Spike и RBD)

Наименование	Обозначение НД / Артикул	Показатели, обязательные для проверки	Примечание
А. ОСНОВНОЕ СЫРЬЕ			
Компетентные клетки *E. coli*: MAX Efficiency DH10Bac	Согласно НД	Наличие плазмидной ДНК Spike/RBD. Экспрессия целевого белка.	Для получения рекомбинантной бакмиды
Среда Luria-Bertani (LB)	Согласно НД	Стерильность среды, Ф ЕАЭС 2.1.6.1	Выращивание бактериальных культур
Агар бактериологический	Согласно НД	Стерильность среды, Ф ЕАЭС 2.1.6.1	Подготовка селективных чашек
SOC среда	Согласно НД	Стерильность среды, Ф ЕАЭС 2.1.6.1	Восстановление клеток после теплового шока
Клетки насекомых *ExpiSf9*™	Сертификат производителя	Сертификат анализа (COA)	Продуцент активной фармацевтической субстанции (АФС)
Среда для культивирования клеток ExpiSf CD Medium	Сертификат производителя	Сертификат анализа (COA)	Бессывороточная среда для суспензионного роста
Трансфекционный реагент: ExpiFectamin Sf	Сертификат производителя	Сертификат анализа (COA)	Липид-опосредованная трансфекция
Среда для комплексирования Opti-MEM	Сертификат производителя	Сертификат анализа (COA)	Подготовка трансфекционных комплексов
Вода очищенная	Ф ЕАЭС 2.2.1.13	pH (5,0–7,0), отсутствие тяжелых металлов, Ф ЕАЭС 2.2.1.13, микробиологическая чистота (≤100 КОЕ/1 мл).	Приготовление буферов и питательных сред
Антибиотик канамицин	15160054, TFS	Сертификат анализа (COA)	Селекция трансформантов *E. coli*
Антибиотик ампициллин	A9518, Sigma	Сертификат анализа (COA)	Селекция трансформантов *E. coli*,
Буфер для трансформации	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0	Сертификат анализа (COA)	Получение трансформантов
0,1 М ИПТГ (Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид)	PHG0010, Sigma	Микробиологическая чистота, Ф ЕАЭС 2.1.6.6 (≤100 КОЕ/1 мл).	Индуктор экспрессии бета-галактозидазы для проведения сине-белой селекции бакмид

Продолжение таблицы 2

Наименование	Обозначение НД / Артикул	Показатели, обязательные для проверки	Примечание
Б. ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ И МАТЕРИАЛЫ			
Буфер для выделения бакмидной ДНК	PureLink HiPure Plasmid Kit	Сертификат анализа (COA)	Изоляция высокомолекулярной бакмиды
Лизис-буфер	20 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,4–8,0, 500 mM NaCl, 30 mM имидазол, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF	Сертификат анализа (COA)	Деструкция клеточных мембран *ExpiSf9*™
ПЦР-мастеркит (DreamTaq Green PCR Master Mix)	Сертификат производителя	Сертификат анализа (COA)	Контроль качества рекомбинантных трансформантов
Моноклональное антитело к оболочке бакуловируса gp64 (AcV1), APC	0,125 мл при 0,2 мг/мл	Сертификат анализа (COA)	Определение титра бакуловируса (проточная цитометрия)
Ni-NTA агароза	50 % суспензия в 30 % этаноле	Размер частиц 50–170 мкм	Металл-хелатная аффинная хроматография (IMAC)
Pierce Protein Concentrators PES	Картриджи	Сертификат анализа (COA)	Ультрафильтрационное концентрирование и диафильтрация
Имидазол	C3H4N2, ч.д.а или х.ч.	Белый порошок, мол. масса 68,08 г/моль	Элюция целевых белков (конкурентное вытеснение)
Перекись водорода (ГОСТ 10929-76)	х.ч., плотность 1,110 г/см³	Бесцветная прозрачная жидкость	Дезинфекция чистых помещений классов B и C
Спирт этиловый (ГОСТ 5962-2013)	Гидролизный марка «А»	Оптическая плотность λ=220 нм – 0,35	Текущая санитарная обработка поверхностей и рук
Раствор трипанового синего, 0,4 %	Сертификат производителя	Сертификат анализа (COA)	Визуальный подсчет жизнеспособных клеток
Тесты химические	Сертификат производителя	По паспорту поставщика	Контроль эффективности процессов стерилизации

Процедура входного контроля качества сырья является фундаментальной стадией обеспечения качества конечного продукта. Все сырье, поступающее на

производство рекомбинантных белков, подвергается строгой проверке в отделе контроля качества (ОКК) на предмет соответствия требованиям нормативной документации. Данный процесс инициируется визуальным осмотром поступивших партий, проверкой целостности упаковки и верификацией сопроводительной документации, подтверждающей качество и комплектность. После регистрации от каждой серии отбирается средняя проба, которая физически разделяется на две эквивалентные части: первая направляется на непосредственный лабораторный контроль, тогда как вторая опечатывается и депонируется в архив до момента полного израсходования сырья в производстве. Только на основании положительного аналитического заключения ОКК сырье допускается к использованию в технологическом процессе.

Для приготовления критических буферных растворов и гидратации питательных сред используется очищенная вода, получаемая на участке водоподготовки из водопроводной питьевой воды путем глубокого обессоливания и дистилляции. Вода должна строго соответствовать статье Ф ЕАЭС 2.2.1.13, представляя собой прозрачную бесцветную жидкость с водородным показателем (pH) в диапазоне от 5,0 до 7,0 и сухим остатком не более 0,001 %. Присутствие восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов категорически не допускается. Хранение подготовленной очищенной воды осуществляется при температуре 17–25 °C в течение не более 24 часов для минимизации риска пролиферации микробной флоры Ф ЕАЭС 2.1.6.6.

Для поддержания асептических условий в производственных помещениях классов чистоты B и C применяется раствор водорода пероксида с добавлением синтетических моющих средств. Синергическое действие окислителя и детергента обеспечивает высокую спороцидную и бактерицидную активность. Рабочий раствор готовится в емкости вместимостью 10 литров путем последовательного добавления к дистиллированной воде расчетного количества пероксида водорода и СМС при непрерывном перемешивании. Соотношение компонентов для получения растворов различной концентрации строго регламентировано технологической инструкцией (таблица 3).

Таблица 3 – Регламент приготовления рабочих дезинфицирующих растворов на основе водорода пероксида

Концентрация H_2O_2 в рабочем растворе, %	Концентрация моющего средства, %	Объем приготовляемого раствора, л	Требуемый объем H_2O_2, мл	Требуемая масса СМС, г	Объем воды очищенной, мл
1,0	0,5	10	400	50	9550
2,0	0,5	10	800	50	9150
3,0	0,5	10	1200	50	8750
4,0	0,5	10	1600	50	8350
6,0	0,5	10	2400	50	7550

Текущая дезинфекция рук персонала, а также обработка рабочих поверхностей и труднодоступных участков лабораторного оборудования

осуществляется с использованием растворов на основе гидролизного этилового спирта (марка «А»). Для обеспечения максимального антисептического эффекта за счет коагуляции бактериальных белков применяется 70 % объемный раствор, который готовится путем смешивания 700 мл 95 % этилового спирта с 250 мл очищенной воды. В специфических случаях (обжиг поверхностей и спиртовки) используется неразбавленный 95 % спирт. Для менее критических процессов может применяться 20 % раствор. Приготовление дезинфектантов осуществляется непосредственно перед началом производственной смены в объеме, удовлетворяющем дневную потребность.

Подготовка бактериальной среды Luria-Bertani (LB), необходимой для выращивания трансформированных культур *E. coli*, включает растворение 20 г сухого порошка LB в 500 мл дистиллированной воды с последующим доведением объема до 1000 мл. Готовая жидкая среда подвергается термической стерилизации методом автоклавирования при 121 °C в течение 20 минут, что обеспечивает полное уничтожение вегетативных форм и спор микроорганизмов. В свою очередь, для проведения процессов ультрафильтрации и концентрации используются картриджные ультрафильтрационные концентраторы Pierce Protein Concentrators PES 88533 и 88513 (Thermo Fisher).

2.1.4 Аппаратурная схема и производственное оборудование

Технологический процесс получения рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 базируется на интеграции оборудования, обеспечивающего реализацию как этапов культивирования, так и процессов выделения и очистки. Аппаратурная схема производства структурирована в соответствии с логикой биотехнологического цикла.

В фазе клеточного биосинтеза и масштабирования (Upstream) критическим оборудованием выступают орбитальные инкубаторы-шейкеры, оснащенные системами прецизионного температурного контроля. Инкубация суспензионных культур *ExpiSf9*™ протекает в вентилируемых колбах Эрленмейера из полиэтилентерефталата без дефлекторов. Для обеспечения оптимального массообмена и оксигенации без создания избыточного гидродинамического стресса, орбитальные платформы калибруются на скорость вращения 125 ± 5 об/мин или 95 ± 5 об/мин, для платформ с амплитудой 50 мм. Процесс протекает при строго контролируемой температуре 27 °C в неувлажненной атмосфере без дополнительной подачи углекислого газа, что является специфическим преимуществом культур клеток насекомых. Оценка клеточной пролиферации и жизнеспособности осуществляется с применением гемоцитометров или автоматических счетчиков клеток с использованием красителя трипанового синего.

Для проведения вирусологических анализов, в частности, определения инфекционного титра бакуловируса, применяется проточный цитометр с акустической фокусировкой Attune NxT. Аппарат сконфигурирован для работы с красным лазером (возбуждение 633–647 нм, эмиссия 660 нм), что позволяет детектировать флуоресцентный сигнал от клеток, окрашенных антителами к вирусному оболочечному белку gp64.

На этапе очистки и концентрирования центральным звеном аппаратурной схемы является автоматизированная жидкостная хроматографическая система ÄKTA start, интегрированная с предварительно упакованными аффинными колонками HiTrap, содержащими Ni-NTA агарозу. Данный программно-аппаратный комплекс осуществляет мониторинг ультрафиолетового поглощения при длине волны 280 нм, контролирует скорость потока буферных растворов и формирует прецизионные градиенты концентрации имидазола для элюции целевого белка. Финальная стерилизация готового раствора АФС обеспечивается системами вакуумной фильтрации через мембраны с размером пор 0,22 мкм, с последующим асептическим розливом в микропробирки.

Для обеспечения стерильности, точности поддержания физико-химических параметров и высокой разрешающей способности на этапах очистки применяется специализированный парк оборудования, указанный в таблице 4.

Таблица 4 – Аппаратурная схема производства. Основное технологическое оборудование

Наименование и модель оборудования	Производитель	Технические характеристики и назначение в процессе
Бокс биологической безопасности (класс II)	Thermo Scientific™ 1300 Series A2	Класс чистоты воздуха A по стандартам GMP. Скорость нисходящего потока 0,3–0,5 м/с. Фильтры HEPA H14. Обеспечение асептических условий для работы с клеточными культурами
Орбитальный шейкер-инкубатор	Thermo Scientific MaxQ 5000	Точный контроль температуры (27 °C). Орбита встряхивания 19 мм, 25 мм или 50 мм. Скорость 15–500 об/мин. Культивирование клеток *ExpiSf9*™
Инкубатор для бактерий	Heracell™ VIOS 160i	Диапазон 17–40 °C. Выращивание трансформантов *E. coli* DH10Bac на чашках Петри и в жидкой культуре
ПЦР-амплификатор	SimpliAmp (Thermo Fisher)	96-луночный формат, точность поддержания температур ±0,25 °C. Используется для верификации рекомбинантной бакмидной ДНК
Проточный цитометр	Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher)	Использование красного лазера (возбуждение 633–647 нм, эмиссия 660 нм). Быстрое и высокоточное определение титра бакуловируса
Хроматографическая система	AKTA pure / AKTA start (Cytiva)	Аффинная очистка белка (IMAC). Контроль УФ-поглощения (280 нм) и градиента элюции
Высокоскоростная центрифуга с бакет-ротором	Eppendorf 5810 R (или аналог)	Температурный контроль (4 °C). Осаждение клеток, осветление супернатанта, а также центрифужная ультрафильтрация в картриджах Pierce
Установки для капсульной фильтрации	Nalgene Rapid-Flow Sterile Filter Units	Мембраны PES 0,45 мкм и 0,2/0,22 мкм. Асимметричная структура пор. Первичное осветление и стерилизация

Продолжение таблицы 4

Наименование и модель оборудования	Производитель	Технические характеристики и назначение в процессе
Картриджные ультрафильтрационные концентраторы	Pierce Protein Concentrators PES 88533 и 88513 (Thermo Fisher)	Предел отсечения (MWCO) 100 кДа. Концентрирование целевого белка Spike (140–160 кДа), 10 кДа Концентрирование целевого белка RBD (25–28 кДа)
Система для гель-документации	iBright FL1500 (или аналог)	Детекция хемилюминесцентного сигнала при проведении Вестерн-блоттинга.

Все процессы, связанные с открытием флаконов, пипетированием клеточных суспензий и добавлением вирусов, осуществляются исключительно внутри ламинарного бокса с использованием автоматических пипеток (например, Eppendorf Research plus) и стерильных одноразовых наконечников.

2.1.5 Экспериментальные животные

Для проведения доклинических исследований безопасности (острая и субхроническая токсичность, аллергенность, местно-раздражающее действие), а также оценки иммуногенности и протективной эффективности разрабатываемых вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano использовались различные виды лабораторных животных.

Все животные были получены из специализированных лицензированных питомников и сопровождались соответствующими ветеринарными сертификатами (паспортами здоровья), подтверждающими их статус (SPF-категория или конвенциональные здоровые животные). Перед включением в эксперимент все животные проходили обязательный 14-дневный карантин (период акклиматизации) с ежедневным клиническим осмотром.

Сводная характеристика использованных *in vivo* тест-систем представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика лабораторных животных, использованных в исследовании

Вид животного (линия)	Масса / Возраст	Пол	Использование в эксперименте
Мыши (беспородные)	18–20 г	Самцы, самки (в т.ч. беременные)	Острая токсичность, ГЗТ
Мыши (BALB/c)	18–21 г (9–10 нед.)	Самцы, самки	Иммуногенность, цитокиновый профиль (в т.ч. группы новорожденных и старых мышей)
Крысы (беспородные)	180–220 г	Самцы, самки (в т.ч. беременные)	Острая и подострая (субхроническая) токсичность
Морские свинки (альбиносы)	300–350 г	Самцы, самки	Аллергенность (анафилактический шок, конъюнктивальная проба)
Кролики (альбиносы)	2,0–2,5 кг	Самцы, самки	Местно-раздражающее действие (тест Дрейза), пирогенность

Продолжение таблицы 5

Вид животного (линия)	Масса / Возраст	Пол	Использование в эксперименте
Сирийские хомяки	Половозрелые особи	Самцы, самки	Протективная эффективность (заражение живым вирусом SARS-CoV-2)
Макаки-резус (*Macaca mulatta*)	7,5–12,6 кг	Самцы	Оценка системной безопасности, переносимости и иммуногенности на приматах

Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок) при внутримышечном введении вакцины

Исследования проведены на морских свинках-самцах. Схема введения препаратов и характеристика групп животных представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Характеристика экспериментальных групп при исследовании реакции общей анафилаксии

№ Группы	Кол-во живот-ных	День эксперимента				
		1 день	3 день	5 день	19 день	20 день
		Сенсибилизирующая доза			Разрешаю-щая доза	
№1 контроль	10♂	Физ. раствор 0,05 мл в/м* (1 ПД)	Физ. раствор 0,05 мл в/м (1 ПД)	Физ. раствор 0,05 мл в/м (1 ПД)	Физ. раствор 0,15 мл в/бр** (3 ПД)	Выход из эксперимен-та
№2 опытная	10♂	Вакцина 0,05 мл в/м (1 ПД)	Вакцина 0,05 мл в/м (1 ПД)	Вакцина 0,05 мл в/м (1 ПД)	Вакцина 0,15 мл в/бр (3 ПД)	Выход из эксперимен-та
№3 контроль	10♂	Физ. раствор 0,08 мл в/м (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл в/м (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл в/м (2 ПД)	Физ. раствор 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимен-та
№4 опытная	10♂	Вакцина 0,08 мл в/м (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл в/м (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл в/м (2 ПД)	Вакцина 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимен-та
№5 контроль (беременные)	10 ♀	Физ. раствор 0,08 мл в/м (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл в/м (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл в/м (2 ПД)	Физ. раствор 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимен-та
№6 опытная (беременные)	10♀	Вакцина 0,08 мл в/м (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл в/м (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл в/м (2 ПД)	Вакцина 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимен-та
Примечание: *в/м-внутримышечно, **в/бр-внутрибрюшинно						

Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок) оценена в индексах по Weigle. Морским свинкам вводился исследуемый препарат в эффективной терапевтической дозе (ТД), сенсибилизирующие дозы вводились через день, разрешающая доза – через 14 дней после последней сенсибилизирующей дозы. Разрешающая доза равна суммарной сенсибилизирующей дозе.

Вычисление анафилактического индекса по Weigle проводили по следующей формуле:

$$И = ((N \times 4) + (N1 \times 3) + (N2 \times 2) + (N3 \times 1) + (N4 \times 0)) / (N + N1 + N2 + N3 + N4), \quad (3)$$

где И – анафилактический индекс по Weigle;
N – число морских свинок, у которых наступила смерть;
N1 – число морских свинок, у которых развился тяжелый шок;
N2 – число морских свинок, у которых развился умеренный шок;
N3 – число морских свинок, у которых развился слабый шок;
N4 – морские свинки, у которых не наступило шока.

При гибели всех животных в группе индекс Weigle составляет 4(++++). При тяжелом шоке – 3(+++), при умеренном шоке – 2(++), при слабом шоке – 1(+).

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при внутримышечном введении вакцины

Изучение влияния вакцины на формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили на мышах обоего пола (18–21 г, 9–10 недель), разделенных на 2 группы (по 5 самок и 5 самцов). Оценку ГЗТ проводили по анализу изменения массы конечности мышей. Сенсибилизирующая инъекция вводилась однократно, внутрибрюшинно, разрешающая инъекция – однократно в подушечку задней лапы. В качестве вещества позитивного контроля использовали эритроциты барана. Сенсибилизирующая доза вещества позитивного контроля составляла $2 \cdot 10^8$ клеток, разрешающая доза $2 \cdot 10^9$ клеток. В качестве вещества негативного контроля использовали физиологический раствор. Период наблюдения составил 6 суток. В качестве регистрируемых параметров использовали массу лапки животных.

Индекс отека (ИО) определяли по формуле:

$$ИО = ((Мо – Мк) / Мк) \times 100\ \%, \quad (4)$$

где ИО – индекс отека;
Мо – масса опытной лапки мыши;
Мк – масса контрольной лапки мыши.

Группы экспериментальных животных и схема введения препаратов представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Характеристика экспериментальных групп при исследовании ГЗТ

№ группы	Кол-во животных	Вводимое вещество/дозы			Выход из эксперимента
		1 день	2 день	5 день	
№1 контрольная	10♂♀	Физ. раствор 0,1 мл в/м*	Через 24 часа ЭБ $2\cdot10^8$ клеток в/бр**	В левую заднюю лапу 0,05 мл физ. раствора	На 6 сутки срезы обеих лап
№2 контрольная	10♂♀	Физ. раствор 0,1 мл в/м + ЭБ $2\cdot10^8$ клеток в/бр	-		
№3 контрольная	10♂♀	ЭБ $2\cdot10^8$ клеток в/бр	Через 24 часа Физ. раствор 0,1 мл в/м		
№4 опытная	10♂♀	Вакцина 0,1 мл в/м	Через 24 часа ЭБ $2\cdot10^8$ клеток в/бр	В правую заднюю лапку 0,05 мл ЭБ $2\cdot10^9$	
№5 опытная	10♂♀	Вакцина 0,1 мл в/м + ЭБ $2\cdot10^8$ клеток в/бр	-		
№6 опытная	10♂♀	ЭБ $2\cdot10^8$ клеток в/бр	Через 24 часа Вакцина 0,1 мл в/м		
Примечание: *в/м-внутримышечно, **в/бр-внутрибрюшинно					

Исследования острой токсичности при интраназальном введении вакцины

Острая токсичность определялась на двух видах лабораторных животных – грызунах обоего пола – мышах и крысах. Дополнительно была включена группа беременных животных.

Поскольку вакцины относятся к классу малотоксичных иммунобиологических препаратов, оценка их острой токсичности проводилась методом «предельной дозы» (limit test). В соответствии с Руководством ВОЗ по доклинической оценке вакцин (WHO TRS 927, Annex 1), руководством ICH S6(R1), а также Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. А.Н. Миронова), для таких препаратов не требуется определение точной полулетальной дозы (ЛД50) путем ступенчатой градации дозировок. Вакцину вводили интраназально однократно в максимально допустимом объеме, лимитированном анатомо-физиологической вместимостью дыхательных путей каждого вида животных: 0,4 мл – для крыс и 0,1 мл – для мышей. Данные объёмы соответствуют 5,0 мл/кг для мышей и 2,0 мл/кг для крыс, что составляет 10-кратную профилактическую дозу для соответствующего вида животных. Использование предельных доз позволяет гарантированно подтвердить безопасность препарата без необоснованного

увеличения количества экспериментальных животных (согласно принципам биоэтики 3R).

Информация о группах экспериментальных животных представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Характеристика экспериментальных групп

Номер группы	Количество животных	Название ЛП, доза, режим и путь введения	День эвтаназии
Крысы			
№1 Контрольная	3♀ 3♂*	Физ. раствор / 0,4 мл однократно и/н**	На 15-й день
№2 Опытная	3♀ 3♂	Вакцина / 0,4 мл однократно и/н	На 15-й день
№3 Опытная (беременные)	5♀	Вакцина / 0,4 мл однократно и/н	На 15-й день
Мыши			
№4 Контрольная	3♀ 3♂	Физ. раствор / 0,1 мл однократно и/н	На 15-й день
№5 Опытная	3♀ 3♂	Вакцина / 0,1 мл однократно и/н	На 15-й день
№6 Опытная (беременные)	5♀	Вакцина / 0,1 мл однократно и/н	На 15-й день
Примечание: *♀ – самка ♂- самец, **и/н-интраназально			

Исследования подострой токсичности при интраназальном введении вакцины

Подострая токсичность оценивалась на одном виде мелких лабораторных животных – крысах. В эксперименте использовались пять групп животных (одна контрольная и четыре опытные, включая группу беременных самок), которым вводили различные дозы вакцины.

Для определения показателей подострой токсичности исследуемая вакцина вводилась экспериментальным животным – крысам массой 180–200 г интраназально в различных объемах ежедневно в течение 7 дней в соответствии с требованиями стандарта GLP РК.

Характеристика исследуемых групп крыс, количество использованных животных, путь, доза и длительность введения представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика экспериментальных групп при исследовании подострой токсичности

Номер группы	Кол-во животных	Вводимая доза, режим и путь введения	День эвтаназии
Крысы			
№1 Контрольная группа (плацебо)	5♀ 5♂*	Физ. раствор 0,4 мл и/н** однократно, в течение 7 дней	На 8-й день
№2 Опытная	5♀ 5♂	Вакцина 0,04 мл ежедневно 7 дней и/н (1 профилактическая доза для крыс)	На 8-й день
№3 Опытная	5♀ 5♂	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней и/н (5-кратная профилактическая доза)	На 8-й день
№4 Опытная	5♀ 5♂	0,4 мл ежедневно в течение 7 дней и/н (10-кратная профилактическая доза)	На 8-й день
№5 Опытная (беременные)	5♀	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней и/н (5-кратная профилактическая доза)	На 8-й день
Примечание: *♀ – самка ♂- самец, **и/н-интраназально			

Расчет дозы. Максимальная однократная доза вакцины для человека составляет 0,5 мл (или 0,007 мл/кг при массе тела 70 кг). Эквитерапевтическая доза препарата для крыс рассчитана по формуле межвидового пересчёта дозы с учётом видового коэффициента (Km = 6,5 для крыс) и площади поверхности тела человека (Km = 39 для взрослого человека массой 70 кг) согласно методическим рекомендациям А.Н. Миронова [82]: 0,007 × 39 / 6,5 = 0,04 мл на крысу массой 200 г.

Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок) при интраназальном введении вакцины

Исследования проведены на морских свинках-самцах. Схема введения препаратов и характеристика групп животных представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика экспериментальных групп при исследовании реакции общей анафилаксии

№ Группы	Кол-во животных	День эксперимента				
		1 день	3 день	5 день	19 день	20 день
		Сенсибилизирующая доза			Разрешающая доза	
№1 контроль	10♂	Физ. раствор 0,05 мл и/н* (1 ПД)	Физ. раствор 0,05 мл и/н (1 ПД)	Физ. раствор 0,05 мл и/н (1 ПД)	Физ. раствор 0,15 мл в/бр** (3 ПД)	Выход из эксперимента
№2 опытная	10♂	Вакцина 0,05 мл и/н (1 ПД)	Вакцина 0,05 мл и/н (1 ПД)	Вакцина 0,05 мл и/н (1 ПД)	Вакцина 0,15 мл в/бр (3 ПД)	Выход из эксперимента

Продолжение таблицы 10

№ Группы	Кол-во животных	День эксперимента				
		1 день	3 день	5 день	19 день	20 день
		Сенсибилизирующая доза Разрешающая доза			Разрешающая доза	
№3 контроль	10♂	Физ. раствор 0,08 мл и/н (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл и/н (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл и/н (2 ПД)	Физ. раствор 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимента
№4 опытная	10♂	Вакцина 0,08 мл и/н (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл и/н (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл и/н (2 ПД)	Вакцина 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимента
№5 контроль (беременные)	10♀	Физ. раствор 0,08 мл и/н (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл и/н (2 ПД)	Физ. раствор 0,08 мл и/н (2 ПД)	Физ. раствор 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимента
№6 опытная (беременные)	10♀	Вакцина 0,08 мл и/н (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл и/н (2 ПД)	Вакцина 0,08 мл и/н (2 ПД)	Вакцина 0,24 мл в/бр (6 ПД)	Выход из эксперимента
Примечание: *и/н-интраназально; ** в/бр-внутрибрюшинно						

Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок) оценена в индексах по Weigle. Морским свинкам вводился исследуемый препарат в эффективной терапевтической дозе (ТД), сенсибилизирующие дозы вводились через день, разрешающая доза – через 14 дней после последней сенсибилизирующей дозы. Разрешающая доза равна суммарной сенсибилизирующей дозе.

Вычисление анафилактического индекса по Weigle проводили по следующей формуле:

$$И = ((N \times 4) + (N1 \times 3) + (N2 \times 2) + (N3 \times 1) + (N4 \times 0)) / (N + N1 + N2 + N3 + N4), \quad (5)$$

где И – анафилактический индекс по Weigle;
N – число морских свинок, у которых наступила смерть;
N1 – число морских свинок, у которых развился тяжелый шок;
N2 – число морских свинок, у которых развился умеренный шок;
N3 – число морских свинок, у которых развился слабый шок;
N4 – морские свинки, у которых не наступило шока.

При гибели всех животных в группе индекс Weigle составляет 4(++++).

При тяжелом шоке – 3(+++), при умеренном шоке – 2(++), при слабом шоке – 1(+).

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при интраназальном введении вакцины

Изучение влияния вакцины на формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили на мышах обоего пола (18–21 г, 9–10 недель), разделенных на 2 группы (по 5 самок и 5 самцов). Оценку ГЗТ проводили по анализу изменения массы конечности мышей. Сенсибилизирующая инъекция вводилась однократно, внутрибрюшинно, разрешающая инъекция – однократно в подушечку задней лапы. В качестве вещества позитивного контроля использовали эритроциты барана. Сенсибилизирующая доза вещества позитивного контроля составляла $2 \cdot 10^8$ клеток, разрешающая доза $2 \cdot 10^9$ клеток. В качестве вещества негативного контроля использовали физиологический раствор. Период наблюдения составил 6 суток. В качестве регистрируемых параметров использовали массу лапки животных.

Индекс отека (ИО) определяли по формуле:

$$ИО = ((Мо – Мк) / Мк) \times 100\ \%, \quad (6)$$

где ИО – индекс отека;
Мо – масса опытной лапки мыши;
Мк – масса контрольной лапки мыши.

Группы экспериментальных животных и схема введения препаратов представлена в таблице 11.

Таблица 11 – Характеристика экспериментальных групп при исследовании ГЗТ

№ группы	Кол-во животных	Вводимое вещество/дозы			Выход из эксперимента
		1 день	2 день	5 день	
№1 контрольная	10♂♀	Физ. раствор 0,1 мл и/н*	Через 24 часа ЭБ $2 \cdot 10^8$ клеток в/бр**	В левую заднюю лапу 0,05 мл физ. раствора	На 6 сутки срезы обеих лап
№2 контрольная	10♂♀	Физ. раствор 0,1 мл и/н + ЭБ $2 \cdot 10^8$ клеток в/бр	-		
№3 контрольная	10♂♀	ЭБ $2 \cdot 10^8$ клеток в/бр	Через 24 часа Физ. раствор 0,1 мл и/н	В левую заднюю лапу 0,05 мл физ. раствора	На 6 сутки срезы обеих лап
№4 опытная	10♂♀	Вакцина 0,1 мл и/н	Через 24 часа ЭБ $2 \cdot 10^8$ клеток в/бр	В правую заднюю лапку 0,05 мл ЭБ $2 \cdot 10^9$	
№5 опытная	10♂♀	Вакцина 0,1 мл и/н + ЭБ $2 \cdot 10^8$ клеток в/бр	-		

Продолжение таблицы 11

№ группы	Кол-во животных	Вводимое вещество/дозы			Выход из эксперимента
		1 день	2 день	5 день	
№6 опытная	10♂♀	ЭБ $2 \cdot 10^8$ клеток в/бр	Через 24 часа Вакцина 0,1 мл и/н	В правую заднюю лапку 0,05 мл ЭБ $2 \cdot 10^9$	На 6 сутки срезы обеих лап
Примечание: *и/н – интраназально; ** в/бр-внутрибрюшинно					

Конъюнктивальная проба

Для постановки теста «конъюнктивальная проба» животных (морские свинки) разделяли на две группы: контрольные и опытные (по 10 голов в группе). Сенсибилизация животных контрольной группы осуществлялась внутримышечным введением физиологического раствора. Животные опытной группы получали исследуемую вакцину в дозе 0,5 мл внутримышечно. Для постановки пробы 1 каплю раствора вакцины вводили в глаз под верхнее веко пипеткой с вытянутым тонким концом. Животным контрольной группы вводили 1 каплю физиологического раствора. Закапывание в глаз производили «в положении лежа» головой вниз. Реакции учитывали через 15 мин (быстрая реакция) и через 24–48 ч (гиперчувствительность замедленного типа) и оценивали по следующей шкале (в баллах):

1 – легкое покраснение слезного протока;

2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;

3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Содержание животных осуществлялось в стандартных условиях вивария уровня GLP: температура воздуха в помещениях поддерживалась на уровне 20±3 °С (для макак-резусов – 22–26 °С), относительная влажность 50–70 %, контролируемый 12-часовой цикл светового дня (макаки содержались в индивидуальных или групповых вольерах с элементами обогащения среды). Основной рацион состоял из полнорационного гранулированного сбалансированного корма, соответствующего виду животных; доступ к корму и очищенной питьевой воде предоставлялся ad libitum.

Рандомизацию и распределение по группам проводили методом случайной выборки с учетом массы тела (отклонение в группах не превышало ±10 %). Идентификация мелких грызунов осуществлялась путем нанесения меток; макаки-резусы идентифицировались по индивидуальным номерам (ИИН/чипам).

Все инвазивные манипуляции, забор крови, заражение и эвтаназия (декапитация грызунов, безболезненное усыпление приматов) проводились со строгим соблюдением принципов биоэтики, гуманного обращения с лабораторными животными и в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (ETS № 123, Страсбург, 1986) [83], а также были одобрены Локальной этической комиссией организации.

2.2 Методы исследования

Биоинформатические методы (In silico)

– Анализ геномной вариабельности и выбор целевых последовательностей.

Мониторинг генетического разнообразия и отбор референсных нуклеотидных последовательностей вируса SARS-CoV-2 проводили с использованием глобальной базы данных GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data). Анализ включал фильтрацию полногеномных последовательностей по критериям эпидемиологической значимости и распространенности мутаций в гене, кодирующем Spike-белок (Spike protein). На основании полученных данных были идентифицированы консервативные и вариабельные участки, что позволило идентифицировать нейтрализующие эпитопы, включение которых в структуру рекомбинантного антигена обеспечивает формирование перекрестного иммунитета.

– Кодонная оптимизация нуклеотидных последовательностей.

Для обеспечения высокого уровня экспрессии целевого рекомбинантного белка в эукариотической системе *Spodoptera frugiperda* (клетки насекомых *Sf*9/Sf21) проводили *in silico* оптимизацию кодонного состава гена. Процедуру выполняли с использованием алгоритма GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific), учитывающего частоту встречаемости кодонов (Codon Adaptation Index, CAI), содержание GC-пар, а также наличие скрытых сайтов сплайсинга, полиаденилирования и вторичных структур мРНК, негативно влияющих на эффективность трансляции. Синтезированные последовательности характеризовались оптимальным профилем для трансляционного аппарата клеток-хозяев.

– Молекулярное моделирование и структурный анализ. Прогнозирование пространственной организации спроектированных антигенов осуществляли методами компьютерного моделирования. Вторичная структура: Анализ элементов вторичной структур проводили с использованием алгоритма PSIPRED (Protein Structure Prediction Server), основанного на нейронных сетях. Третичная структура: Построение трехмерных (3D) моделей выполняли методом гомологичного моделирования в сервисе SWISS-MODEL, а также методом *ab initio* с применением алгоритма глубокого обучения AlphaFold v2.0. Полученные модели использовали для оценки поверхностной доступности ключевых антигенных детерминант (эпитопов) и стабильности конформации рецептор-связывающего домена (RBD);

– Валидация генетических конструкций и выравнивание последовательностей.

Верификацию *in silico* спроектированных плазмидных векторов и подтверждение отсутствия нежелательной гомологии с геномом клетки-хозяина проводили с использованием инструментария NCBI BLAST.

Методы молекулярной биологии и генетической инженерии

– ПЦР подтверждение наличия целевого гена проводили методом амплификации нуклеиновых кислот в соответствии с требованиями Амплификация Ф ЕАЭС 2.1.6.18;

– Определение нуклеотидной последовательности проводили согласно общим положениям Ф ЕАЭС 2.1.2.29.

Биотехнологические методы (Upstream)

– Подсчет клеток и определение жизнеспособности Определение количества и жизнеспособности клеток насекомых проводили в соответствии с Ф ЕАЭС 2.1.6.11;

– Стерильность клеточных культур Контроль отсутствия микоплазм в клеточных культурах осуществляли согласно Ф ЕАЭС 2.1.6.12;

– Культивирование перевиваемой линии клеток насекомых *Spodoptera frugiperda* (*ExpiSf9*™) осуществляли в суспензионном формате с использованием химически определенной бессывороточной питательной среды ExpiSf CD Medium (Gibco), согласно протоколу производителя (User Guide: ExpiSf™ Expression System, Thermo Fisher Scientific);

– Определение концентрации и жизнеспособности клеток. Оценку пролиферативной активности и жизнеспособности клеточной популяции проводили методом исключения красителя (Dye Exclusion Method) с использованием 0,4 % раствора трипанового синего. Жизнеспособность рассчитывали как отношение количества неокрашенных клеток к общему числу клеток в образце, согласно протоколу производителя (Countess™ II FL Automated Cell Counter User Guide. – Publication Number: MAN0010215. – Rev. B.0.);

– Трансфекция и генерация рекомбинантного бакуловируса. Введение рекомбинантной бакмидной ДНК, содержащей целевой ген, в клетки *ExpiSf9*™ проводили методом липид-опосредованной трансфекции (липофекции) с использованием катионного липидного реагента ExpiFectamine™ Sf (Gibco). согласно протоколу производителя (User Guide: ExpiSf™ Expression System, Thermo Fisher Scientific);

– Амплификация вирусных стоков. Получение высокотитражных рабочих стоков бакуловируса (P1, P2) проводили путем последовательного инфицирования суспензионной культуры клеток *ExpiSf9*™, согласно протоколу производителя (Thermo Fisher Scientific. Baculovirus Titration Kit User Guide. – Publication Number: MAN0003069. – Rev. A.0.);

– Титрование бакуловируса методом проточной цитофлуориметрии. Определение титра инфекционных вирусных частиц (ивч/мл) проводили методом проточной цитофлуориметрии. Метод основан на инфицировании стандартной суспензии клеток *ExpiSf9*™ серийными десятикратными разведениями полученного вирусного стока (от 1:100 до 1:100 000) с последующей внутриклеточной детекцией оболочечного гликопротеина gp64 с помощью меченных флуорохромом моноклональных антител. Данный «титрант» вносится в лунки со стандартизированной суспензией восприимчивых клеток *ExpiSf9*™, выступающих в роли биологического субстрата.

В качестве «индикатора» специфической инфекционной реакции применяются моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромом фикоэритрином (anti-gp64 PE). Данный индикатор избирательно связывается с

вирусным белком gp64, который экспрессируется на поверхности только инфицированных клеток через 14–16 часов после внесения «титранта». Детекция индикаторного свечения и количественный подсчет инфицированных клеток осуществляется методом проточной цитофлуориметрии, после чего производится математический расчет исходного титра вируса в ивч/мл с учетом фактора разведения (Thermo Fisher Scientific. Baculovirus Titration Kit User Guide. – Publication Number: MAN0003069. – Rev. A.0.).

Методы очистки и выделения (Downstream)

– Стерилизующая фильтрация. Стерилизующую фильтрацию проводили через мембранные фильтры в соответствии с рекомендациями Ф ЕАЭС 2.5.1.1;

– Центрифугирование. Осветление культуральной жидкости проводили на центрифуге Sorvall RC 6 Plus согласно руководству по эксплуатации (Pub. No. 45595);

– Хроматографическая очистка. Разделение и очистку белка проводили методом препаративной металл-хелатной аффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией. Общие методологические положения проведения жидкостной хроматографии соответствовали требованиям Ф ЕАЭС 2.1.2.28 «Жидкостная хроматография». Процесс очистки осуществляли на автоматизированной жидкостной хроматографической системе низкого давления ÄKTA start (Cytiva, Швеция/США) с использованием предварительно упакованных аффинных колонок серии HiTrap, согласно протоколам производителя (Cytiva User Manual 29060302).

Физико-химические и аналитические методы

– Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Определение молекулярной массы и чистоты белка методом электрофореза проводили в соответствии с Ф ЕАЭС 2.1.2.30 «Электрофорез»;

– Спектрофотометрия. Определение концентрации белка и ДНК спектрофотометрическим методом осуществляли в ультрафиолетовой области спектра при аналитических длинах волн 260 нм (для оценки нуклеиновых кислот) и 280 нм (для оценки белков) согласно Ф ЕАЭС 2.1.2.24 «Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»;

– Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили в соответствии с Ф ЕАЭС 2.1.6.10 «Бактериальные эндотоксины»;

– Потенциометрия (pH). Измерение значения pH растворов проводили потенциометрическим методом согласно Ф ЕАЭС 2.1.2.3 «Потенциометрическое определение pH»;

– Визуальный контроль (Прозрачность). Определение прозрачности и степени мутности жидкостей проводили в соответствии с Ф ЕАЭС 2.1.9.1 «Прозрачность и степень мутности жидкостей»;

– Визуальный контроль (Цветность). Определение степени окрашивания жидкостей проводили согласно Ф ЕАЭС 2.1.9.2 «Степень окрашивания жидкостей»;

– Механические включения Контроль на наличие видимых механических включений осуществляли в соответствии с Ф ЕАЭС 2.1.9.17 «Видимые механические включения»;

– Подтверждение чистоты и структурной однородности белков хроматографическим методом проводили согласно Ф ЕАЭС 2.1.2.28 «Жидкостная хроматография». Регистрацию хроматографического профиля осуществляли с помощью спектрофотометрического (УФ) детектора при длинах волн 214 нм (детекция пептидных связей) и 280 нм (детекция ароматических аминокислот);

– Количественное определение белка. Определение содержания общего белка проводили в соответствии с Ф ЕАЭС 2.1.2.32 «Количественное определение общего белка» методом абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой области при аналитической длине волны 280 нм. Измерения выполняли на микрообъёмном спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме измерения на пьедестале, приложение Protein A280, при объёме наносимой пробы от 1 до 2 мкл и продолжительности измерения около 8 с. Прибор регистрирует полный спектр в диапазоне от 190 до 850 нм с точностью установки длины волны ±1 нм.

Оптическую длину пути прибор выбирает автоматически в диапазоне от 0,030 до 1,0 мм непосредственно в ходе измерения, что удерживает регистрируемую оптическую плотность в линейном диапазоне детектора и исключает необходимость предварительного разведения пробы. Измеренное значение оптической плотности приводится к стандартной оптической длине пути 10 мм по формуле:

$$A_{280}^{(10)} = (A_{280}^{(l)} - A_{340}^{(l)}) \times 10 / l, \quad (7)$$

где $A_{280}^{(l)}$ – оптическая плотность при 280 нм, измеренная при фактической оптической длине пути l, мм;

$A_{340}^{(l)}$ – оптическая плотность при 340 нм, используемая для коррекции базовой линии и компенсации смещения, вызванного светорассеянием;

l – фактическая оптическая длина пути, мм.

Концентрацию белка рассчитывали из приведённой оптической плотности на основании закона Бугера – Ламберта – Бера с использованием массового коэффициента экстинкции:

$$C = A_{280}^{(10)} \times 10 / \varepsilon_1\%, \quad (8)$$

где C – концентрация белка, мг/мл;

$\varepsilon_1\%$ – коэффициент экстинкции раствора с массовой концентрацией 10 мг/мл при оптической длине пути 10 мм.

Фармакопейные методы контроля качества и технологические методы получения лекарственных форм (согласно требованиям ЕАЭС №89)

В связи с тем, что конечным этапом разработки являлось составление проектов нормативных документов и лабораторных регламентов, комплекс методов оценки качества целевого продукта был расширен в строгом соответствии с Правилами проведения исследований биологических

лекарственных средств ЕАЭС (Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 г. № 89) и требованиями ГФ РК.

– Методы контроля клеточных субстратов и оценки вирусной безопасности. Контроль клеточной линии *ExpiSf9*™ осуществлялся на уровне Главного (MCB) и Рабочего (WCB) банков клеток. Вирусная безопасность подтверждалась методами тестирования на отсутствие контаминации адвентивными агентами, а также оценкой отсутствия эндогенных ретровирусов;

– Расширенные методы структурной характеристики, оценки чистоты и агрегатного состояния. Структурная идентичность белков подтверждалась пептидным картированием и масс-спектрометрией для оценки профиля посттрансляционных модификаций (гликозилирования). Для выявления белковых агрегатов и оценки монодисперсности, помимо SDS-PAGE, применялся метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC);

– Определение специфической биологической активности антигена. Биологическая (антигенная) активность очищенных белков RBD и Spike-белок *in vitro* подтверждалась не только вестерн-блоттингом, но и методом иммуноферментного анализа (ИФА/ELISA) по аффинности связывания со специфическим человеческим рецептором ACE2, а также суррогатным тестом нейтрализации (sVNT);

– Расширенные методы титрования вирусных частиц. Количественное определение инфекционной активности бакуловируса (ивч/мл) проводилось методом проточной цитометрии (по детекции экспрессии белка gp64 в клетках *ExpiSf9*™) в комбинации с традиционным методом определения 50 % тканевой цитопатический инфицирующей дозы (TCID50) для подтверждения стабильности вирусного стока;

– Методы оценки стабильности препарата. Методы оценки стабильности. Стабильность лиофилизата NARUVAX-C19/Nano изучали при хранении при температуре от минус 17 до минус 30 °С, от 2 до 8 °С и при +22 °С по показателям: внешний вид восстановленного раствора, растворимость, антигенная активность RBD (ИФА), иммуногенность (анти-RBD sIgA). Срок хранения инъекционной формы NARUVAX-C19 обоснован данными производителя адъюванта и результатами контроля опытных серий по спецификации при выпуске; исследование стабильности в объёме ICH Q1A(R2) и ICH Q5C (долгосрочное и ускоренное хранение, три серии) отнесено к этапу подготовки регистрационного досье;

– Методы разработки технологии приготовления инъекционной лекарственной формы (NARUVAX-C19). Технологический процесс получения внутримышечной вакцины включал раздельное асептическое микрофильтрование компонентов (АФС через мембрану 0,22 мкм) с последующим объединением со стерильным наноэмульсионным адъювантом Sepivac SWE в объемном соотношении 50:50 и гомогенизацией в асептических условиях без проведения финишной фильтрации эмульсии;

– Методы разработки технологии приготовления интраназальной формы (NARUVAX-C19/Nano). Формирование наночастиц осуществлялось методом

ионного гелеобразования. Создание системы таргетной доставки требовало предварительного химического синтеза маннозилированного производного хитозана. Ковалентная конъюгация D-маннозы с полимерной матрицей осуществлялась методом восстановительного аминирования, обеспечивающим образование стабильных вторичных аминных связей между альдегидными группами углевода и первичными аминогруппами деацетилированного хитозана в присутствии восстанавливающего агента. После завершения реакции полимер подвергался многодневному исчерпывающему диализу для элиминации непрореагировавших низкомолекулярных компонентов и токсичных катализаторов. Формирование нановакцины NARUVAX-C19/Nano проводили методом контролируемого ионного гелеобразования. В кислый раствор очищенного маннозилированного хитозана (pH 4,5–5,0) при строгом гидродинамическом контроле вводили раствор сшивающего полианиона триполифосфата натрия, содержащего антиген RBD и нуклеотидный адъювант CpG 55.2. Фиксация антигена в оболочке контролировалась измерением размера частиц и дзета-потенциала (DLS). Эффективность инкапсуляции RBD-белка определяли непрямым методом – по разности между исходным количеством внесённого антигена и количеством неинкапсулированного белка, остающегося в супернатанте после отделения наночастиц центрифугированием. Количественное определение белка в супернатанте проводили с применением набора микро-BCA. Эффективность инкапсуляции рассчитывали по формуле:

$$ЭИ\ (\%) = [(m(внес.\ RBD) - m(неинкапс.RBD)) / m(внес.RBD)] \times 100, \quad (9)$$

где m(внес. RBD) – масса антигена, введённого в реакционную смесь на стадии ионного гелеобразования, мкг;

m(неинкапс. RBD) – масса белка, обнаруженного в супернатанте, мкг.

Стабилизация готовой лекарственной формы осуществлялась путем добавления криопротекторов с последующей лиофильной сушкой для получения порошка, легко ресуспендируемого перед интраназальным введением.

Нанотехнологические методы

– Разработка и физико-химическая характеристика наносомальной формы, включая, сканирующую электронную микроскопию, определение размера частиц, дзета-потенциала и лиофилизацию (на базе The Ohio State University, USA). Экспериментальные исследования по получению наночастиц, а также комплексная оценка их морфологии и физико-химических параметров (размер, дзета-потенциал) выполнялись на базе лабораторного комплекса Food Animal Health Research Program (CFAES, The Ohio State University, Wooster, OH, USA) в рамках международного научного сотрудничества.

Фармакологические методы

Методы оценки безопасности и токсикологического профиля (In vivo)

– Экспериментальные исследования общей и специфической токсичности проводили в соответствии с межгосударственными стандартами и международными рекомендациями. Все манипуляции с лабораторными

животными (мыши, крысы, морские свинки, кролики, макаки-резусы) выполняли с соблюдением принципов биоэтики и гуманного обращения, руководствуясь Европейской конвенцией о защите животных [83] [91];

– Оценка острой токсичности. Изучение острой токсичности проводили при однократном внутримышечном и интраназальном введении исследуемого препарата грызунам в максимальных терапевтических дозах. Наблюдение за клиническим состоянием, потреблением корма/воды и регистрацию летальности осуществляли в течение 14 суток в соответствии с методическими рекомендациями А.Н. Миронова [82];

– Изучение субхронической (подострой) токсичности. Исследование проводили при многократном ежедневном введении препарата в течение 7 суток. В ходе эксперимента осуществляли ежедневный клинический осмотр и мониторинг динамики массы тела. По завершении курса оценивали функциональное состояние основных систем организма согласно руководству OECD по испытаниям химических веществ [84];

– Изучение иммунотоксических и аллергизирующих свойств проводили в соответствии с методическими рекомендациями А.Н. Миронова [82];

– Реакция общей анафилаксии. Оценку проводили на морских свинках. Сенсибилизацию осуществляли подкожным введением, разрешающую дозу вводили внутрисердечно, регистрируя индекс анафилактического шока по шкале Weigle;

– Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Оценку клеточного ответа проводили на мышах. Разрешающую дозу вводили в подушечку задней лапы, контроль – в контралатеральную лапу. Учет реакции проводили через 24 часа микрометрическим методом;

– Конъюнктивальная проба. Провокационный тест проводили на кроликах путем инстилляции препарата в конъюнктивальный мешок. Реакцию оценивали по гиперемии и отеку слизистой оболочки через 15 мин, 1 ч и 24 ч;

– Оценка местнораздражающего действия (Тест Дрейза). Раздражающее действие на слизистые оболочки глаза оценивали методом офтальмологического осмотра на кроликах. Препарат вводили однократно в конъюнктивальный мешок, используя второй глаз в качестве интактного контроля. Оценку состояния роговицы, радужной оболочки и конъюнктивы проводили по балльной шкале в соответствии с руководством руководству OECD по испытаниям химических веществ [85].

Гематологические и биохимические исследования

– Гематологический анализ. Подсчет форменных элементов крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты), определение гемоглобина и СОЭ проводили на автоматическом гематологическом анализаторе с использованием стандартных реагентов согласно инструкции производителя;

– Биохимический анализ. В сыворотке крови определяли активность печеночных ферментов (АЛТ, АСТ), содержание общего белка, креатинина, мочевины и глюкозы на автоматическом биохимическом анализаторе кинетическими методами [86];

– Патоморфологические исследования.

Некропсию животных проводили после эвтаназии, осуществляли макроскопическое описание, взвешивание внутренних органов и вычисление их массовых коэффициентов. Гистологические срезы органов (толщина 5–7 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином для световой микроскопии согласно стандартным гистологическим методикам, описанным в методических рекомендациях А.Н. Миронова [82].

Методы оценки иммуногенности и протективной эффективности

– Иммуноферментный анализ (ИФА). Титры специфических антител (IgG, IgA, субклассы IgG1/IgG2a) к RBD-белку SARS-CoV-2 в сыворотке и лаваже определяли методом непрямого твердофазного ИФА. Процедуру выполняли с использованием видоспецифичных конъюгатов, следуя протоколу, рекомендованному ВОЗ для оценки иммуногенности вакцин [87];

– Реакция нейтрализации вируса (VNT). Оценку вирус-нейтрализующей активности сывороток проводили в условиях лаборатории BSL-3 с использованием живого штамма SARS-CoV-2. Смесь сыворотки и вируса (100 $TCID_{50}$) вносили в культуру клеток Vero E6. Учет результатов проводили по подавлению цитопатического действия (ЦПД) через 72–96 ч, рассчитывая титр нейтрализации методом Кербера согласно рекомендованному протоколу ВОЗ [87];

– Суррогатный тест нейтрализации (sVNT). Оценку ингибирования связывания RBD с рецептором ACE2 проводили *in vitro* с использованием коммерческого набора cPass™. Исследование и интерпретацию результатов (процент ингибирования) выполняли строго в соответствии с инструкцией производителя [88];

– Проточная цитометрия: Пролиферацию Т-клеток оценивали методом окрашивания CFSE. Фенотипирование популяций проводили с использованием флуоресцентных антител на проточном цитофлуориметре с акустической фокусировкой Attune NxT, следуя техническому руководству к прибору [89];

– Экспериментальное заражение. Оценку протективной эффективности проводили на вакцинированных животных (хомяки, макаки) путем интраназального заражения живым вирусом SARS-CoV-2. Определение вирусной нагрузки методом ПЦР и гистологическую оценку патологии легких проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [87];

– Оценка аномальной токсичности Испытание на аномальную токсичность проводили на мышах и морских свинках в соответствии с Ф ЕАЭС 2.1.6.7 «Аномальная токсичность».

Пирогенность. Оценку пирогенности проводили в тесте на кроликах согласно ОФС 2.1.6.9 Фармакопеи ЕАЭС. Испытание на пирогенность применяли как подтверждающее по отношению к определению содержания бактериальных эндотоксинов и не рассматривали как его замену.

Статистические методы

Обработка данных Статистическую обработку результатов биологических испытаний проводили в соответствии с требованиями Ф ЕАЭС 2.1.10.2 «Статистическая обработка результатов биологических испытаний и количественных определений». Вычисления и визуализацию данных

выполняли с применением пакетов прикладных программ GraphPad Prism v.9.00 (GraphPad Software, Inc., USA) , результаты в виде M ± SD, двусторонний двухвыборочный t-критерий Стьюдента, различия достоверны при $p \leq 0,05$, сравнение проводилось между группами и Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., USA).

Оценку нормальности распределения количественных данных проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для массивов данных, подчиняющихся закону нормального распределения, применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим применением post-hoc критерия Даннета для множественного сравнения опытных групп с интактным контролем. В случае выявления распределения, отличного от нормального, статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Критическим уровнем статистической значимости был принят показатель $p < 0,05$. При сравнении двух групп малого объёма ($n = 3$, исследование на макаках-резусах) применяли двухвыборочный t-критерий Стьюдента без поправки на множественность сравнений. Исследования острой токсичности, проведенные на когортах ограниченного объема, рассматривались как пилотный скрининг диапазона доз, требующий последующей верификации на расширенных выборках в рамках дорегистрационных испытаний.

Для групп малого объёма, в том числе для групп макак-резусов численностью три животных, статистическая мощность недостаточна для надёжного выявления различий умеренной величины, а проверка соответствия распределения нормальному неинформативна. Полученные различия рассматриваются как ориентировочные. Окончательные заключения об эффективности на приматах требуют подтверждения на расширенных выборках.

3 Технология получения активной фармацевтической субстанции: получение рекомбинантных белков S/RBD SARS-CoV-2 в бакуловирусной системе (I этап технологии приготовления экспериментальных вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano)

В соответствии с принципами фармацевтической разработки и концепцией «встроенного качества» (Quality by Design), технологический процесс создания разрабатываемых экспериментальных вакцин концептуально сегментирован на последовательные макростадии. Настоящая глава подробно описывает первый, общий этап технологии приготовления для обеих вакцин-кандидатов – получение стерильной активной фармацевтической субстанции (АФС) на основе рекомбинантных белков S и RBD вируса SARS-CoV-2. Данный этап представляет собой единую технологическую цепочку, включающую наращивание биомассы, экспрессию целевых белков в бакуловирусной системе, а также последующие процедуры выделения и глубокой аффинной очистки. Последующие же этапы приготовления, охватывающие разработку состава, технологические схемы получения готовых лекарственных форм, финишные операции и их упаковку, являются строго раздельными для инъекционной субъединичной вакцины и интраназальной нановакцины и будут детально раскрыты в Главе 4.

3.1 Описание клеточной линии-продуцента *ExpiSf9*™

Для получения рекомбинантных белков Spike и RBD SARS-CoV-2 в рамках разработки экспериментальных вакцин NARUVAX-C19/Nano была использована клеточная линия *ExpiSf9*™. Данная линия специально адаптирована для суспензионного культивирования и характеризуется высокой плотностью роста, стабильностью и эффективной продукцией целевых рекомбинантных белков.

Клетки *ExpiSf9*™ культивируются в бессывороточной среде ExpiSf CD Medium, полностью готовой к использованию и не требующей дополнительных добавок. Среда ExpiSf CD Medium чувствительна к свету, поэтому ее хранение и использование осуществляется в защищенных от света условиях. Клетки способны достигать плотности до 20×10^6 клеток/мл с оптимальным диапазоном субкультивирования от 5×10^6 до 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл. Время удвоения клеток в логарифмической фазе составляет около 24 часов.

Для получения рекомбинантных белков используется бакуловирусная экспрессионная система Bac-to-Bac, основанная на применении рекомбинантной бакмидной ДНК. Ген интересующего белка (полноразмерного Spike на основе штамма Wuhan-Hu-1 или домена RBD на основе варианта Omicron BA.5) клонируется в трансферный вектор pFastBac™ Dual, содержащий интактную лидерную последовательность промотора полиэдрина (PH), обеспечивающую высокий уровень экспрессии целевого белка. Вектор не содержит собственных меток слияния, поэтому полигистидиновая метка для последующей аффинной очистки включена в состав интегрируемой вставки.

Полученная конструкция pFastBac™ Dual трансформируется в компетентные клетки *E. coli* MAX Efficiency DH10Bac с последующей транспозицией гена в бакмиду посредством сайта mini-attTn7. Селекция

рекомбинантных бакмид осуществляется методом синей/белой селекции с использованием антибиотиков (канамицин, гентамицин, тетрациклин), Bluo-gal и IPTG. Белые колонии содержат рекомбинантную бакмиду с интегрированным геном интересующего белка.

Далее рекомбинантная бакмидная ДНК трансфицируется в клетки *ExpiSf9*™ с использованием реагента ExpiFectamine Sf Transfection Reagent и среды Opti-MEM I Reduced Serum Medium для генерации вирусного штамма P0. Через 72–96 часов после трансфекции собирается вирусосодержащая среда, содержащая почкующийся вирус P0, который затем амплифицируется до получения штамма P1 с высоким титром ($>1\times10^8$ инфекционных вирусных частиц/мл). Титрование бакуловируса проводится методом проточной цитометрии на основании детекции оболочечного белка gp64.

Среда ExpiSf CD Medium является бессывороточной, химически определённой средой, предназначенной для культивирования клеток насекомых *ExpiSf9*™ в условиях высокой плотности и оптимальной экспрессии рекомбинантных белков. Среда включает аминокислоты (глутамин, аргинин, лейцин), витамины (биотин, тиамин), минеральные соли (фосфат натрия, хлорид калия), углеродные источники (глюкоза), антиоксиданты для предотвращения окислительного стресса, регуляторы pH (буферные системы на основе фосфатов) и стабилизаторы для защиты клеток от механических повреждений при встряхивании. Среда чувствительна к свету и требует хранения при температуре 2–8 °C в защищённом от света месте.

Экспрессия целевых белков осуществляется путем инфицирования клеток *ExpiSf9*™ полученным штаммом бакуловируса при оптимальной множественности заражения (MOI = 5). Для повышения эффективности экспрессии за 18–24 часа до инфицирования в среду добавляется специальный усилитель ExpiSf Enhancer. Сбор рекомбинантного белка проводится через 48–72 часа после инфицирования клеток.

Таким образом, разработанная система на основе клеточной линии *ExpiSf9*™ и бакуловирусной технологии Bac-to-Bac позволяет стабильно получать высокоочищенные рекомбинантные белки SARS-CoV-2 (RBD и Spike), обладающие необходимыми антигенными свойствами для дальнейшего использования в качестве активных фармацевтических субстанций вакцин против COVID-19.

Стадия биосинтеза играет ключевую роль в процессе культивирования клеток *ExpiSf9*™ для получения рекомбинантных белков SARS-CoV-2. Использование среды ExpiSf CD Medium, специально разработанной для высокоплотного роста и инфекций бакуловирусом, позволяет достигать высокой объемной продуктивности целевого белка. Среда является химически определённой, бессывороточной, без содержания белков, дрожжевого экстракта и компонентов животного происхождения, что обеспечивает воспроизводимость результатов и исключает риск контаминации.

Подбор условий культивирования направлен на поддержание удельной скорости роста, которая является основным параметром, определяющим эффективность синтеза белка.

Важным аспектом является использование среды в сочетании с усилителем экспрессии ExpiSf Enhancer, который увеличивает выход белка в три раза по сравнению с традиционными системами экспрессии.

Среда ExpiSf CD Medium готова к использованию и не требует добавления компонентов, таких как L-глутамин или поверхностно-активные вещества. Выбор температуры культивирования, плотности посева клеток, скорости орбитального встряхивания и состава питательной среды оказывает значительное влияние на кинетику роста клеток и синтез целевого белка. Например, использование среды ExpiSf CD Medium в сочетании с усилителем ExpiSf Enhancer позволяет достичь высокой плотности клеток и улучшить выход рекомбинантного белка. Кроме того, параметры индукции процесса, такие как множественность заражения (MOI), время экспрессии и концентрация вирусного штамма, требуют тщательной настройки для достижения оптимальных условий биосинтеза. Таким образом, использование среды ExpiSf CD Medium в сочетании с тщательно подобранными условиями культивирования позволяет эффективно управлять стадией биосинтеза, обеспечивая максимальную объемную продуктивность целевого белка при минимальных затратах времени и ресурсов.

3.2 Обоснование общей стратегии процесса культивирования

Разработка стратегии экспрессии рекомбинантных антигенов Spike (Wuhan-Hu-1 ΔFurin) и RBD (BA.5) SARS-CoV-2 в клеточной линии *Spodoptera frugiperda* (*ExpiSf9*™) с использованием системы Bac-to-Bac™ была основана на совокупном анализе литературных данных, особенностей целевых белков и рекомендаций производителя системы экспрессии – ExpiSf™ Expression System (Thermo Fisher Scientific, MAN0017532).

Экспрессия в данной системе индуцируется не химическими агентами или заменой субстрата, а путем трансдуцирования культуры экспрессирующим рекомбинантным бакуловирусом. Следовательно, стратегия процесса включает строгое разграничение на две фазы:

1) фаза накопления биомассы;

2) фаза экспрессии белка.

Ключевым параметром, определяющим эффективность системы, является удельная скорость роста клеток до момента инфицирования и подобранные параметры MOI (multiplicity of infection), что согласуется с задачей обеспечения высокого уровня экспрессии без нарушения физиологического состояния клеток.

Фаза накопления биомассы

Цель данного этапа – достижение высокой плотности клеток, при которой их физиологическое состояние остается благоприятным для эффективной транздукции и последующей синтетической активности. Использовалась безсывороточная, химически определённая среда ExpiSf™ CD Medium, рекомендованная производителем, обеспечивающая стабильный рост клеток без вариабельности, связанной с компонентами животного происхождения.

В отличие от дрожжевых систем, где изменение источника углерода служит триггером для индукции, здесь индуцирующим событием является

введение рекомбинантного вируса в культуру. Однако накопление биомассы всё равно подлежит оптимизации:

– Инокулюмы готовились из экспоненциально растущих культур с плотностью 2–5×10⁶ кл/мл;

– Клетки поддерживались при температуре 27 °C, в условиях агитации (125 об/мин) в колбах, заполненных на 30–35 % объёма;

– Целевой диапазон плотности на стадии подготовки к инфицированию (за 18–24 ч) – 4–6×10⁶ кл/мл с последующим разведением свежей средой до 5,0×10⁶ кл/мл; плотность на момент инфицирования составляет 6,5–7,0×10⁶ кл/мл.

Выбор режима газовой среды для клеточной линии ExpiSf9™ базировался на специфических метаболических потребностях клеток насекомых. В отличие от культур клеток млекопитающих, требующих поддержания атмосферы с 5–8 % CO2 для функционирования бикарбонатной буферной системы, использованная нами химически определенная среда ExpiSf™ CD Medium содержит высокоемкие фосфатные буферные агенты. В связи с этим культивирование осуществлялось в инкубаторах без экзогенной подачи CO2, что предотвращает нежелательное закисление среды и существенно снижает технологические затраты при масштабировании. Удовлетворение критически высокой потребности культуры в кислороде в логарифмической фазе роста обеспечивалось поддержанием рабочего коэффициента объемной массопередачи кислорода (kLa). Это достигалось применением колб Эрленмейера с вентилируемыми гидрофобными мембранами (0,2 мкм) и строго регламентированной скоростью орбитальной агитации, что исключало локальную гипоксию в высокоплотной суспензии (до 10×10⁶ клеток/мл).

Фаза экспрессии

Инициация фазы экспрессии осуществлялась посредством инфицирования клеточной культуры рекомбинантным бакуловирусом, несущим кассету экспрессии целевого антигена. В процессе технологического подбора множественность инфицирования (MOI) варьировали в диапазоне от 1 до 7 с последующим мониторингом кинетики процесса на ранних и поздних стадиях постинфекционного периода (от 0 до 120 часов). Для интенсификации процессов трансляции и максимизации выхода рекомбинантного продукта за 18–24 часа до инфицирования в культуральную среду вносили усилитель экспрессии ExpiSf™ Enhancer в соответствии с регламентом производителя. Отличительными технологическими особенностями разработанной стратегии являлись поддержание изотермического режима на уровне 27 °C без температурного сдвига после инфицирования, а также принципиальный отказ от применения физиологических стрессовых факторов или лимитирования по питательным субстратам. Межоперационный аналитический контроль кинетики экспрессии проводили на 48, 72 и 96 ч постинфекционного периода с применением методов электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга, что функционально предшествовало этапу препаративного выделения и металл-

хелатной аффинной очистки белков (Ni-NTA). Следовательно, реализованная стратегия культивирования была подобрана для достижения максимальной объемной продуктивности и обеспечения высокого качества целевого антигена при минимизации стресса клеточной популяции, что обеспечивает масштабируемость и высокую воспроизводимость технологического процесса, критически необходимых для наработки активных фармацевтических субстанций (АФС) в рамках доклинических исследований разрабатываемой субъединичной вакцины.

3.3 Конструирование рекомбинантного белка RBD вируса SARS-CoV-2

Рецептор-связывающий домен (RBD) Spike-белка SARS-CoV-2 является ключевым элементом вируса, обеспечивающим его взаимодействие с рецептором ACE2 на поверхности клеток-мишеней. Конструирование рекомбинантного белка SRBD (Spike RBD) для экспрессии в бакуловирусной системе было выполнено на основе данных о мутациях, характерных для варианта Omicron BA.5, полученных из базы GISAID. Основной целью работы являлось создание стабильного и функционального белка, способного эффективно связываться с ACE2 и демонстрировать высокую иммуногенность.

Белок RBD был сконструирован на основе последовательности Spike-белка SARS-CoV-2 (Thr323–Lys537), включающей ключевые мутации, характерные для варианта Omicron BA.5. Эти мутации включают G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y и Y505H. Данные изменения в аминокислотной последовательности обеспечивают повышенную аффинность к рецептору ACE2 и устойчивость к нейтрализующим антителам.

Для обеспечения стабильности конструкции был использован экспрессионный вектор pFastBac™ Dual, который позволяет эффективно экспрессировать белок в клеточной линии *ExpiSf9*™ с добавлением полигистидиновой метки на С-конце для последующей аффинной очистки. Последовательность белка была оптимизирована для предпочтений кодонов клеток насекомых с целью повышения эффективности трансляции мРНК. Оптимизированная последовательность гена SRBD была синтезирована *in vitro* и клонирована в трансферный вектор pFastBac™ Dual между сайтами рестрикции BamHI и HindIII. Конструкция включала сигнальный пептид MKFLVNVALVFMVVYISYIYADRSLR для секреции белка и полигистидиновая метка на С-конце для последующей очистки. После клонирования конструкция была трансформирована в клетки DH10Bac для получения рекомбинантной бакмидной ДНК. Наличие вставки подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров pUC/M13 и секвенированием Sanger.

Для экспрессии целевых антигенов SARS-CoV-2 в бакуловирусной системе были разработаны рекомбинантные генетические конструкции на базе трансферного вектора pFastBac™ Dual. На рисунке 1 представлена схема плазмидного вектора, кодирующего рецептор-связывающий домен (RBD) варианта Omicron BA.5. Аналогичная стратегия клонирования применена для

экстраклеточного домена полноразмерного спайкового белка штамма Wuhan-Hu-1, схема которого отражена на рисунке 2. Обе нуклеотидные последовательности были предварительно кодон-оптимизированы для трансляции в клетках насекомых, а также снабжены N-концевым сигнальным пептидом для направленной секреции продукта и С-концевой полигистидиновой меткой для последующей очистки.

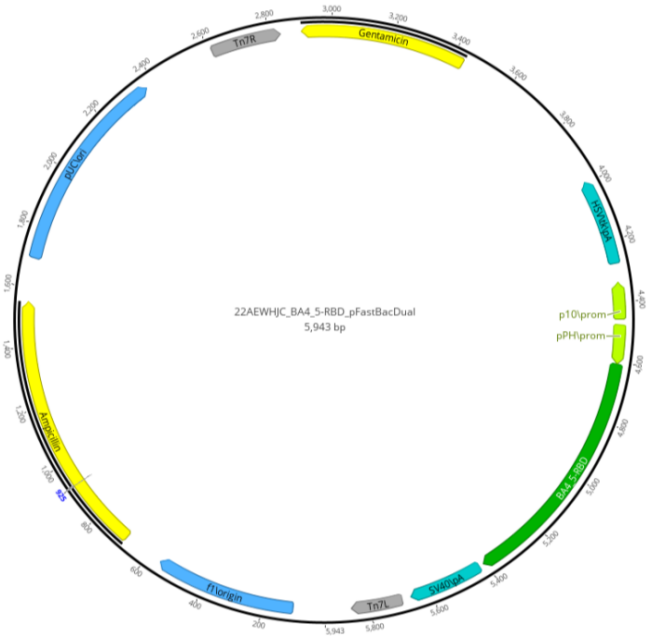


Рисунок 1 – Карта плазмидного вектора pFastBac™ Dual, содержащего оптимизированную генетическую конструкцию рекомбинантного белка RBD вируса SARS-CoV-2 (вариант Omicron BA.5)

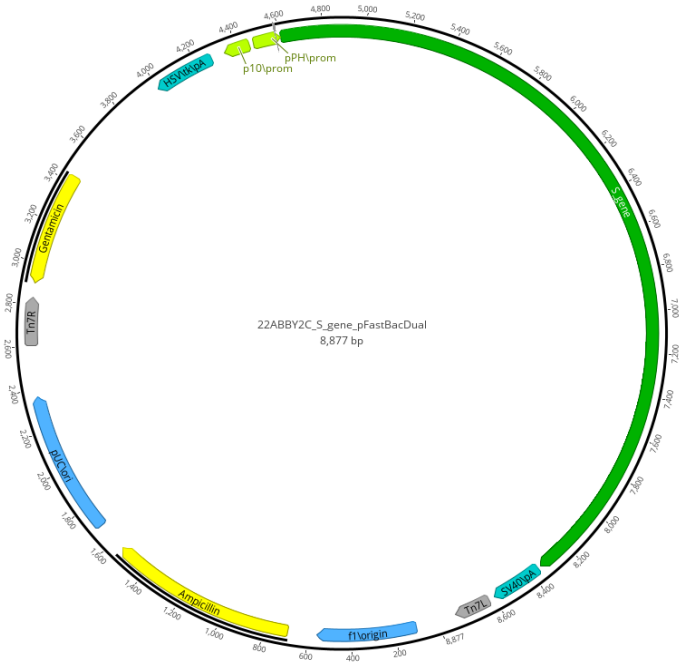


Рисунок 2 – Карта плазмидного вектора pFastBac™ Dual, содержащего генетическую конструкцию экстраклеточного домена рекомбинантного белка S (S-ECD, ΔFurin) вируса SARS-CoV-2

Spike-белок вируса SARS-CoV-2 играет ключевую роль в процессе взаимодействия вируса с клетками-мишенями, обеспечивая связывание с рецептором ACE2 и последующую мембранную фузию. Полноразмерный Spike-белок состоит из двух функциональных субдоменов – S1 и S2, которые отвечают за связывание с рецептором и слияние мембран соответственно. Конструирование рекомбинантного белка S-ECD (экстраклеточный домен Spike-белка) для экспрессии в бакуловирусной системе было выполнено на основе последовательности штамма Wuhan-Hu-1 с удалением сайта расщепления фурина. Основной целью работы являлось создание стабильного и функционального белка, способного эффективно взаимодействовать с антителами и демонстрировать высокую иммуногенность.

Рекомбинантный белок S-ECD был сконструирован на основе последовательности Spike-белка SARS-CoV-2, включающей 1273 аминокислотных остатка. В конструкции был удалён сайт расщепления фурина (ΔFurin), что позволило стабилизировать белок в префузионной конформации и предотвратить его преждевременное расщепление. Для обеспечения стабильности конструкции был использован экспрессионный вектор pFastBac™ Dual, который позволяет эффективно экспрессировать белок в клеточной линии *ExpiSf9*™.

Последовательность белка была оптимизирована для предпочтений кодонов клеток насекомых с целью повышения эффективности трансляции мРНК. На С-конце белка была добавлена полигистидиновая метка для последующей аффинной очистки методом металл-хелатной хроматографии.

Оптимизированная последовательность гена S-ECD была синтезирована *in vitro* и клонирована в трансферный вектор pFastBac™ Dual между сайтами рестрикции BamHI и HindIII. Конструкция включала сигнальный пептид мелиттина MKFLVNVALVFMVVYISYIYADRSLR для направления белка в секреторный путь и полигистидиновую метку для последующей аффинной очистки. Целевой продукт накапливается как во внеклеточной среде, так и в клеточно-ассоциированной форме, поэтому на очистку направляют обе фракции. Основные характеристики сконструированных рекомбинантных белков указаны в таблице 12.

После клонирования конструкция была трансформирована в клетки DH10Bac для получения рекомбинантной бакмидной ДНК. Наличие вставки подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров pUC/M13 и секвенированием Sanger.

Таблица 12 – Основные характеристики сконструированных рекомбинантных белков

Название белка	Длина последовательности (а.о.)	Внесённые мутации	Вектор	Сигнальный пептид	Метка для очистки
RBD	215	G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H	pFastBac™ Dual	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA DRSLR	His-tag
Spike (S-ECD)	1273 (ΔFurin)	Удален сайт расщепления фурином	pFastBac™ Dual	MKFLVNVALVFMVVYISYIYA DRSLR	His-tag

Первым шагом исследования стало получение плазмидных конструкций, несущих гены экстраклеточного домена Spike-белка (S-ECD, штамм Wuhan-Hu-1, ΔFurin) и рецептор-связывающего домена (RBD, вариант Omicron BA.5). Отбор референсных последовательностей выполнен по данным базы GISAID с учётом последовательностей изолятов, циркулировавших в Республике Казахстан (регистрационные номера EPI_ISL_514127, EPI_ISL_514126, EPI_ISL_514093). Для обеспечения возможности последующей аффинной очистки в последовательность была интегрирована гексагистидиновая метка (6×His), после чего целевые экспрессионные кассеты были субклонированы в трансферный вектор pFastBac™ Dual.

Биосинтез рекомбинантных антигенов S-ECD и RBD осуществляли с применением бакуловирусной системы экспрессии на базе коммерческой системы ExpiSf™ (Gibco) строго в соответствии с технологическим регламентом разработчика. В качестве клеточной фабрики использовали адаптированную к высокоплотному суспензионному росту линию *Sf9*, полученную из тканей *Spodoptera frugiperda*. Культивирование проводили в химически определенной бессывороточной среде, полностью лишенной дрожжевых экстрактов, белков и любых других компонентов животного происхождения.

В ходе подбора параметров был определен рабочий титр бакуловируса, составивший не менее 1×10^8 ивч/мл, который в дальнейшем применялся для

эффективной трансдукции культуры *ExpiSf9*™. Максимальная трансляционная активность и наибольший выход целевого белка достигались при инфицировании популяции с плотностью жизнеспособных клеток в диапазоне от $6{,}5\times10^6$ до $7{,}0\times10^6$ кл/мл.

Реализация описанного биотехнологического протокола обеспечила наработку очищенных рекомбинантных белков с выходом 1,5–2,0 мг/л для S-ECD и 2,0–2,4 мг/л для RBD. При этом степень очистки продукта превышала 95 % (по результатам электрофореза SDS-PAGE), а остаточное содержание бактериальных эндотоксинов, определённое рФС-методом, не превышало нормы, установленной спецификацией на АФС (не более 1,0 ЭЕ/мкг белка, таблица 1); фактические результаты приведены в подразделе 3.7.

3.4 Результаты *in silico* конструирования целевых антигенов

В результате проведенного *in silico* анализа геномных баз данных (GISAID) циркулирующих штаммов SARS-CoV-2 была сформирована консенсусная последовательность. В нее были включены критические мутации, характерные для варианта Omicron BA.5 (G339D, S371L, K417N, E484A и др.), напрямую влияющие на иммуногенность антигена. Для обеспечения максимального уровня экспрессии в клетках насекомых (*ExpiSf9*™) исходная нуклеотидная последовательность была подвергнута кодонной оптимизации с устранением редких кодонов и скрытых сайтов сплайсинга.

Секвенирование и анализ геномных данных

Использование баз данных GISAID для получения последовательностей штаммов SARS-CoV-2

Для достижения одной из ключевых задач работы – разработки конструкций рекомбинантных белков Spike и RBD с учетом локальных особенностей SARS-CoV-2 – был выполнен детальный анализ геномных последовательностей вируса. Основным источником данных служила международная база GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data), обладающая крупнейшим собранием последовательностей SARS-CoV-2.

Дизайн и оптимизация генов Spike и RBD для экспрессии

Опираясь на полногеномные последовательности из международной базы данных GISAID, нами был осуществлен рациональный дизайн генов Spike и RBD, адаптированных для эффективной экспрессии в бакуловирусной системе. С целью обеспечения максимального выхода рекомбинантных белков в культуре клеток насекомых *ExpiSf9*™ проведена глубокая кодонная оптимизация нуклеотидных последовательностей с применением алгоритмов программного комплекса GeneOptimizer от Thermo Fisher Scientific. Данный этап биоинформатической подготовки позволил элиминировать редкие для клеток-хозяев кодоны, минимизировать количество повторяющихся участков для предотвращения формирования нежелательных вторичных структур мРНК, а также интегрировать необходимые регуляторные элементы трансляции, включая консенсусную последовательность Козак. В архитектуру целевых генов были внесены функциональные структурные модификации: для экспрессии белка Spike использовалась последовательность исключительно его внеклеточного домена, лишенная гидрофобного трансмембранного участка, что

технологически упрощало последующую экстракцию антигена. В свою очередь, структура рецептор-связывающего домена была дополнена полигистидиновой меткой для обеспечения возможности высокоселективной аффинной очистки. Финальная верификация спроектированных генетических конструкций на предмет отсутствия скрытых неспецифических мутаций и потенциальных сдвигов рамки считывания осуществлялась с использованием инструментария NCBI BLAST.

Для предиктивной оценки конформационной стабильности и корректного фолдинга рекомбинантных антигенов применялись методы молекулярного моделирования вторичной и третичной структур с привлечением биоинформатических систем SWISS-MODEL и AlphaFold. На начальном этапе алгоритмами PSIPRED выполнялся анализ вторичной структуры, позволивший детально охарактеризовать топологию распределения α-спиралей, β-слоев и неупорядоченных участков в полипептидной цепи. Последующее прогнозирование пространственной 3D-архитектуры белков проводилось с обязательным учетом влияния посттрансляционных модификаций. В частности, при построении моделей в среде SWISS-MODEL, базирующихся на актуальных кристаллографических шаблонах из репозитория Protein Data Bank, для повышения прецизионности расчетов интегрировались экспериментальные данные о критических сайтах N-гликозилирования, таких как аминокислотные остатки N331 и N343 целевого белка Spike.

3.5 Оценка ростовых свойств и продуктивности системы экспрессии белков Spike и RBD SARS-CoV-2 с использованием системы ExpiSf™

Для всесторонней оценки ростовых характеристик клеточной линии *ExpiSf9*™ и продуктивности системы экспрессии рекомбинантных антигенов Spike (Wuhan-Hu-1 ΔFurin) и RBD (BA.5) вируса SARS-CoV-2 была проведена серия экспериментов по периодическому (batch) культивированию в химически определенной бессывороточной среде ExpiSf™ CD Medium. Процесс осуществлялся в колбах Эрленмейера объемом от 30 до 250 мл при рабочем заполнении 30–35 % с исходной посевной плотностью инокулята в пределах $0{,}5–1{,}0\times10^{6}$ клеток/мл, что строго соответствовало технологическому регламенту Thermo Fisher Scientific (протокол MAN0017532). Ежедневный мониторинг ростовых параметров включал определение концентрации, плотности и жизнеспособности клеточной популяции методом исключения трипанового синего с применением автоматического счетчика. В отличие от автоиндукции в дрожжевых системах (обусловленной исчерпанием субстрата), индукция биосинтеза целевых белков в данной модели инициировалась прямой вирусной трансдукцией культуры рекомбинантными бакуловирусами с множественностью заражения (MOI) от 1 до 5. Для максимизации выхода белкового продукта за 18–24 часа до инфицирования в питательную среду вносили специализированный усилитель экспрессии ExpiSf™ Enhancer. На протяжении всего биотехнологического цикла поддерживались подобранные физико-химические параметры: температура на уровне 27 °C и орбитальная агитация со скоростью 125 об/мин (при диаметре орбиты 25 мм). Регулярный пробоотбор культуральной жидкости позволял проводить комплексный анализ

динамики роста клеток (соотношение живых и мертвых пулов), мониторинг изменений водородного показателя (pH) среды, а также количественную и качественную оценку накопления антигенов Spike и RBD методами электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга. Полученные эмпирические данные полностью коррелировали с референсными профилями системы ExpiSf™: культура характеризовалась стремительной экспоненциальной фазой роста вплоть до достижения целевой плотности инфицирования 5–10×10⁶ клеток/мл. Зафиксированные параметры ростовой кривой, жизнеспособности и динамики продукции целевых белков подтверждают высокую стабильность и трансляционную эффективность отработанной системы экспрессии, что всецело обосновывает ее применимость для дальнейшего масштабирования технологического процесса и наработки партий рекомбинантных вакцин для доклинических исследований.

3.6 Технологические параметры генерации и титрования рабочего банка бакуловируса

Создание генетической конструкции, экспрессирующей интересующие антигены, базируется на использовании системы Bac-to-Bac. Процесс инициируется клонированием целевого гена в вектор экспрессии pFastBac™ Dual посредством энзиматической рестрикции и лигирования. Особенностью вектора pFastBac™ Dual является наличие интактной лидерной последовательности промотора полиэдрина (PH), которая обеспечивает сверхвысокий уровень транскрипции целевого гена на поздних стадиях вирусной инфекции. Поскольку данный вектор классифицируется как non-fusion (не содержащий собственных меток слияния), интегрируемая вставка должна обязательно включать стартовый кодон ATG для инициации трансляции и соответствующий стоп-кодон для ее корректного завершения.

После успешного лигирования вставки в pFastBac™ Dual, плазмидная конструкция трансформируется в штаммы *E. coli* с генотипом recA, endA для амплификации ДНК. Селекция первичных трансформантов проводится на агаровых пластинах LB, обогащенных 100 мкг/мл ампициллина, благодаря наличию соответствующего гена резистентности в составе вектора. Из полученных колоний выделяется высококачественная плазмидная ДНК с использованием наборов, которая затем подвергается рестрикционному картированию и ПЦР-скринингу для верификации наличия вставки и ее правильной ориентации. Финальным этапом верификации клона является секвенирование для подтверждения сохранения рамки считывания, после чего формируется криоконсервированный (с 15 % стерильным глицерином) запас плазмидной ДНК для хранения при -80 °C.

Очищенная плазмидная конструкция pFastBac трансформируется в специализированные компетентные клетки MAX Efficiency DH10Bac. Для этого 100 мкл суспензии клеток инкубируются с 1 нг (5 мкл) плазмидной ДНК на льду в течение 30 минут. Критическим этапом является тепловой шок: клетки помещаются на водяную баню строго при 42 °C ровно на 45 секунд без встряхивания, после чего немедленно охлаждаются на льду. Данная процедура кратковременно нарушает целостность клеточной стенки, позволяя ДНК

проникнуть внутрь. Далее вносится 900 мкл среды SOC комнатной температуры, и пробирки инкубируются при 37 °C (225 об/мин) в течение 4 часов.

Выявление успешных рекомбинантов базируется на механизме сине-белой селекции. Трансформированные клетки высеваются на чашки LB-агара, содержащие комплекс антибиотик (50 мкг/мл канамицина), а также хромогенный субстрат Bluo-gal (100 мкг/мл) и индуктор IPTG (40 мкг/мл). Вставка гена в сайт mini-attTn7 разрушает рамку считывания пептида LacZα, блокируя ферментативную активность β-галактозидазы. Таким образом, колонии, содержащие рекомбинантную бакмиду, остаются неокрашенными, тогда как клетки с исходной бакмидой приобретают синий цвет. Отбор истинных белых колоний проводится после 48 часов инкубации. Изолированная из них рекомбинантная бакмидная ДНК верифицируется методом ПЦР с праймерами pUC/M13. Оптимизированный протокол амплификации включает использование полимеразы Platinum Taq: денатурация при 93 °C (3 мин) и 94 °C (45 с), отжиг при 55 °C (45 с) и элонгация при 72 °C (5–7 мин). Успешная транспозиция генерирует фрагмент размером около 2300 п.н. плюс размер вставки.

Культивирование клеток ExpiSf9™

Для экспрессии рекомбинантного белка Spike была выбрана клеточная линия *ExpiSf9™*, характеризующаяся высокой устойчивостью в условиях суспензионного культивирования и способностью к значительному повышению плотности клеточной массы. Этот процесс требовал особо точного соблюдения всех параметров, чтобы обеспечить необходимые условия для успешной экспрессии белка.

Для обеспечения безупречной воспроизводимости производственного процесса и полного соответствия стандартам GMP и руководству ICH Q5D, в рамках исследования была внедрена двухуровневая система банкирования. Клеточный субстрат *ExpiSf9™* поддерживался в виде Главного банка клеток и Рабочего банка клеток, надежно криоконсервированных в парах жидкого азота. Транспозиция экспрессионных кассет в геном бакуловируса *in vivo* завершалась формированием Главного банка вирусных посевных материалов. Амплификация MVS применялась исключительно для генерации Рабочих вирусных банков первых пассажей, используемых для инфицирования биореакторов. Генетическая стабильность подтверждалась на пределе клеточного возраста *in vitro* путем ПЦР-амплификации и секвенирования локуса вставки в рабочий вирусный банк, что полностью нивелировало риски генетического дрейфа и накопления дефектных интерферирующих частиц.

Оценка инфекционного титра рекомбинантного бакуловируса

Титрование бакуловируса и расчет MOI

Ключевым этапом разработки технологии получения субъединичных вакцин являлась генерация высокотитражного рабочего банка бакуловируса (P1/P2) с интегрированным геном целевого антигена. Успешность интеграции гена в бакмидную ДНК и эффективность липид-опосредованной трансфекции клеток *ExpiSf9™* оценивались по способности генерировать инфекционные

вирусные частицы. Для определения точного инфекционного титра вирусного стока, необходимого для последующего расчета множественности инфицирования (MOI) в промышленном масштабе, был применен метод проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к белку gp64.

Экспериментальные данные титрования

Для определения инфекционного титра бакуловируса использовали метод проточной цитометрии с антителами против оболочечного белка gp64. Результаты анализа трёх ключевых образцов представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты титрования бакуловирусных штаммов

Образец	Разведение	% gp64-позитивных клеток	Рассчитанный титр (ивч/мл)
«40»	1:1000	9,84 %	$9{,}84\times10^{7}$
«80»	$1:10^{4}$	1,61 %	$1{,}61\times10^{8}$
«Old»	$1:10^{4}$	1,69 %	$1{,}69\times10^{8}$

На рисунке 3 представлены результаты титрования рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего антигенные белки SARS-CoV-2, полученные методом проточной цитометрии. Анализ основан на наложении гистограмм клеточной популяции *ExpiSf9*™, окрашенной специфическими антителами к оболочечному белку бакуловируса gp64. Такой подход позволяет оценить долю инфицированных клеток при различных разведениях вирусного препарата и, следовательно, использовать полученные данные для расчета вирусного титра.

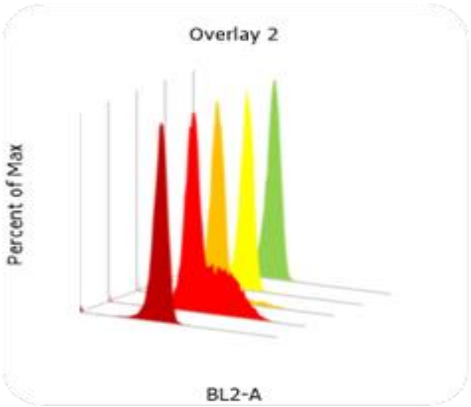


Рисунок 3 – Результаты анализа титрования рекомбинантного бакуловируса методом проточной цитометрии. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции в канале BL2-A, по оси ординат – доля от максимума

Контрольный образец, представленный интактными клетками *ExpiSf9*™, не подвергавшимися инфицированию, характеризовался лишь фоновым уровнем окрашивания. Доля позитивных клеток в данной популяции не превышала 0,5 %, что свидетельствует о низком уровне неспецифического

сигнала. При инфицировании клеток вирусом в разведении 1:100 наблюдалось резкое увеличение доли gp64-позитивных клеток, достигавшей примерно 60 %, что указывает на высокую концентрацию вирусных частиц в данном образце. В разведении 1:1000 количество позитивных клеток снижалось приблизительно до 10 %. Именно такой диапазон считается наиболее информативным для корректного расчета титра, поскольку при низкой доле инфицированных клеток уменьшается вероятность наложения событий и повышается точность оценки. При дальнейшем разведении до 1:10000 доля позитивной популяции составляла около 1,5–2,0 %, что также позволяло использовать этот образец для расчета титра. В наиболее высоком разведении, 1:100000, число позитивных клеток было минимальным и практически соответствовало контрольному уровню.

На основании полученных данных для дальнейших экспериментов была выбрана множественность инфицирования (MOI), равная 5. Такой режим обеспечивал наилучшее из испытанных соотношение между эффективностью инфицирования и сохранением жизнеспособности клеточной популяции. При значениях MOI ниже 5 заражение носило неполный характер и охватывало не более 85 % клеток. Напротив, при MOI выше 10 отмечалось ускоренное развитие цитопатического эффекта и преждевременный лизис клеток, вследствие чего жизнеспособность культуры уже через 48 ч снижалась ниже 70 %. Использование MOI=5 позволяло инфицировать более 95 % клеток при сохранении их жизнеспособности на уровне выше 85 %.

Дополнительным аргументом в пользу выбора данного значения послужили особенности кинетики экспрессии целевого белка. При MOI=5 максимальное накопление рекомбинантного продукта наблюдалось через 72 часа после инфицирования, тогда как при MOI=10 пик экспрессии достигался раньше, примерно к 48 часу, однако в дальнейшем сопровождался снижением уровня белка, что, вероятно, было связано с усилением деградационных процессов на фоне повреждения клеток. Важно отметить, что при MOI=5 обеспечивалось полное гликозилирование RBD, что было подтверждено данными масс-спектрометрического анализа.

С практической точки зрения выбранный режим также оказался наиболее рациональным, поскольку позволял снизить расход вирусного инокулума. Для инфицирования 30 мл клеточной культуры требовалось 3,7 мл вирусного препарата, что делало процесс более экономичным. Кроме того, титр вируса сохранял стабильность после трех циклов замораживания и оттаивания, а колебания не превышали ±5 %, что свидетельствует о высокой устойчивости полученного вирусного материала при хранении и повторном использовании.

Достоверность выбранных условий была подтверждена результатами контроля качества. При анализе образцов методом SDS-PAGE и вестерн-блоттинга выявлялись четкие белковые полосы, соответствующие расчетной молекулярной массе целевых продуктов: около 25 кДа для RBD и около 140–160 кДа для полноразмерного Spike-белка. Функциональная активность экспрессированного RBD подтверждалась в тесте связывания с ACE2: для варианта BA.5 значение EC_{50} составляло 12 нМ, тогда как для Wuhan-Hu-1 – 8 нМ. Кроме того, вирусный препарат сохранял высокий титр, превышающий

1×10^8 инфекционных вирусных частиц на мл, после шести месяцев хранения при температуре –80 °C.

Сравнительный анализ различных значений MOI показал, что именно MOI=5 является наиболее предпочтительным режимом. При MOI=3 выход белка составлял 0,8–1,2 мг/л. Повышение MOI до 5 сопровождалось выходом роста до 1,5–2,0 мг/л для S-ECD и 2,0–2,4 мг/л для RBD и повышением чистоты до уровня не ниже 95 %. При дальнейшем увеличении нагрузки до MOI=7 выход снижался до 1,0–1,4 мг/л, а чистота составляла 90–93 %. Таким образом, MOI=5 обеспечивал наилучшее сочетание продуктивности, качества рекомбинантного белка и сохранности клеточной культуры.

Выбранный технологический протокол с множественностью инфицирования (MOI) равной 5 обеспечивает воспроизводимое получение высокотитражного рабочего банка бакуловируса ($1,61–1,69\times10^8$ ивч/мл) и наибольший выход рекомбинантных белков (1,5–2,0 мг/л). Комбинация строгого контроля MOI, использования суспензионной клеточной линии *ExpiSf9*™ и химически определённой среды ExpiSf CD Medium позволяет эффективно масштабировать процесс для промышленного производства активных фармацевтических субстанций (АФС) и готовых лекарственных форм субъединичных вакцин.

Подбор условий культивирования клеточной линии ExpiSf9™

В результате серии проведённых экспериментов были подобраны рабочие условия культивирования клеточной линии *ExpiSf9*™, обеспечивающие наивысший уровень экспрессии рекомбинантных антигенов Spike и RBD SARS-CoV-2. Оценивались такие ключевые параметры, как плотность посева клеток, множественность инфицирования (MOI), температура и продолжительность культивирования.

Влияние плотности посева клеток на эффективность экспрессии рекомбинантных белков

Было показано, что рабочим диапазоном плотности посева клеток для достижения максимальной продукции белка выбран интервал от $6,5\times10^6$ до $7,0\times10^6$ клеток/мл. При более низких плотностях посева (менее $5,0\times10^6$ клеток/мл) наблюдалось существенное снижение конечной концентрации экспрессируемых белков (на 20–30 %), что связано с недостаточной плотностью культуры для эффективного заражения и последующего синтеза белка. При инфицировании при плотности выше $7,5\times10^6$ клеток/мл происходило преждевременное истощение питательных веществ в среде, что приводило к снижению жизнеспособности клеток и уменьшению выхода белка.

Подбор множественности инфицирования (MOI)

Рабочее значение MOI, обеспечивающее наибольшую продукцию белка Spike и RBD, составило 5 MOI. При более низких значениях (MOI = 1, 3) наблюдалось снижение общей продуктивности клеток, что подтверждалось меньшей концентрацией рекомбинантного белка (снижение до 40 %). Повышение MOI до 7 сопровождалось снижением выхода белка и ускоренным снижением жизнеспособности клеток (ниже 80 % на 72 ч культивирования), а

при MOI выше 10 – развитием цитопатического эффекта и падением жизнеспособности ниже 70 % уже к 48 ч.

Влияние температуры культивирования на выход рекомбинантных белков

Было установлено, что рабочая температура культивирования инфицированных клеток *ExpiSf9*™ составляет 27 °C. При повышении температуры до 30 °C и выше отмечалось снижение общей продуктивности и жизнеспособности клеток (менее 70 % на 72 часа). Напротив, при более низкой температуре (24–25 °C) снижалась скорость экспрессии рекомбинантных белков, хотя общая жизнеспособность клеток оставалась высокой (более 90 %).

Определение продолжительности культивирования

Рабочим временем культивирования клеток *ExpiSf9*™, обеспечивающим максимальный выход рекомбинантных белков Spike и RBD, было 72 ч после инфицирования. При более раннем сборе белка (48 ч) продуктивность была ниже на 25–30 %, что связано с недостаточным накоплением продукта. Продление культивирования до 96 и 120 часов не приводило к увеличению концентрации целевых белков, а жизнеспособность клеток к этому времени снижалась до 60–70 %, что негативно отражалось на чистоте и выходе продукта.

Итоговые параметры культивирования клеток *ExpiSf9*™ приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Рабочие условия культивирования клеток *ExpiSf9*™ для продукции рекомбинантных белков Spike и RBD

№ п/п	Параметр	Рабочее значение
1	Плотность посева клеток	6,5–7,0×10⁶ клеток/мл
2	Множественность инфицирования (MOI)	5
3	Температура культивирования	27 °C
4	Продолжительность культивирования	72 ч

Оценка уровня экспрессии рекомбинантных белков методом SDS-PAGE и вестерн-блоттинга

Анализ экспрессии рекомбинантных белков Spike и RBD был проведён методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE), а также подтверждён вестерн-блоттингом с использованием специфических антител против полигистидиновой метки.

По результатам SDS-PAGE и вестерн-блоттинга была подтверждена успешная экспрессия рекомбинантных белков. Для белка Spike (S-ECD) выявлена доминирующая полоса с ожидаемым молекулярным весом около 140–160 кДа, теоретическая молекулярная масса мономерной цепи S-ECD (без гликанов) – 131 кДа. Для рекомбинантного белка RBD была обнаружена отчётливая полоса с молекулярной массой около 25–28 кДа, что соответствует расчётной молекулярной массе белка с учетом His-tag и посттрансляционных модификаций. Белки экспрессировались эффективно (рисунок 4).

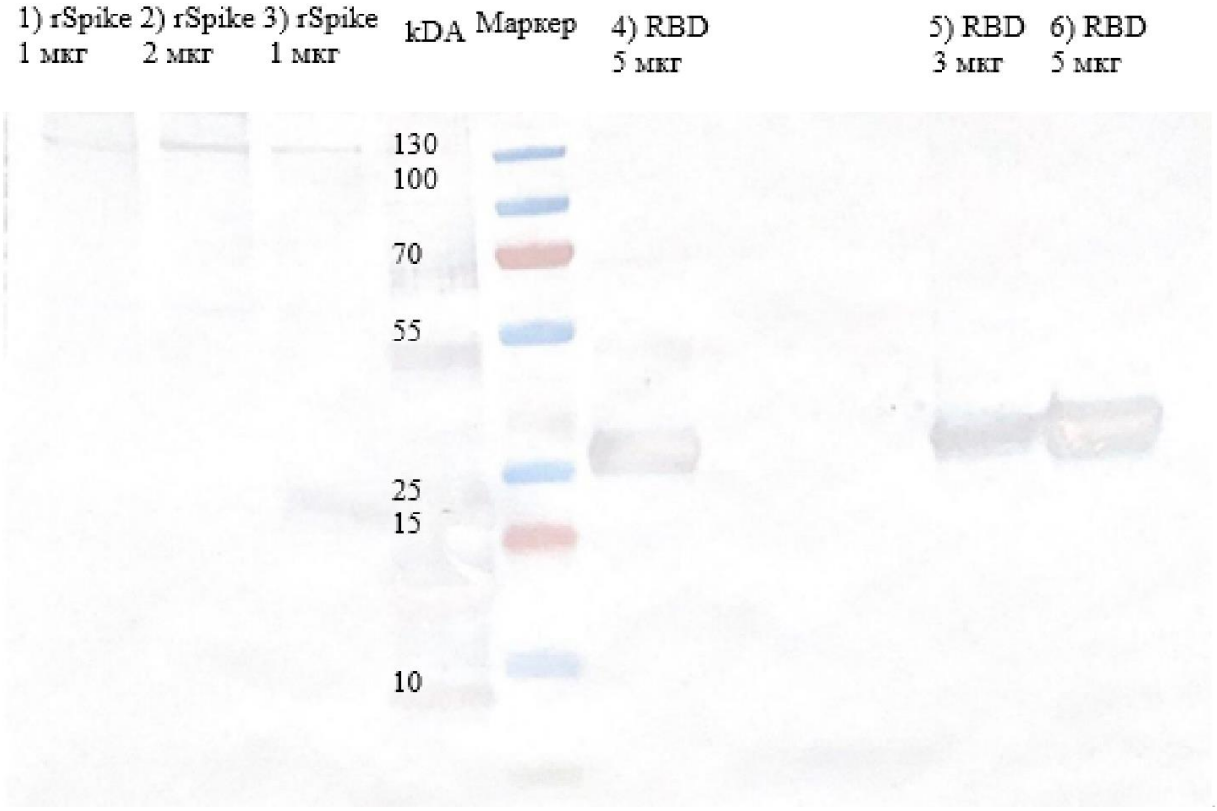


Рисунок 4 – Анализ экспрессии целевых рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2. На электрофореграмме (вестерн-блот с анти-His антителами) представлены результаты детекции белка Spike в виде высокомолекулярной полосы около 140–160 кДа и белка RBD в виде полосы 25–28 кДа. Маркер молекулярных масс – PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 130 kDa расположен в центральном треке

Определение выхода очищенных рекомбинантных белков

Количественный анализ очищенной активной фармацевтической субстанции, полученной после аффинной хроматографии на Ni-NTA-матрице, гель-фильтрации и ультрафильтрации, позволил определить выход целевых белков в расчёте на литр культуральной жидкости. Установлено, что выход очищенного белка Spike (S-ECD) составлял 1,5–2,0 мг/л, тогда как для белка RBD данный показатель находился в пределах 2,0–2,4 мг/л. Более высокий выход RBD обусловлен совокупностью двух факторов: меньшей молекулярной массой и более благоприятными условиями секреции данного белка, а также меньшими потерями на стадии ультрафильтрации при использовании мембраны с пределом отсечения 10 кДа по сравнению с мембраной 100 кДа для S-ECD.

Подбор времени сбора рекомбинантных белков после инфекции

Изучение динамики экспрессии показало, что наиболее рациональным сроком сбора целевого продукта является 72 ч после инфицирования клеток. При отборе материала через 48 часов количество накапливаемого белка оставалось ниже уровня, достигаемого к 72 ч, что сопровождалось снижением

выхода примерно на 30–35 %. Продление культивирования до 96 часов и более не обеспечивало существенного прироста продукции, однако сопровождалось ухудшением качества образцов вследствие снижения жизнеспособности клеток менее чем до 70 %. Это, в свою очередь, могло способствовать увеличению содержания клеточных примесей и отрицательно влиять на последующие этапы выделения и очистки белка. Таким образом, именно 72-часовой интервал после инфицирования следует рассматривать как рабочий для сбора рекомбинантных белков в данной системе.

Совокупность полученных данных указывает на то, что система *ExpiSf9*™-BEVS характеризуется не только высокой продуктивностью, но и воспроизводимостью, обеспечивая получение рекомбинантных белков Spike и RBD SARS-CoV-2 в объемах, достаточных для последующего выделения, очистки и проведения структурно-функциональных исследований.

Выбор состава лизирующего буфера для выделения рекомбинантного белка RBD SARS-CoV-2

Подбор состава лизирующего буфера для выделения рекомбинантных белков SARS-CoV-2 осуществлялся с учетом условий последующей аффинной хроматографии на Ni-NTA-сорбенте, а также в соответствии с регламентом лаборатории и рекомендациями производителя системы ExpiSf Expression System. Поскольку исследуемый белок содержал поли-гистидиновый тег на С-конце, при выборе компонентов буфера основное внимание уделялось обеспечению эффективного высвобождения белка из клеточного материала, сохранению его растворимости и созданию условий для селективного связывания с никель-хелатной матрицей.

Для уменьшения неспецифического связывания сопутствующих клеточных белков в состав буфера были включены 30 мМ имидазола и 500 мМ хлорида натрия. Наличие имидазола в низкой концентрации позволяло снизить фоновое взаимодействие примесных белков с сорбентом, не препятствуя при этом связыванию His-меченого целевого продукта. Повышенная ионная сила среды за счет NaCl дополнительно способствовала уменьшению неспецифических белок-белковых и белок-матрица взаимодействий.

Для повышения эффективности экстракции и предотвращения агрегации рекомбинантного белка в буфер вводили 1 % Triton X-100. Использование данного неионогенного детергента обеспечивало разрушение клеточных мембран и способствовало переводу целевого белка в растворимую фракцию. Это имело особенно важное значение для последующего хроматографического этапа, поскольку наличие агрегированных форм могло приводить к снижению выхода и ухудшению качества очищенного препарата.

С целью предотвращения протеолитической деградации белка после лизиса клеток в состав буфера включали ингибиторы протеаз. В частности, PMSF применяли в концентрации 1 мМ в качестве ингибитора сериновых протеаз. Дополнительно использовали коктейль ингибиторов протеаз широкого спектра действия согласно инструкции производителя. Такой подход позволял минимизировать деградацию рекомбинантного RBD и сохранять его структурную целостность в процессе выделения.

Отдельно был подобран показатель pH буфера, поскольку эффективность связывания His-меченых белков с Ni-NTA-сорбентом в значительной степени определяется кислотно-основными условиями среды. Установлено, что диапазон pH 7,4–8,0 является наиболее благоприятным как для связывания белка с сорбентом, так и для поддержания его растворимости. При снижении pH ниже 7,0 наблюдается ослабление координационного взаимодействия гистидиновых остатков с ионами никеля, что сопровождается потерей части целевого продукта. В то же время в интервале pH 7,4–8,0 белок RBD сохранял стабильность и не проявлял выраженной склонности к агрегации, что было принципиально важно для сохранения его нативных свойств.

На основании проведенного подбора был выбран лизирующий буфер следующего состава: 20 мМ натрий-фосфатный буфер с pH 7,4–8,0, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазола, 1 % Triton X-100, 1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз широкого спектра действия.

Использование данного буфера обеспечило эффективную экстракцию целевого белка из клеточного осадка ExpiSf9™ и минимизировало потери продукта. Поскольку целевой белок накапливается как в культуральной жидкости, так и в клеточно-ассоциированной форме, на аффинную хроматографию направляли объединённый образец: осветлённую центрифугированием культуральную жидкость и лизат клеточного осадка, смешанные перед нанесением на колонку и повторно осветлённые. Схема идентична для белков S-ECD и RBD и создала рабочие условия для очистки на Ni-NTA-колонке.

3.7 Выделение и очистка белка

Процесс масштабируемой экспрессии рекомбинантных белков унифицирован для полноразмерного антигена Spike и мономерного домена RBD на основе клеточной линии *ExpiSf9*™. Субкультивирование клеток проводится до достижения плотности 5×10^6 – 10×10^6 кл/мл при жизнеспособности не ниже 90 %, после чего за сутки до инфицирования культура разводится свежей средой до итоговой плотности 5×10^6 кл/мл. На данном этапе в суспензию вносится химический стимулятор ExpiSf Enhancer, необходимый для модификации клеточного метаболизма и повышения эффективности вирусной инвазии, что обеспечивает максимальный выход рекомбинантного продукта после ночной инкубации.

Десорбция очищенного белка Spike или RBD инициируется подачей линейного градиента имидазола до финальной концентрации 500 мМ, которая эффективно конкурирует за сайты связывания Ni^{2+}. Качество полученных фракций верифицируется методом электрофореза SDS-PAGE в градиентных бис-трис гелях, где образцы денатурируются при 100 °C в присутствии 50 мМ дитиотреитола для восстановления дисульфидных связей и корректной идентификации молекулярной массы. Визуализация результатов проводится путем окрашивания Кумасси бриллиантовым синим, а завершение технологического цикла предусматривает обязательную дезинфекцию системы ÄKTA 20 % раствором этанола по протоколу CIP.

Контроль процесса хроматографической очистки осуществлялся в режиме реального времени по поглощению элюата при длине волны 280 нм и электропроводности. Типичный хроматографический профиль прогона приведён на рисунке 5.

На стадии нанесения образца регистрируется интенсивный сигнал поглощения, превышающий верхнюю границу диапазона детектора, что соответствует проскоку несвязавшихся белков объединённого образца; одновременное снижение электропроводности отражает прохождение через колонку образца с меньшей ионной силой по сравнению со стартовым буфером. Ступенчатая отмывка обеспечивает возвращение поглощения к базовой линии, что свидетельствует об удалении слабосвязавшихся и неспецифически сорбированных белков. Целевой белок десорбируется при подаче линейного градиента имидазола, что регистрируется как возрастание электропроводности с одновременным появлением пика поглощения; элюат собирается во фракции объёмом 1,0 мл. По завершении элюции колонка промывается и реэквилибрируется стартовым буфером.

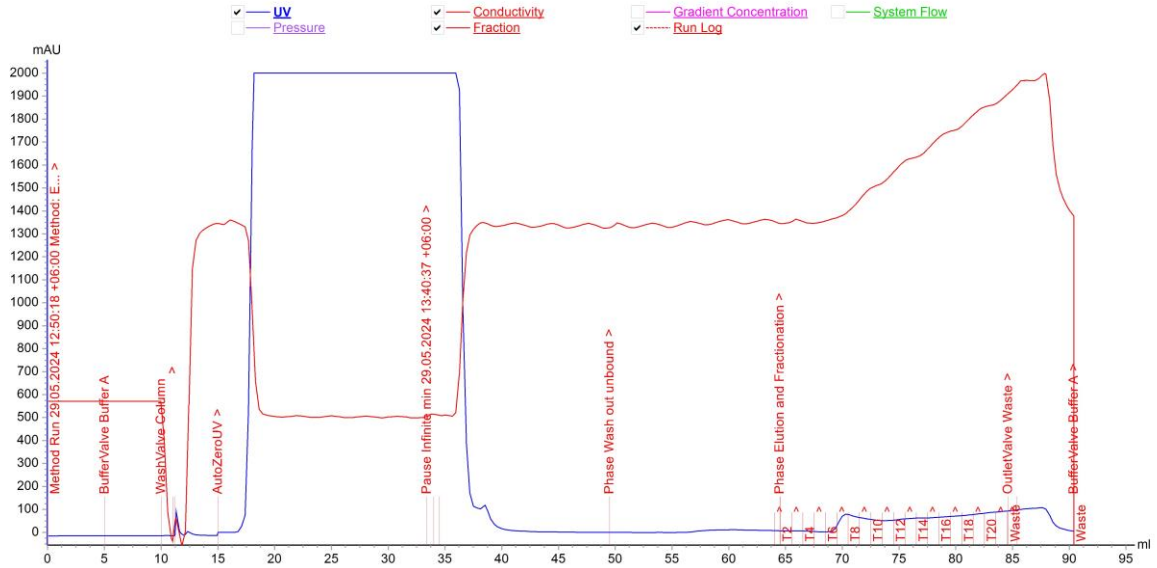


Рисунок 5 – Хроматографический профиль очистки рекомбинантного белка SARS-CoV-2 методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA-матрице. Синяя кривая – поглощение при 280 нм, мAU; красная кривая – электропроводность. Обозначены стадии: эквилибрация колонки (до 17 мл); нанесение осветлённого объединённого образца и проскок несвязавшихся белков (17–36 мл, сигнал УФ за пределами диапазона детектора, сопровождается снижением электропроводности); ступенчатая отмывка слабосвязавшихся белков (36–64 мл, выход поглощения на базовую линию); линейная градиентная элюция целевого белка с отбором фракций по 1,0 мл (64–85 мл, сопровождается возрастанием электропроводности по мере увеличения концентрации имидазола); промывка и реэквилибрация колонки (85–91 мл). Профиль идентичен для белков S-ECD и RBD, поскольку очистка обоих антигенов выполнялась по одному методу

Условия работы хроматографической системы ÄKTA start, программное обеспечение UNICORN start 1.3. Колонка: HiTrap, Ni-NTA агароза, объём колонки 1,0 мл. Скорость потока 0,5 мл/мин; предельное рабочее давление 0,4 МПа. Эквилибрация: 5 объёмов колонки стартовым буфером. Нанесение образца: 19,0 мл осветлённого лизата, объём вытеснения 0,5 мл. Отмывка: две ступени по 15 объёмов колонки при концентрации элюирующего буфера 3 и 6 % соответственно. Элюция: линейный градиент от 0 до 100 % элюирующего буфера в объёме 20 мл. Фракционирование: фиксированный объём фракции 1,0 мл. Реэквилибрация: 5 объёмов колонки. Детектирование: УФ, 280 нм; контроль электропроводности.

Для обеспечения эффективной очистки целевого продукта от избытка токсичного имидазола и его последующего концентрирования в рамках технологического регламента предусмотрен этап ультрафильтрации и диафильтрации. Интегрированы одноразовые картриджные фильтры-концентраторы Pierce Protein Concentrators PES от Thermo Fisher Scientific. Процесс реализуется в формате центрифужной фильтрации типа «спин-колонка», где движущей силой выступает гидростатическое давление, создаваемое центробежной силой. При использовании полупроницаемой мембраны из полиэфирсульфона (PES) низкомолекулярные компоненты системы и растворитель свободно проходят в нижний резервуар, тогда как целевой белок Spike или RBD задерживается и концентрируется в ретентате.

Технологическая последовательность операции начинается с санитизации картриджа путем промывки целевым фосфатно-солевым буфером при ускорении 3000 × g. После подготовки объединенные фракции элюата загружаются в верхнюю камеру концентратора и подвергаются первичному концентрированию в бакет-роторе при 3000–5000 × g при температуре 4 °C до уменьшения объема в 10–20 раз. Последующая замена буферной системы осуществляется методом последовательного разбавления ретентата свежим буфером PBS с последующим повторным центрифугированием. На финальном этапе очищенная активная фармацевтическая субстанция извлекается из верхней камеры, после чего проводится прецизионное измерение концентрации методом спектрофотометрии при длине волны 280 нм.

На данном этапе работы осуществлены выделение, очистка и последующая характеристика рекомбинантных белков Spike и RBD SARS-CoV-2, экспрессированных в клеточной системе *ExpiSf9*™-BEVS. Первичную очистку целевых белков проводили методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-матрице, основанной на селективном взаимодействии поли-гистидиновых фрагментов рекомбинантных молекул с иммобилизованными ионами никеля. С целью повышения степени очистки и удаления остаточных белковых примесей, а также возможных агрегированных форм, на следующем этапе использовали гель-фильтрационную хроматографию. Применение последовательной схемы очистки позволило получить препараты с высокой степенью однородности.

Анализ очищенных белков методом SDS-PAGE показал, что рекомбинантный Spike (S-ECD) представлен преимущественно основной полосой в диапазоне 140–160 кДа, что соответствует ожидаемым

характеристикам целевого продукта, при степени чистоты более 95 %. Рекомбинантный белок RBD определялся в виде единственной четко выраженной полосы с молекулярной массой 25–28 кДа, а степень его чистоты превышала 95 %. Таким образом, полученные результаты подтверждают эффективность выбранной стратегии очистки и свидетельствуют о возможности получения рекомбинантных белков SARS-CoV-2 с параметрами, достаточными для их дальнейшего использования в иммунологических, биохимических и прикладных исследованиях.

Анализ эндотоксинов

Содержание бактериальных эндотоксинов определяли методом с рекомбинантным фактором С по калибровочной кривой в диапазоне от 0,005 до 5,0 ЭЕ/мл при заявленной чувствительности метода $\lambda = 0{,}005$ ЭЕ/мл. Образцы разводили до концентраций, попадающих в рабочий диапазон кривой и не превышающих максимально допустимого разведения. Полученные результаты в пересчёте на единицу массы белка: – Spike-белок (S-ECD) – 0,2 ЭЕ/мкг белка (200 ЭЕ/мг), что составляет 20 % от нормы; – белок RBD – 0,15 ЭЕ/мкг белка (150 ЭЕ/мг), что составляет 15 % от нормы. Оба значения не превышают норму спецификации «не более 1,0 ЭЕ/мкг белка» (таблица 1). В пересчёте на дозу антигена 5,0 мкг (таблица 18) это соответствует 1,0 ЭЕ/доза для S-ECD и 0,75 ЭЕ/доза для RBD.

Анализ остаточной ДНК

Содержание остаточной двухцепочечной ДНК в очищенных субстанциях определяли флуоресцентным методом с селективным связыванием двухцепочечной ДНК. Ни в одном из исследованных образцов ДНК не обнаружена: интенсивность флуоресценции не превышала сигнал холостой пробы и была ниже нижней точки калибровочной кривой. Нижняя граница диапазона определения применённого набора составляет 0,25 нг/мл при низкодиапазонном и 10 нг/мл при высокодиапазонном протоколе калибровки.

Для придания результату нормативного смысла предел обнаружения пересчитан на прививочную дозу. В одну дозу вносится не более 10 мкл активной фармацевтической субстанции – расчёт по нижней границе нормируемой концентрации белка 0,5 мг/мл и дозировке 5,0 мкг антигена на дозу. При наиболее консервативном допущении, то есть при высокодиапазонном протоколе калибровки и десятикратном разведении образца перед анализом, предел обнаружения соответствует содержанию остаточной ДНК не более 1,0 нг на дозу, то есть не менее чем в десять раз ниже нормируемого предела 10 нг на дозу (таблица 1). При низкодиапазонном протоколе расчётная величина не превышает 0,0025 нг на дозу. Таким образом, заключение о соответствии нормативу не зависит от выбора протокола калибровки.

Применённый метод регистрирует суммарную двухцепочечную ДНК и не различает ДНК клетки-хозяина и ДНК бакуловирусного вектора. В отношении нормирования это консервативное допущение: измеряемая величина включает оба источника, поэтому результат ниже предела обнаружения одновременно характеризует и остаточную ДНК клеток ExpiSf9™, и остаточную

бакуловирусную ДНК. Информации о размере фрагментов метод не даёт, в связи с чем на этапе фармацевтической разработки он применён как ориентировочный.

Независимым обоснованием служит расчёт клиренса нуклеиновых кислот. Основной стадией их удаления является гель-фильтрация (ТП 4.3, таблица 16): высокомолекулярная ДНК выходит в исключённом объёме колонки и разделяется с целевым белком, элюирующимся в области, соответствующей его молекулярной массе. Дополнительное снижение достигается на стадии формуляции инъекционной формы: активную фармацевтическую субстанцию разводят фосфатно-солевым буфером до концентрации антигена 20 мкг/мл и затем объединяют с адъювантом в объёмном соотношении 50:50, что в сумме даёт 50–100-кратное разведение от субстанции до готовой лекарственной формы.

3.8 Финишные операции и упаковка активной фармацевтической субстанции (промежуточного продукта)

Полученная концентрированная белковая субстанция подвергается финальной стерилизующей вакуумной фильтрации через мембраны с размером пор 0,22 мкм, что является надежным методом механической элиминации вегетативных бактерий и грибов без температурной денатурации АФС.

Процесс розлива и укупорки осуществляется в асептических условиях (ламинарный шкаф класса А). Препарат дозируется по 1 мл в стерильные пробирки типа Eppendorf (объемом 1,5 мл), которые надежно герметизируются пластиковыми пробками. Маркировка готового продукта выполняется путем наклеивания бумажных этикеток (ГОСТ 7625–86), содержащих исчерпывающую информацию: название препарата, номер серии, объем, концентрацию белка, условия хранения и срок годности. Групповая упаковка и транспортная тара формируются в соответствии с ГОСТ 17768-90Е и ГОСТ 14192-96. Из каждой произведенной партии отбираются репрезентативные образцы для передачи в лабораторию контроля качества, при этом удвоенное количество образцов закладывается в контрольный архив для обеспечения возможности ретроспективного анализа.

3.9 Спецификация качества и контроль производственных параметров

Предвалидация технологического процесса подразумевает комплексное доказательство того, что отработанная процедура способна стабильно генерировать активную фармацевтическую субстанцию, полностью соответствующую заданным спецификациям качества. Готовый продукт – рекомбинантные мономерные белки Spike и RBD – представляет собой прозрачный бесцветный раствор в фосфатном буфере. Концентрация для Spike поддерживается в пределах 1,5–2,0 мг/л, для домена RBD – 2,0–2,4 мг/л.

Обязательными физико-химическими критериями приемлемости являются водородный показатель (pH), который должен находиться в строгих физиологических границах от 7,0 до 7,4 по Ф ЕАЭС 2.1.2.3, а также извлекаемый номинальный объем. Визуальный и инструментальный контроль

на наличие механических включений проводится в соответствии с директивами Ф ЕАЭС 2.1.9.17

Критическими показателями качества выступают молекулярная идентичность и антигенная специфичность субстанции. Идентификация проводится тандемным применением SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. На электрофореграмме в восстановительных условиях (с применением ДТТ) должна четко визуализироваться гомогенная полоса: для полноразмерного белка Spike ожидаемая молекулярная масса составляет 140–160 кДа, тогда как для укороченного домена RBD – 25–28 кДа. Отсутствие дополнительных полос (примесей) подтверждает высокую селективность хроматографической очистки. Специфичность подтверждается вестерн-блоттингом: после переноса на мембрану белок образует иммунные комплексы с первичными антителами (анти-Spike или анти-RBD), которые визуализируются ферментными или флуоресцентными метками.

Показатели биологической безопасности препарата включают стерильность, содержание бактериальных эндотоксинов и отсутствие пирогенного действия. Испытания на стерильность проводят методом прямого посева на жидкие тиогликолевую и соево-казеиновую питательные среды с последующей инкубацией в течение 14 суток. Содержание бактериальных эндотоксинов нормировано на единицу массы белка: не более 1,0 ЭЕ/мкг белка (таблица 1), что при дозировке антигена 5,0 мкг соответствует не более 5,0 ЭЕ на дозу, то есть не более 5 % от нормы, установленной для готовой инъекционной формы (не более 100 ЭЕ в дозе 0,5 мл, таблица 18). Контроль осуществляют методом с рекомбинантным фактором С (подраздел 2.2), применённым как альтернативный метод к ОФС 2.1.6.10 Фармакопеи ЕАЭС. Испытание на пирогенность в тесте на кроликах согласно ОФС 2.1.6.9 Фармакопеи ЕАЭС дало отрицательный результат: пирогенного действия препарата не выявлено. Стабильность продукта обеспечивается хранением в защищенном от света месте при температуре -20 °С; предварительный срок годности 1 год, установленный по результатам контроля опытных серий. Подбор хроматографической очистки и применение химически определённых бессывороточных сред позволили получить субстанции с содержанием бактериальных эндотоксинов 0,2 ЭЕ/мкг белка для S-ECD и 0,15 ЭЕ/мкг белка для RBD (подраздел 3.7). При дозировке антигена 5,0 мкг в дозе 0,5 мл (таблица 18) эндотоксиновая нагрузка, вносимая субстанцией, составляет 1,0 ЭЕ/доза для S-ECD и 0,75 ЭЕ/доза для RBD, то есть не более 1 % от нормы, установленной для готовой инъекционной формы (не более 100 ЭЕ в дозе 0,5 мл), и в 5,0 и 6,7 раза ниже нормы, установленной спецификацией на АФС (не более 1,0 ЭЕ/мкг белка).

Надежность производственного цикла обеспечивается внедренной системой контроля производства, которая включает матрицу важнейших контрольных точек (ККТ), отраженную в таблице 15 согласно утвержденному лабораторному регламенту. Межоперационный мониторинг исключает брак на ранних стадиях и минимизирует экономические потери.

Таблица 15 – Перечень важнейших контрольных точек (ККТ) производства рекомбинантных белков SARS-CoV-2 (Spike и RBD)

Шифр стадии	Наименование объекта контроля	Контролируемый параметр	Регламентированный норматив	Метод анализа
ВР 1.1	Трансформированные клетки *E. coli* DH10Bac	Интеграция гена в геном бакмиды	Наличие рекомбинантной бакмидной ДНК	Метод амплификации (ПЦР)
ВР 1.1	Изолированная бакмидная ДНК	Качество нуклеиновых кислот	Высокая чистота ($A_{260/280}$) и заданная концентрация ДНК	Спектрофотометрия (Ф ЕАЭС 2.1.2.24)
ВР 1.2	Клетки *ExpiSf9*™ в процессе титрования рабочего банка бакуловируса	Эффективность вирусной инвазии	Процент инфицированных клеток ≥ 80 %; титр ≥ 1×10^8 ивч/мл	Проточная цитофлуориметрия
ТП 1.2	Культура клеток *ExpiSf9*™ перед инфицированием	Физиологический статус популяции	Плотность 5–10×10^6 клеток/мл; жизнеспособность ≥ 90 %	Окрашивание трипановым синим 0,4 %
ТП 1.3	Индуцированная суспензия клеток *ExpiSf9*™	Полипептидный профиль (накопление белка)	Наличие целевых полос 140–160 кДа (Spike) или 25–28 кДа (RBD) в восстановительных условиях	Электрофорез в ПААГ (Ф ЕАЭС 2.1.2.30)
ТП 2.3	Очищенный белок после гель-фильтрации	Специфичность и молекулярная гомогенность	Чёткая визуализация целевого продукта антителами, отсутствие примесей	Вестерн-блоттинг
ТП 2.3	Очищенный белок после гель-фильтрации	Степень чистоты	Отношение содержания специфического белка к общему не менее 0,95	Электрофорез в ПААГ с денситометрией
ТП 2.4	Концентрат АФС после ультрафильтрации	Содержание действующего вещества	В соответствии со спецификацией (таблица 1)	Спектрофотометрия при 280 нм (Ф ЕАЭС 2.1.2.24)
ТП 3.1	АФС после стерилизующей фильтрации	Стерильность	Стерильно	Прямой посев (Ф ЕАЭС 2.1.6.1)
ТП 3.1	АФС после стерилизующей фильтрации	Бактериальные эндотоксины	В соответствии со спецификацией (таблица 1)	ЛАЛ-тест (Ф ЕАЭС 2.6.14)
ТП 3.1	АФС после стерилизующей фильтрации	Остаточная ДНК	Не более 10 нг на дозу	Флуоресцентное связывание двухцепочечной ДНК
ТП 3.2	Расфасованная АФС	Извлекаемый объём	Не менее 1,0 мл	Гравиметрический / волюметрический метод

Продолжение таблицы 15

Шифр стадии	Наименование объекта контроля	Контролируемый параметр	Регламентированный норматив	Метод анализа
ТП 4.2	Эмульсия NARUVAX-C19 после объединения фаз	Объёмное соотношение фаз	50:50	Волюметрический контроль
ТП 4.3	Гомогенизированная эмульсия	Фазовое разделение	Отсутствует	Визуальный контроль
ТП 5.1	Суспензия наночастиц после ионного гелеобразования	Размер частиц и ζ-потенциал	290 ± 18 нм; не менее +25 мВ	Динамическое и электрофоретическое светорассеяние

Отбор проб для каждого из указанных анализов проводится в объеме 100 мкл из каждой емкости/колбы, с обязательной регистрацией результатов в рабочих журналах лаборатории и выдачей аналитических паспортов. Обязательный статус каждого теста гарантирует выпуск исключительно валидной АФС.

3.10 Охрана окружающей среды и техника биологической безопасности

Производство рекомбинантных вакцинных субстанций спроектировано с учетом жестких экологических нормативов. Технология бакуловирусного синтеза не сопряжена с выделением летучих органических растворителей, токсичных газов или радиационно опасных компонентов. Воздушные выбросы из производственных помещений в обязательном порядке пропускаются через каскад фильтров тонкой очистки. Данная HEPA-фильтрация полностью исключает риск контаминации атмосферного воздуха биологическими аэрозолями, содержащими вирусные частицы или генетически модифицированные клеточные линии.

Система утилизации жидких отходов имеет многоконтурную архитектуру. Отработанные кислоты и щелочи (в частности, 0,1 М NaOH, применяемый для санитаризации мембран, а также буферы с высокой концентрацией солей и имидазола), собираются в маркированные емкости. Данные химические стоки транспортируются в систему специальной канализации, где подвергаются химической нейтрализации до физиологических значений pH. Только после достижения нейтральных параметров и разбавления, инактивированные стоки сбрасываются в общую коммунальную сеть.

С позиции биологической безопасности, выбор бакуловирусной векторной системы (BEVS) является максимально оправданным. Бакуловирусы обладают строгой видовой специфичностью, инфицируя исключительно клетки насекомых (отряда Чешуекрылых). Они не способны к репликации, интеграции собственного генома в ДНК хозяина или индукции цитопатогенных и генотоксических эффектов в клетках позвоночных, включая человека. Тем не менее, работа с вирусными стоками (P0, P1) и трансгенными культурами *E. coli*

DH10Bac осуществляется в помещениях, соответствующих уровню биологической безопасности BSL-2. Персонал обязан использовать средства индивидуальной защиты, а все манипуляции с культурами проводятся исключительно в боксах микробиологической безопасности II класса с ламинарным потоком. Неукоснительное соблюдение стандартов GMP и требований регламента минимизирует любые производственные риски для операторов и обеспечивает стерильность и безопасность конечной вакцины NARUVAX-C19.

3.11 Предвалидация технологического процесса производства рекомбинантного белка SARS-CoV-2 RBD с полигистидиновой меткой, экспрессированного в системе *ExpiSf9*™

В соответствии с принципами надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) и международным руководством ICH Q8 (Pharmaceutical Development), качество биофармацевтических препаратов, включая вакцины, не может быть обеспечено исключительно финальным контролем готового продукта. Оно должно быть заложено и научно обосновано еще на этапе фармацевтической разработки согласно концепции *QbD*. В связи с этим, заключительным этапом данной разработки является проведение предвалидации отработанного технологического процесса получения активной фармацевтической субстанции – рекомбинантного мономерного белка RBD (вариант Omicron BA.5) вируса SARS-CoV-2 с полигистидиновой меткой, экспрессированного с использованием суспензионной клеточной линии *ExpiSf9*™ и системы ExpiSf (Thermo Fisher Scientific).

Присутствие С-концевой полигистидиновой метки в составе рекомбинантной активной фармацевтической субстанции обеспечивает высокую технологичность, масштабируемость и экономическую рентабельность процессов металл-хелатной аффинной очистки. Для минимизации регуляторных рисков и подтверждения отсутствия негативного влияния пептидной метки на конформационную стабильность и антигенную специфичность домена RBD были проведены предварительные исследования *in silico*. При планировании перехода к масштабным клиническим исследованиям III фазы предусмотрена возможность внедрения технологической стадии ферментативного отщепления метки с использованием сайт-специфических эндопротеаз с последующей негативной IMAC-хроматографией для удаления отщепленного пептида и фермента.

Качество, достигнутое и задокументированное в процессе разработки и описанное в лабораторном регламенте, подтверждается при государственной регистрации и обеспечивается соблюдением правил GMP на последующих стадиях промышленного производства. Предварительная валидация подтверждает воспроизводимость того, что конечный продукт будет стабильно производиться в одинаковых условиях, в соответствии с установленными стандартами и спецификациями.

До начала процедуры предвалидации технологического процесса был разработан лабораторный регламент (Утвержден НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», май 2024 г.) на

получение и оценку рекомбинантного белка RBD SARS-CoV-2 на основе бакуловирусной технологии для разработки экспериментальной вакцины NARUVAX-C19. Данный регламент содержит подробное описание всех этапов технологического процесса, включая подготовку сырья и реактивов, условия культивирования клеток *ExpiSf9*™, генерацию и титрование рекомбинантного бакуловируса, условия экспрессии целевого белка, методики очистки, ультрафильтрации и финальной стерилизации белковой субстанции.

Для системной визуализации описанных технологических операций и их интеграции в единую цепь была сформирована унифицированная блок-схема процесса. В строгом соответствии с требованиями надлежащих фармацевтических практик и принципами «встроенного качества», весь производственный цикл концептуально сегментирован на три ключевые макростадии. Подобная архитектура процесса обеспечивает прозрачность, технологическую прослеживаемость и эффективный внутрипроизводственный контроль при переходе от наращивания биомассы и биосинтеза к процедурам выделения, глубокой очистки и, в конечном итоге, к получению стерильной активной фармацевтической субстанции (АФС). В таблице 16 представлена сводная технологическая схема, по стадиям производственного цикла с указанием аппаратурного оформления и критических параметров процесса (CPP).

Таблица 16 – Технологическая схема производства рекомбинантных белков Spike и RBD

Стадия процесса (Шифр)	Наименование операции	Основное оборудование	Критические параметры процесса (CPP) и условия
ВР 1 – Подготовительные работы			
ВР 1.1	Санитарная подготовка помещений и оборудования	Ламинарный шкаф, ёмкости для дезрастворов	• Раствор водорода пероксида 1–6 % с добавлением CMC 0,5 % • Этиловый спирт 70 % об. для обработки поверхностей и рук • Приготовление непосредственно перед началом смены
ВР 1.2	Подготовка воды очищенной	Установка водоподготовки	• Ф ЕАЭС 2.2.1.13 • pH 5,0–7,0; сухой остаток не более 0,001 % • Хранение при 17–25 °C не более 24 часов

Продолжение таблицы 16

Стадия процесса (Шифр)	Наименование операции	Основное оборудование	Критические параметры процесса (CPP) и условия
BP 1.3	Приготовление питательных сред и буферных растворов	Весы аналитические, pH-метр, магнитная мешалка, автоклав	• Среда LB: 20 г сухого порошка на 1000 мл, автоклавирование 121 °C, 20 мин • Буферные растворы на воде очищенной • Контроль pH потенциометрически
BP 1.4	Входной контроль сырья и материалов	Отдел контроля качества	• Визуальный осмотр, проверка целостности упаковки и сопроводительной документации • Отбор средней пробы от каждой серии, деление на две части • Депонирование архивной пробы до полного израсходования сырья
BP 2 – Получение и контроль посевного материала			
BP 2.1	Получение рекомбинантной бакмидной ДНК	ПЦР-амплификатор, спектрофотометр	• Экспрессионная кассета: S-ECD или RBD • Вектор pFastBac™ Dual • Верификация вставки методом ПЦР с праймерами pUC/M13 и секвенированием по Сэнгеру
BP 2.2	Трансформация компетентных клеток *E. coli* DH10Bac и селекция	Инкубатор для бактерий, ламинарный шкаф	• Высев на LB-агар с канамицином • Сине-белая селекция с применением ИПТГ • Инкубация при 37 °C
BP 2.3	Трансфекция клеток ExpiSf9™, получение и амплификация вирусного стока	Шейкер-инкубатор, ламинарный шкаф	• Реагент ExpiFectamine™ Sf • Последовательное инфицирование до получения стоков P1/P2 • Ограничение числа пассажей вирусного стока

Продолжение таблицы 16

Стадия процесса (Шифр)	Наименование операции	Основное оборудование	Критические параметры процесса (CPP) и условия
ВР 2.4	Титрование рабочего банка бакуловируса	Проточный цитометр Attune NxT	• Детекция белка gp64 антителами • Титр рабочего банка: ≥ 1×10^{8} ивч/мл • Доля инфицированных клеток: ≥ 80 %
ВР 2.5	Подготовка посевной культуры ExpiSf9™ (Seed Train)	Шейкер-инкубатор, колбы Эрленмейера (30–250 мл, заполнение 30–35 %)	• Среда: ExpiSf™ CD Medium (2–8 °C, защита от света) • Исходная плотность: 0,5–$1,0\times10^{6}$ кл/мл • Температура: 27 °C • Агитация: 125 об/мин (орбита 25 мм) • Рабочий диапазон пассажей клеток: 5–20
ТП 3 – Биосинтез целевого белка (Upstream)			
ТП 3.1	Подготовка к инфицированию (Enhancement)	Шейкер-инкубатор, колбы/биореактор	• Плотность клеток: $5,0\times10^{6}$ кл/мл (разведение свежей средой) • Жизнеспособность: ≥ 90 % • Внесение ExpiSf™ Enhancer: за 18–24 часа до инфицирования
ТП 3.2	Инфицирование и экспрессия (Infection & Production)	Шейкер-инкубатор / Суспензионный биореактор	• CPP 1: Плотность клеток при заражении (CCI): 6,5–$7,0\times10^{6}$ кл/мл • CPP 2: Множественность инфицирования (MOI): 5 • Титр рабочего вируса: ≥ 1×10^{8} ивч/мл • Температура: 27 °C (изотермический режим) • CPP 3: Время сбора (TOH): 72 часа

Продолжение таблицы 16

Стадия процесса (Шифр)	Наименование операции	Основное оборудование	Критические параметры процесса (CPP) и условия
ТП 3.3	Сбор культуральной жидкости (Harvest)	Центрифуга	• Разделение культуральной жидкости центрифугированием • Сохраняют обе фракции: осветлённую культуральную жидкость и клеточный осадок • Температура: 4 °C
ТП 4 – Выделение и очистка (Downstream)			
ТП 4.1	Лизис клеточного осадка и объединение фракций (Lysis & Pooling)	Ёмкости для лизиса	• Лизирующий буфер: 20 мМ Na-фосфатный буфер, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазол, 1 % Triton X-100, 1 мМ PMSF + ингибиторы протеаз • CPP 4: Водородный показатель буфера: pH 7,4–8,0
ТП 4.2	Аффинная хроматография (Capture)	Хроматографическая система ÄKTA, колонка Ni-NTA	• CPP 5: Линейная скорость потока: 0,5–1,0 мл/мин • Эквилибрация: 5 колоночных объёмов стартовым буфером • Отмывка: две ступени по 15 колоночных объёмов, 15 и 30 мМ имидазола (3 и 6 % элюирующего буфера) • Дезинфекция (CIP): 20 % этанол
ТП 4.3	Гель-фильтрационная хроматография (Polishing)	Хроматографическая система ÄKTA, колонка SEC	• Удаление агрегированных форм и остаточных белковых примесей (чистота продукта на выходе более 95 %)

Продолжение таблицы 16

Стадия процесса (Шифр)	Наименование операции	Основное оборудование	Критические параметры процесса (CPP) и условия
ТП 4.4	Ультрафильтрация и диафильтрация (UF/DF)	Центрифуга (бакет-ротор), фильтры-концентраторы Pierce PES	• Ускорение: 3000–5000 × g • Температура: 4 °C • Степень концентрирования: в 10–20 раз • Замена буфера: на целевой PBS • Предел отсечения мембраны: 100 кДа для S-ECD, 10 кДа для RBD
ТП 5 – Получение стерильной субстанции			
ТП 5.1	Стерилизующая фильтрация	Система вакуумной фильтрации	• Мембрана: 0,22 мкм (механическая элиминация бактерий и грибов без денатурации АФС)
УМО 6 – Фасовка, маркировка и хранение АФС			
УМО 6.1	Асептический розлив и укупорка	Ламинарный шкаф (Класс А)	• Фасовка: по 1 мл в стерильные пробирки (1,5 мл) • Условия: строгая асептика
УМО 6.2	Маркировка и групповая упаковка	Стол для упаковки и маркировки	• Этикетка по ГОСТ 7625-86: наименование, номер серии, дата изготовления, объём, концентрация белка, условия хранения, срок годности, изготовитель • Групповая и транспортная упаковка по ГОСТ 17768-90Е и ГОСТ 14192-96
УМО 6.3	Хранение и отбор архивных образцов	Морозильные камеры	• Температура хранения: −20 °C, защита от света • Отбор контрольных образцов; удвоенное количество – в архив

Технологический процесс унифицирован для обоих целевых антигенов и реализуется двумя независимыми производственными циклами. Различия между потоками ограничены двумя позициями, выделенными в таблице: нуклеотидной последовательностью экспрессионной кассеты (ВР 2.1) и пределом отсечения ультрафильтрационной мембраны (ТП 4.4).

Логическая последовательность данных производственных стадий графически отражена на рисунке 6.

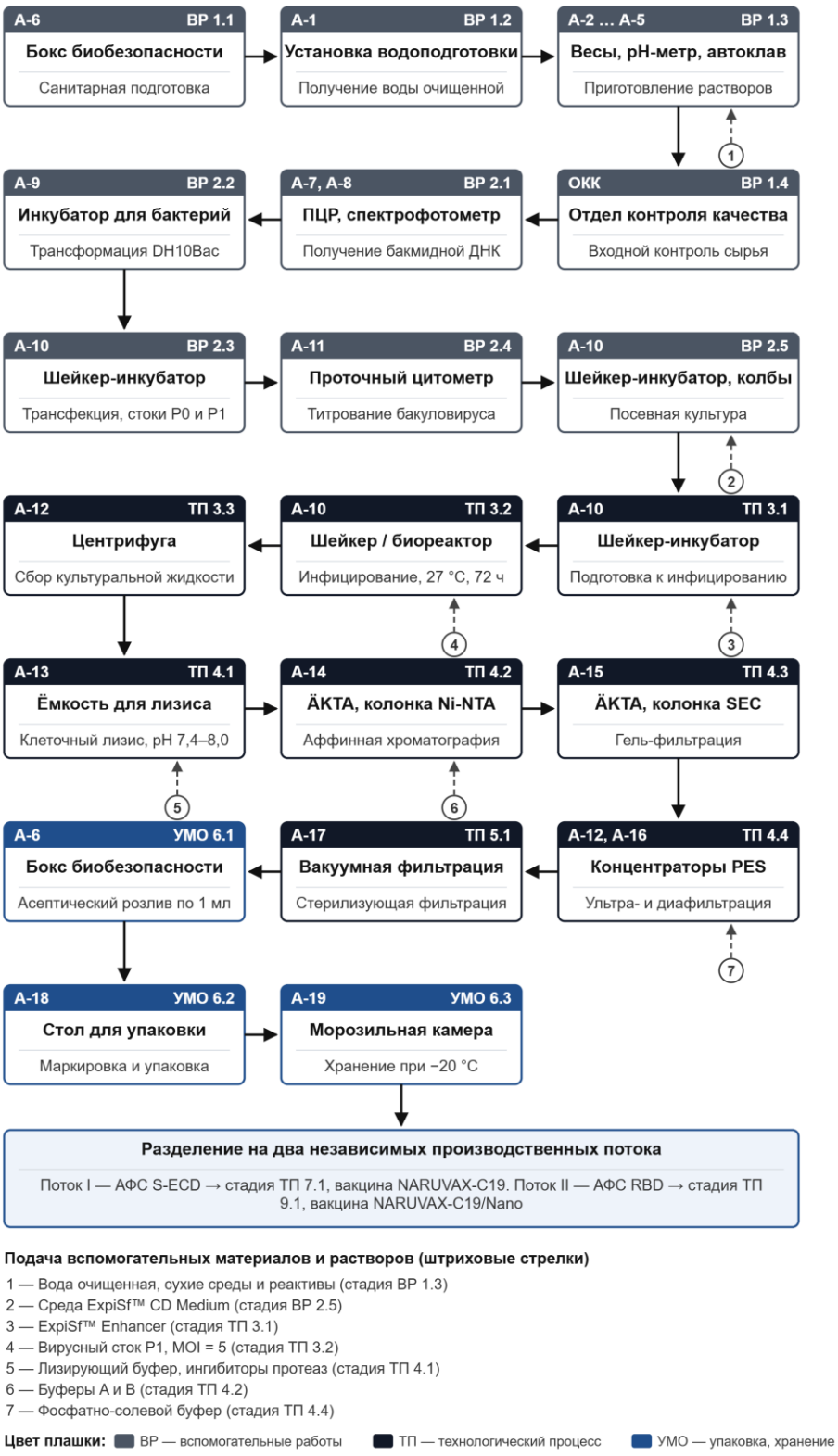


Рисунок 6 – Аппаратурная схема I этапа технологии приготовления активной фармацевтической субстанции на основе рекомбинантных белков S-ECD и RBD SARS-CoV-2

Для подтверждения воспроизводимости технологического процесса получения субстанции RBD SARS-CoV-2 был проведен цикл из трех независимых опытных партий продукта. Каждая из этих серий была получена в идентичных условиях, указанных в лабораторном регламенте и СОПах. По всем критическим показателям качества все образцы соответствовали требованиям спецификации на активную фармацевтическую субстанцию (таблица 1), на основании чего составлен отчёт о предвалидации технологии.

В результате проведенной предвалидации процесс производства рекомбинантного белка RBD SARS-CoV-2 был признан воспроизводимым и стабильным, так как критические параметры всех трех опытных партий показали высокую степень сходимости и соответствие специфицированным критериям качества. Параметры качества полученного продукта контролировались в соответствии с фармакопейными статьями предприятия и требованиями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан.

Перенос процесса в биореакторы рассмотрен расчётным путём, исходя из сохранения критических параметров, и экспериментально в настоящей работе не проверялся. Валидация процесса в объёме требований GMP относится к этапу промышленного производства и выполняется после переноса технологии на производственную площадку.

В рамках концепции *QbD* были определены критические параметры процесса (CPP – Critical Process Parameters) и критические показатели качества (CQA – Critical Quality Attributes). Для стадии Upstream критическим параметром признана множественность инфицирования (MOI = 5) и жизнеспособность клеточной культуры (не менее 85 % на момент индукции). Для стадии Downstream – параметры линейной скорости потока при аффинной хроматографии и контроль pH буферных растворов. Все процедуры предвалидации трех опытных партий проводились с учетом требований Правил надлежащей производственной практики (GMP) ЕАЭС, что подтверждает высокую технологичность и индустриальную пригодность разработанных вакцин-кандидатов.

Основополагающим итогом разработки upstream- и downstream-процессов стало составление и утверждение нормативно-технологической документации на активные фармацевтические субстанции. В частности, разработаны «Лабораторный регламент на получение и оценку рекомбинантного белка Spike на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19» и аналогичный «Лабораторный регламент на получение и оценку рекомбинантного белка RBD на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19».

Данные документы строго регламентируют все этапы биотехнологического цикла в суспензионной культуре клеток *ExpiSf9*™, включая культивирование, инфицирование, хроматографическую очистку и контроль качества, что обеспечивает стабильное и воспроизводимое получение высокоочищенных антигенов для производства обеих лекарственных форм вакцин.

4 Разработка состава и технологии получения готовых лекарственных форм экспериментальных вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano (II этап технологии приготовления)

Для наглядной демонстрации разделения технологических процессов приготовления инъекционной и интраназальной форм на базе полученной общей активной фармацевтической субстанции (АФС), разработана объединенная блок-схема II этапа технологии приготовления (рисунок 7)

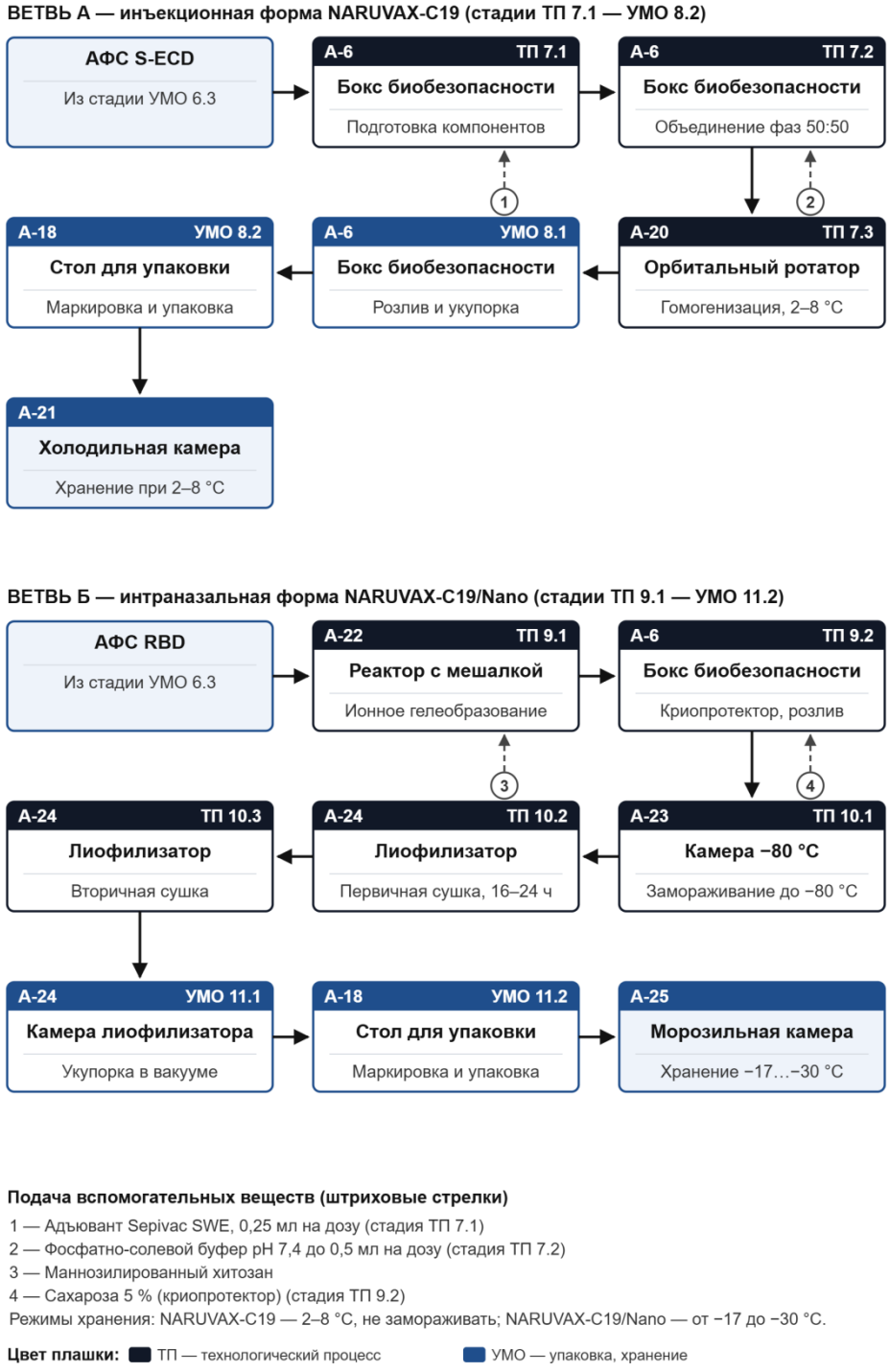


Рисунок 7 – Аппаратурная схема II этапа технологии приготовления готовых лекарственных форм экспериментальных вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano

4.1 Разработка состава и технологии получения инъекционной лекарственной формы субъединичной вакцины NARUVAX-C19

В рамках фармацевтической разработки процесс создания готовой лекарственной формы вакцины NARUVAX-C19 включал этап подбора составов и фармако-технологических параметров. В качестве активной фармацевтической субстанции (АФС) использовался высокоочищенный (чистота более 95 % по SDS-PAGE, содержание бактериальных эндотоксинов не более 1,0 ЭЕ/мкг белка по рФС-методу) рекомбинантный белок S-ECD (или RBD) вируса SARS-CoV-2.

4.1.1 Обоснование состава

Выбор класса адъюванта. Рекомбинантные субъединичные антигены обладают низкой собственной иммуногенностью и требуют включения адъюванта в состав лекарственной формы. Выбор сделан в пользу наноэмульсии типа «масло в воде» на основе сквалена. Основанием послужили три группы соображений. Во-первых, скваленовые эмульсии формируют сбалансированный Th1/Th2-профиль ответа, тогда как соли алюминия смещают ответ в сторону Th2 и слабо индуцируют клеточное звено, что критично для профилактики инфекции, вызываемой респираторным вирусом. Во-вторых, скваленовые эмульсии обеспечивают эффект дозосбережения антигена, что для рекомбинантного белка с выходом очищенной субстанции порядка 1,5–2,4 мг на литр культуральной жидкости имеет прямое технологическое и экономическое значение. В-третьих, применимость данного класса адъюванта именно к антигенам SARS-CoV-2 подтверждена опубликованными исследованиями [90].

Выбор конкретного адъюванта. Из доступных наноэмульсионных адъювантов выбран Sepivac SWE™ (Seppic, Франция) – сквален-содержащая эмульсия типа «масло в воде», поставляемая в готовом к применению стерильном виде и производимая в условиях надлежащей производственной практики. Такой выбор исключает из технологического процесса стадию высокоэнергетического эмульгирования и связанный с ней риск сдвиговой денатурации белкового антигена, что принципиально для сохранения нативной конформации рецептор-связывающего домена.

Выбор соотношения фаз. Объёмное соотношение раствора антигена и адъюванта 50:50 не является произвольным технологическим параметром и не подлежит оптимизации: оно задано конструкцией самого адъюванта. Sepivac SWE™ поставляется в форме двукратного концентрата, состав которого рассчитан на разведение равным объёмом водной фазы. Адъювант содержит сквален в концентрации 3,9 % (масса/объём), сорбитана триолеат 0,47 % и полисорбат 80 0,47 % в 10 мМ цитратном буфере с водородным показателем 6,5.

При смешивании равных объёмов и прививочной дозе 0,5 мл содержание компонентов адъювантной системы в одной дозе составляет: сквалена – 9,75 мг, сорбитана триолеата – 1,175 мг, полисорбата 80 – 1,175 мг при конечной концентрации цитратного буфера 5 мМ. Таким образом, соотношение фаз 50:50

обеспечивает воспроизведение дозы адъюванта, для которой накоплен значительный объём данных по безопасности и реактогенности.

Отклонение от указанного соотношения изменяет не только физические характеристики эмульсионной системы, но и дозу адъюванта, вводимую при однократной инъекции. При соотношении 70:30 содержание сквалена в дозе составило бы 5,85 мг, то есть 60 % от клинически обоснованного уровня; при соотношении 30:70 – 13,65 мг, то есть 140 %. В обоих случаях состав выходит за пределы диапазона, в котором адъювантная система изучена. По этой причине объёмное соотношение фаз рассматривалось как фиксированный параметр состава, определяемый конструкцией адъюванта, а не как переменная оптимизации; скрининг альтернативных соотношений не проводился.

4.1.2 Технологическая схема получения

Технологический процесс получения готовой инъекционной формы осуществлялся в строго асептических условиях. Стерильный раствор антигена объединяли с коммерческим стерильным наноэмульсионным адъювантом Sepivac SWE в строгом объемном соотношении 50:50. Непосредственно перед объединением фаз активную фармацевтическую субстанцию разводили стерильным фосфатно-солевым буфером pH 7,4 до концентрации антигена 20 мкг/мл, что при соотношении фаз 50:50 обеспечивает содержание 5,0 мкг белка в дозе объёмом 0,5 мл. Гомогенизацию гетерогенной системы проводили исключительно путем деликатной инверсии на низкоскоростном орбитальном ротаторе при температуре 2–8 °C. Применение магнитных экстракторов и высокоскоростного перемешивания было категорически исключено для предотвращения сдвиговой дестабилизации скваленовых нанокапель и инициации процессов коалесценции. Финальная стерилизующая фильтрация готовой эмульсионной смеси не применялась во избежание изменения исходного гранулометрического состава адъюванта и кольматации фильтрующих элементов. Технологическая схема получения инъекционной лекарственной формы приведена в таблице 17. Исходным сырьём для технологической линии служит активная фармацевтическая субстанция S-ECD, полученная по I этапу технологии.

Таблица 17 – Технологическая схема получения инъекционной лекарственной формы NARUVAX-C19

Стадия процесса (Шифр)	Наименование операции	Основное оборудование	Критические параметры процесса (CPP) и условия
ТП 7 – Получение эмульсионной композиции			
ТП 7.1	Подготовка компонентов	Ламинарный шкаф (Класс А)	• Стерильный раствор АФС S-ECD (продукт стадии УМО 6) • Коммерческий адъювант Sepivac SWE• Разведение АФС S-ECD фосфатно-солевым буфером pH 7,4 до концентрации антигена 20 мкг/мл в водной фазе
ТП 7.2	Асептическое объединение фаз	Ламинарный шкаф (Класс А)	• Строгое объёмное соотношение фаз – 50:50 • На дозу 0,5 мл: 0,25 мл раствора антигена и 0,25 мл адъюванта
ТП 7.3	Гомогенизация эмульсии	Низкоскоростной орбитальный ротатор	• Температура: 2–8 °C; метод: деликатная инверсия • Отказ от финальной фильтрации для сохранения гранулометрического состава нанокапель
УМО 8 – Фасовка, маркировка и упаковка			
УМО 8.1	Асептический розлив и укупорка	Ламинарный шкаф (Класс А)	• Опытные серии: асептическая фасовка в пробирки Eppendorf (1,5 мл), объём заполнения 1 мл • По проекту НД: флаконы из бесцветного стекла I класса 5 мл, по 1 дозе 0,5 мл, с пластиковой крышкой типа Flip-off
УМО 8.2	Маркировка и упаковка	Стол для упаковки и маркировки	• Этикетка по ГОСТ 7625-86 с указанием состава на дозу, номера серии, даты изготовления, срока годности, условий хранения • Предупредительная надпись «Не замораживать» • Групповая и транспортная упаковка по ГОСТ 17768-90Е и ГОСТ 14192-96 • Закладка на хранение при 2–8 °C

4.1.3 Финишные операции и упаковка

Для инъекционной формы NARUVAX-C19 финишные операции совмещены с процессом получения: вакцина представляет собой готовую к применению эмульсию, не требующую отдельной стадии финальной стерилизующей фильтрации. Непосредственно после гомогенизации препарат

фасуют по 1 мл в первичную упаковку и укупоривают; готовые серии закладывают на хранение при температуре 2–8 °С.

На этапе фармацевтической разработки в качестве первичной упаковки опытных серий использованы стерильные апирогенные полипропиленовые микропробирки вместимостью 1,5 мл с винтовой укупоркой. Такой выбор обусловлен задачами доклинического этапа: малым объёмом серии, необходимостью индивидуального дозирования при введении лабораторным животным и исключением потерь препарата на стенках тары. Данная упаковка не рассматривается как упаковка готового лекарственного средства для медицинского применения. При переходе к клиническим исследованиям I фазы предусмотрен перевод инъекционной формы в первичную упаковку, отвечающую требованиям к парентеральным препаратам: флаконы из бесцветного стекла класса I номинальной вместимостью 5 мл по 1 дозе (0,5 мл), укупоренные резиновой пробкой и обкатанные металлическим колпачком с пластиковой крышкой типа Flip-off, с последующим подтверждением совместимости системы «препарат – упаковка» по показателям экстрагируемых и выщелачиваемых веществ.

4.1.4 Показатели качества готовой формы

Разработанная лекарственная форма соответствует требованиям, установленным проектом нормативного документа, что подтверждает её пригодность для проведения доклинических исследований. Спецификация показателей качества готовой инъекционной формы приведена в таблице 18.

Содержание действующего вещества в опытных образцах готовой инъекционной формы составляет 5,0 ± 0,5 мкг белка в дозе объёмом 0,5 мл. Величина установлена расчётным путём по результатам количественного определения белка в активной фармацевтической субстанции и фактическим объёмам компонентов при формуляции: доза содержит 0,25 мл раствора антигена в фосфатно-солевом буфере и 0,25 мл наноэмульсионного адъюванта. Полученные значения соответствуют норме, установленной проектом нормативного документа по качеству.

Валидация методики количественного определения. Методика количественного определения действующего вещества спектрофотометрическим методом при 280 нм валидирована по показателям, предусмотренным для методик количественного определения: специфичность, линейность, диапазон применения, правильность, прецизионность в условиях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности, предел количественного определения и робастность. Приборная составляющая погрешности определяется паспортными характеристиками спектрофотометра NanoDrop One: точность измерения оптической плотности 3 % при значении 0,97 ед. опт. пл. на длине волны 302 нм, прецизионность 0,002 ед. опт. пл. при оптической длине пути 1,0 мм либо 1 % относительного стандартного отклонения – в зависимости от того, какая величина больше, при стандартном отклонении десяти последовательных измерений. Паспортный диапазон определяемых концентраций белка в режиме измерения на пьедестале составляет от 0,06 до 820 мг/мл в пересчёте на бычий сывороточный альбумин,

что полностью перекрывает диапазон нормируемого содержания действующего вещества в активной фармацевтической субстанции.

Для интраназальной формы выполнено непрямое количественное определение содержания белка при расчёте эффективности инкапсуляции: по результатам анализа доля антигена, связанного с хитозано-маннозными наночастицами, составила 66,8 % от внесённого количества (таблица 19). Данная величина использована при нормировании расхода активной фармацевтической субстанции на дозу препарата.

Прямое количественное определение действующего вещества непосредственно в составе готовых лекарственных форм с применением специфической методики в рамках настоящей работы не выполнялось. Разработка и валидация такой методики предусмотрены на этапе подготовки регистрационного досье.

Таблица 18 – Спецификация показателей качества готовой инъекционной формы NARUVAX-C19

№	Наименование показателя	Нормативные требования	Метод испытания
1	Описание	Гомогенная суспензия молочного цвета для внутримышечного введения	Визуальный контроль; ГФ РК I, т. 1, «Вакцины для применения у людей»
2	Идентификация	Положительная реакция с анти-Spike антителами	Иммуноблоттинг (вестерн-блот) в соответствии с АНД
3	Содержание антигена (дозировка)	Spike-белок – 5,0 ± 0,5 мкг в дозе 0,5 мл	Количественное определение общего белка; Ф ЕАЭС 2.1.2.32
4	Содержание адъюванта	Наноэмульсионный масляный адъювант SWE – 0,25 мл в дозе 0,5 мл	Контроль объёмного соотношения фаз на стадии ТП 7.2
5	Водородный показатель (pH)	От 6,4 до 7,6	Потенциометрический; ГФ РК I, т. 1, 2.2.3
6	Извлекаемый объём	Не менее 0,5 мл	ГФ РК I, т. 1, 2.9.17
7	Стабильность эмульсии	Отсутствие фазового разделения; изменения размера капель, pH и вязкости в пределах, установленных НД	Визуальный осмотр; динамическое светорассеяние
8	Стерильность	Должен быть стерильным	ГФ РК I, т. 2, 2.6.1 (прямой посев)
9	Бактериальные эндотоксины	Не более 100 ЭЕ в дозе 0,5 мл	Метод с рекомбинантным фактором C
10	Аномальная токсичность	Должен быть нетоксичным	ГФ РК I, т. 2, 2.6.9
11	Иммуногенность	Уровень ингибиции нейтрализующих антител не менее 30 %	SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test (sVNT)

Продолжение таблицы 18

№	Наименование показателя	Нормативные требования	Метод испытания
12	Упаковка	По 1 дозе во флаконах из бесцветного стекла класса I номинальной вместимостью 5 мл, укупоренных резиновой пробкой и обкатанных металлическим колпачком с крышкой типа Flip-off	В соответствии с НД
13	Условия хранения и транспортирования	В защищённом от света месте при температуре от +2 до +8 °С; не замораживать	В соответствии с НД; ГОСТ 17768-90
14	Срок хранения	12 мес	В соответствии с НД

4.1.5 Стабильность инъекционной формы NARUVAX-C19

Обоснование срока годности инъекционной формы NARUVAX-C19 на настоящем этапе фармацевтической разработки базируется на трёх группах данных.

Во-первых, на характеристиках стабильности наноэмульсионной адъювантной основы, установленных производителем: при температуре +4 °С эмульсия сохраняет размер частиц, ζ-потенциал, значение pH и вязкость в пределах установленных норм не менее 24 месяцев, при +25 °С – не менее 6 месяцев, при +37 °С – не менее 3 месяцев. Поскольку лекарственная форма представляет собой эмульсию, физическая стабильность которой определяется преимущественно свойствами масляной фазы и системы поверхностно-активных веществ, эти данные задают верхнюю границу ожидаемой стабильности композиции. На этом основании в проекте нормативного документа установлен предварительный срок годности 12 месяцев при температуре от 2 до 8 °С без замораживания.

Во-вторых, на результатах контроля опытных серий препарата по спецификации (таблица 18) на момент выпуска: все образцы соответствовали установленным нормам по описанию, стабильности эмульсии, водородному показателю, стерильности и содержанию бактериальных эндотоксинов.

В-третьих, на том, что разработанный состав воспроизводит штатный режим применения адъюванта: объёмное соотношение фаз 50:50 задано конструкцией Sepivac SWE™ как двукратного концентрата, поэтому дисперсная фаза и система поверхностно-активных веществ готовой композиции идентичны тем, для которых производителем установлены приведённые выше характеристики стабильности. Отклонение от этого соотношения выводит дозу адъюванта за пределы изученного диапазона, в связи с чем альтернативные соотношения фаз в составе не рассматривались.

Необходимо отдельно подчеркнуть недопустимость замораживания препарата. Эмульсия типа «масло-в-воде» при переходе водной фазы в кристаллическое состояние претерпевает необратимую коалесценцию капель дисперсной фазы с последующим расслоением композиции и утратой

адъювантной активности. По этой причине в проекте нормативного документа условия хранения и транспортирования содержат предупредительное указание «не замораживать».

Установленные показатели физико-химической и биологической стабильности лиофилизированной и инъекционной форм формируют доказательную базу для разработки нормативной документации; подтверждение сроков годности в объёме ICH Q1A(R2) и ICH Q5C, разработка специфической методики количественного определения в готовых формах и формальное исследование фармацевтической совместимости отнесены к этапу подготовки регистрационного досье до начала клинических исследований I фазы.

Экспериментальное подтверждение срока годности инъекционной формы в полном объёме требований ICH Q1A(R2) и ICH Q5C отнесено к этапу подготовки регистрационного досье и должно быть выполнено до начала клинических исследований I фазы. Протокол должен предусматривать контроль среднего размера капель дисперсной фазы методом динамического светорассеяния как наиболее чувствительного индикатора начала деструкции эмульсии, а также определение содержания и антигенности белка S-ECD в каждой точке контроля.

4.2 Получение нановакцины NARUVAX-C19/Nano, на основе рекомбинантных белков и хитозановых наночастиц

4.2.1 Физико-химические характеристики наночастиц

В ходе разработки были получены наночастицы на основе хитозана, модифицированные маннозой, предназначенные для инкапсуляции рекомбинантного RBD-белка SARS-CoV-2. Средний гидродинамический размер «пустых» наночастиц составляет около 180 ± 12 нм, тогда как загрузка в них RBD-белка приводит к увеличению среднего диаметра до 290 ± 18 нм. Полидисперсность (PDI) систем имеет значения порядка 0,2–0,3. Дзета-потенциал (ζ) частиц обладает высоким положительным значением (~ +30 мВ), обеспечивая коллоидную стабильность и мукоадгезию. Частицы имеют правильную сферическую форму без склонности к агрегации (рисунок 8). Эффективность инкапсуляции RBD-белка в маннозилированные хитозановые наночастицы, определённая непрямым методом по остаточному содержанию белка в супернатанте (микро-BCA), составила 66,8 %. На рисунке 8 представлено типичное изображение наночастиц: как без нагрузки антигена, так и с инкапсулированным RBD-белком, частицы характеризуются округлой формой и гладкой поверхностью. В таблице 19 представлены физико-химические характеристики маннозилированных хитозановых наночастиц.

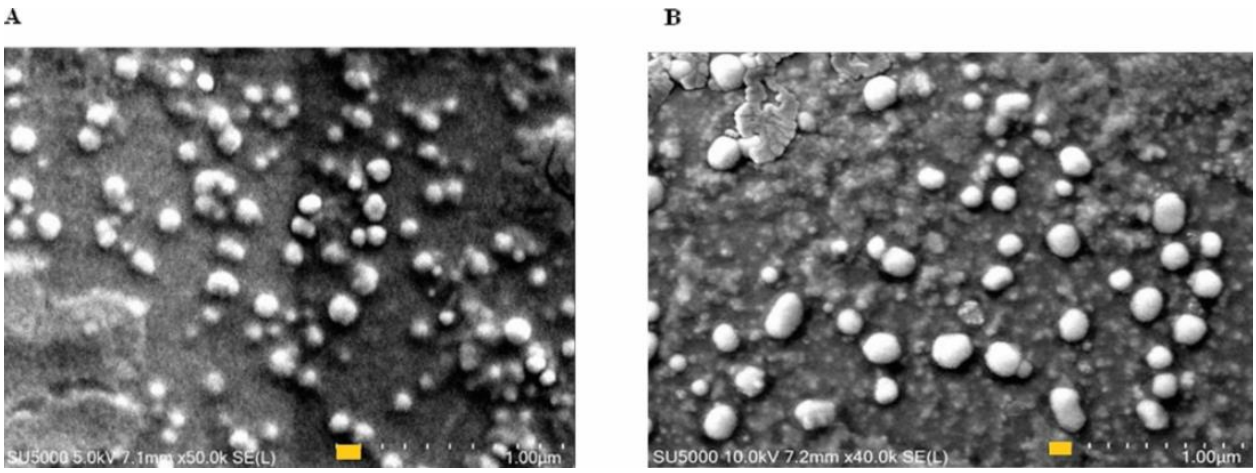


Рисунок 8 – Сканирующая электронная микроскопия маннозилированных хитозановых наночастиц. (A) без антигена; (B) с инкапсулированным RBD-белком. Масштаб: 100 нм

Таблица 19 – Физико-химические характеристики маннозилированных хитозановых наночастиц

№	Параметр	Пустые НЧ (без антигена)	НЧ с инкапсулированным RBD (нановакцина)	Метод определения
1	Средний гидродинамический диаметр, нм	180 ± 12	290 ± 18	Динамическое светорассеяние (DLS)
2	ζ-потенциал, мВ	+35	+30	Электрофоретическое светорассеяние
3	Эффективность инкапсуляции RBD, %	Не определяется	66,8	Непрямой метод по остаточному белку в супернатанте; количественное определение белка
4	Морфология частиц	Округлая форма, гладкая поверхность, без признаков агрегации	Округлая форма, гладкая поверхность, без признаков агрегации	Сканирующая электронная микроскопия (рисунок 8)

4.2.2 Технологическая схема получения нановакцины

Технология получения интраназальной формы основана на методе контролируемого ионного гелеобразования с последующей стабилизацией лиофилизацией. Полный цикл (от формирования частиц до сушки) представлен в таблице 20. Исходным сырьём для технологической линии служит активная фармацевтическая субстанция RBD, полученная по I этапу технологии.

Таблица 20 – Технологическая схема получения нановакцины NARUVAX-C19/Nano

Стадия процесса (Шифр)	Наименование операции	Основное оборудование	Критические параметры процесса (CPP) и условия
ТП 9 – Получение суспензии наночастиц			
ТП 9.1	Ионное гелеобразование и инкапсуляция	Лабораторный реактор / Магнитная мешалка	• Введение раствора ТПФ + RBD в хитозан (pH 4,5–5,0) • Электростатическое связывание
ТП 9.2	Подготовка к сублимации и розлив	Ламинарный шкаф (Класс А)	• Введение 5 % сахарозы (криопротектор) • Концентрация НЧ 1–5 мг/мл • Розлив по 0,5 мл (1 доза) во флаконы из светлого стекла класса I вместимостью 3 мл
ТП 10 – Лиофилизация			
ТП 10.1	Глубокое замораживание	Ультранизкотемпературная камера	• Температура −80 °C, скорость охлаждения 0,5–1,0 °C/мин на 4 часа • Полная витрификация матрицы
ТП 10.2	Первичная сушка (сублимация льда)	Лиофилизатор	• Вакуум 0,05–0,13 mbar, нагрев до 30 °C, температура продукта < −32 °C (16–24 ч)
ТП 10.3	Вторичная сушка (десорбция)	Лиофилизатор	• Вакуум < 0,05 mbar, нагрев до +15 °C (12 ч) • Остаточная влажность < 2–3 %
УМО 11 – Укупорка, маркировка и упаковка			
УМО 11.1	Укупорка флаконов вместимостью 3 мл	Камера лиофилизатора	• Укупорка резиновыми пробками в условиях вакуума или в атмосфере сухого азота
УМО 11.2	Маркировка и упаковка	Стол для упаковки и маркировки	• Этикетка по ГОСТ 7625-86 с указанием состава на дозу, номера серии, даты изготовления, срока годности, условий хранения • Групповая и транспортная упаковка по ГОСТ 17768-90Е и ГОСТ 14192-96 • Закладка на хранение при температуре от −17 до −30 °C

4.2.3 Финишные операции и упаковка

В качестве первичной упаковки для лиофилизации и дальнейшего хранения вакцины NARUVAX-C19/Nano используются флаконы из светлого стекла класса I номинальной вместимостью 3 мл с гладким горлом (по 1 дозе). По завершении этапа вторичной сушки непосредственно в камере лиофилизатора осуществляется финальная финишная операция: герметичная укупорка флаконов резиновыми пробками в условиях вакуума или в атмосфере сухого азота, что исключает контакт АФС с кислородом и предотвращает деградацию продукта. Готовый препарат легко восстанавливается стерильным PBS непосредственно перед интраназальным введением.

4.2.4 Стабильность при хранении

Лиофилизированная форма вакцины по предварительным данным сохраняет свойства. При хранении в защищённом от света месте при температуре от минус 17 до минус 30 °C препарат соответствует требованиям не менее 12 месяцев; при температуре от +2 до +8 °C вакцина сохраняет физико-химические свойства и способность индуцировать специфический иммунный ответ не менее 6 месяцев. Инкапсуляция RBD-белка в хитозановые наночастицы защищает антиген от деградации.

Важно подчеркнуть, что инкапсуляция RBD-белка в хитозановые наночастицы способствует стабилизации антигена. Внутри наночастиц белок защищён от агрессивных факторов внешней среды, включая возможные колебания pH. Собственные исследования показали, что препарат стабилен в нейтральных и слабокислых средах, имитирующих условия слизистой носа. Никаких признаков агрегации наночастиц или выпадения осадка не наблюдалось при хранении вакцины в рекомендуемых условиях. Кроме того, после длительного хранения не отмечалось деградации инкапсулированного белка: электрофоретический профиль и антигенные свойства RBD оставались без изменений (по косвенным данным ELISA-активности и иммуногенности). Таким образом, разработанная нановакцина характеризуется высокой стабильностью при хранении, что упрощает требования к «холодовой цепи» и подтверждает пригодность лекарственной формы для практического применения (таблица 21).

Таблица 21 – Результаты изучения стабильности лиофилизированной нановакцины NARUVAX-C19/Nano при хранении

№	Условия хранения	Контролируемый показатель	Метод контроля	Срок соответствия требованиям	Результат
1	От минус 17 до минус 30 °C, в защищённом от света месте	Описание; внешний вид восстановленного раствора	Визуальный контроль	Не менее 12 мес	Соответствует; признаков агрегации наночастиц и выпадения осадка не выявлено

№	Условия хранения	Контролируе-мый показатель	Метод контроля	Срок соответствия требованиям	Результат
2	То же	Растворимость лиофилизата	Растворение в физиологическом растворе	Не менее 12 мес	Растворяется в течение 30 с
3	То же	Антигенная активность RBD	Иммуноферментный анализ (ИФА)	Не менее 12 мес	Без снижения относительно исходного значения
4	То же	Иммуногенность (анти-RBD sIgA)	ИФА смывов и сывороток иммунизированных животных	Не менее 12 мес	Индукция специфических анти-RBD sIgA сохраняется
5	От +2 до +8 °C	Показатели 1–4	См. показатели 1–4	Не менее 6 мес	Физико-химические свойства и способность индуцировать специфический иммунный ответ сохраняются
6	Комнатная температура (+22 °C)	Описание; растворимость	Визуальный контроль; растворение	До 7 сут	Соответствует. Допустимо для кратковременного транспортирования ; за пределами 7 сут испытания не проводились

Допустимость кратковременного хранения при комнатной температуре в пределах 7 суток относится исключительно к ситуации транспортирования и не распространяется на режим хранения. В проект нормативного документа включено требование транспортирования в термоконтейнерах с хладоэлементами с контролем температурного режима на всём протяжении маршрута. Испытание при пиковой температуре +40 °C, имитирующее сбой холодовой цепи, в рамках настоящей работы не проводилось.

Полноформатное исследование стабильности лиофилизированной формы в объёме, предусмотренном руководствами ICH Q1A(R2) и ICH Q5C, – на трёх промышленных сериях, в первичной упаковке, предусмотренной нормативным документом, с контролем полного набора показателей спецификации при долгосрочном хранении и в режиме ускоренного старения – в рамках диссертационной работы не выполнялось. Приведённые в таблице 21 данные получены на опытных сериях по сокращённому набору показателей и являются предварительными. Хранение при температуре +22 °C в течение 7 суток изучено как модель кратковременного транспортирования и не замещает исследование в режиме ускоренного старения. Заявленный в проекте нормативного документа срок годности подлежит подтверждению до начала клинических исследований I фазы.

4.3 Оценка совместимости активной фармацевтической субстанции со вспомогательными веществами

Выбор вспомогательных веществ для обеих лекарственных форм осуществлён с учётом требования химической инертности по отношению к белковому антигену.

В состав инъекционной формы входят сквален, сорбитана триолеат и полисорбат 80 в составе наноэмульсионного адъюванта Sepivac SWE™, а также фосфатно-солевой буферный раствор. Сквален представляет собой химически инертный ненасыщенный углеводород, не содержащий функциональных групп, способных к взаимодействию с аминокислотными остатками белка; сорбитана триолеат и полисорбат 80 относятся к неионогенным поверхностно-активным веществам и не вступают в ионные взаимодействия с антигеном. Водная фаза поддерживает водородный показатель в диапазоне 7,2–7,4 при норме по проекту нормативного документа от 6,4 до 7,6, что соответствует области конформационной стабильности рекомбинантного белка.

В состав интраназальной формы входят хитозан, триполифосфат натрия и D-манноза. Связывание антигена в наночастицах носит электростатический характер и не сопровождается образованием ковалентных связей с белком, что исключает химическую модификацию антигенных детерминант.

Оценка совместимости проведена по результатам контроля состояния антигена непосредственно в составе готовых лекарственных форм. Для инъекционной формы установлено сохранение структурной целостности белка S-ECD в составе эмульсии при отсутствии фазового разделения композиции и стабильном значении водородного показателя (таблица 18). Для интраназальной формы установлено, что после инкапсуляции в хитозано-маннозные наночастицы, лиофилизации и последующего хранения электрофоретический профиль белка RBD и его антигенные свойства остаются без изменений.

Функциональным подтверждением совместимости служат результаты доклинических исследований обеих лекарственных форм (главы 5 и 6). Сохранение специфической биологической активности антигена после прохождения полного технологического цикла, включающего для интраназальной формы стадии ионного гелеобразования, глубокого замораживания и лиофильной сушки, свидетельствует об отсутствии деструктивного влияния вспомогательных веществ на конформацию и антигенные детерминанты белка. Данный критерий учитывает совокупное воздействие всех компонентов состава и технологических факторов.

Вместе с тем формальное исследование фармацевтической совместимости в виде анализа бинарных смесей активной фармацевтической субстанции с каждым вспомогательным веществом в стресс-условиях в рамках настоящей работы не выполнялось. Проведение такого исследования с контролем по показателям агрегатного состояния, конформационной целостности, антигенной активности и химической стабильности предусмотрено на этапе подготовки регистрационного досье в соответствии с требованиями ICH Q8(R2) и отнесено к направлениям дальнейших

исследований. В первую очередь такое исследование требуется для бинарных систем антигена с поверхностно-активными компонентами наноэмульсионного адъюванта — полисорбатом 80 и сорбитана триолеатом — а также с маннозилированным хитозаном, с контролем агрегации и окислительной модификации белка при термическом и окислительном стрессе.

4.4 Материальный баланс технологического процесса

Материальный баланс составлен в соответствии с ОСТ 64-02-003-2002 раздельно для двух производственных линий и приведён в таблицах 22–25. Нормы расхода сырья и материалов на стадиях получения посевного вирусного материала и биосинтеза приняты по руководству по применению экспрессионной системы ExpiSf™, нормы расхода хроматографических буферов – по утверждённому методу очистки. Потери на отбор проб для внутрипроизводственного контроля и закладку архивных образцов приняты равными 10 % от загрузки.

За базис расчёта приняты два уровня: 1 л культуральной жидкости – для I этапа технологии приготовления, общего для обеих линий, и условная серия в 1000 доз готовой лекарственной формы – для II этапа.

Получение посевного вирусного материала. Одна трансфекция в формате флакона 125 мл с внесением 12,5 мкг рекомбинантной бакмидной ДНК даёт 25 мл стока P0 с титром 1×10^{9}–5×10^{9} ивч/мл. Последующая однократная амплификация, при которой 10–20 мкл стока P0 вносят в 200 мл культуры с плотностью 1×10^{6} кл/мл, обеспечивает 200 мл рабочего стока P1. При норме расхода 10–20 мл вирусного стока на 1 л производственной культуры одного цикла генерации достаточно для обеспечения 10–20 л культуральной жидкости, то есть нескольких производственных серий. Баланс стадии приведён в блоке 1 таблицы 23.

I этап – получение активной фармацевтической субстанции. Из 1 л культуральной жидкости получают 1,5–2,0 мг субстанции S-ECD либо 2,0–2,4 мг субстанции RBD. Расход основных материалов на этот объём составляет: среда ExpiSf™ CD Medium – 1000 мл, посевная культура – $5{,}0\times10^{9}$ клеток, ExpiSf™ Enhancer – 4,0 мл, вирусный сток при MOI = 5 – 10–20 мл, фосфатно-солевой буфер для ресуспендирования клеточного осадка – 1000 мл, ингибиторы протеаз (100×) – 10,0 мл, хроматографические буферы – 3,81 л, фосфатно-солевой буфер для диафильтрации – не более 0,76 л.

II этап, линия инъекционной формы NARUVAX-C19. При дозировке 5,0 мкг антигена на дозу и принятых 10 % потерь на контроль загрузка рассчитывается на 1111 доз и требует 5,56 мг субстанции S-ECD, что эквивалентно переработке 2,8–3,7 л культуральной жидкости. На стадии ТП 7.2 к водной фазе объёмом 278 мл с концентрацией антигена 20 мкг/мл добавляют равный объём адъюванта Sepivac SWE; общий объём эмульсии составляет 556 мл.

II этап, линия интраназальной нановакцины NARUVAX-C19/Nano. На стадии ионного гелеобразования (ТП 9.1) в полимерную матрицу включается 66,8 % внесённого антигена; неинкапсулированный антиген, остающийся в супернатанте, относится к технологическим потерям данной стадии. Для

загрузки на 1111 доз требуется 8,32 мг субстанции RBD, из которых инкапсулируется 5,56 мг, а 2,76 мг составляют потери стадии. Это эквивалентно переработке 3,5–4,2 л культуральной жидкости.

Удельная потребность в культуральной жидкости для интраназальной формы на 12–25 % выше, чем для инъекционной, несмотря на более высокий удельный выход субстанции RBD. Разница полностью определяется потерями на стадии инкапсуляции и представляет собой технологический резерв: повышение эффективности инкапсуляции до 80 % снизило бы расходный коэффициент по антигену с 1,66 до 1,39, а потребность в культуральной жидкости – до 2,9–3,5 л на 1000 доз.

Масштабируемость стадии хроматографической очистки. В условиях лабораторного регламента стадии ТП 4.2 и ТП 4.3 реализованы на колонке объёмом 1,0 мл с объёмом вносимой пробы 19,0 мл за цикл, что при серии в 1000 доз требует 148–197 последовательных циклов для инъекционной формы и 185–222 циклов для интраназальной. Данное решение отражает масштаб опытного производства и не является ограничением технологии: переход к колонке объёмом 50–100 мл сокращает число циклов до 2–4 при сохранении всех критических параметров процесса – линейной скорости потока, числа колоночных объёмов на стадиях эквилибрации и отмывки и профиля градиента элюции. Удельные нормы расхода буферов, приведённые в таблице 22, при этом сохраняются в пересчёте на колоночный объём.

Таблица 22 – Нормы расхода сырья и материалов

№	Стадия	Материал	Норма расхода	Источник нормы
1	ВР 2.3	Рекомбинантная бакмидная ДНК	12,5 мкг на 25 мл культуры для трансфекции	Руководство ExpiSf™, табл. 3
2	ВР 2.3	ExpiFectamine™ Sf	30 мкл на 25 мл культуры	Руководство ExpiSf™, табл. 3
3	ВР 2.3	Opti-MEM™ I	1,0 мл на 25 мл культуры	Руководство ExpiSf™, табл. 3
4	ВР 2.3	Плотность клеток при трансфекции	$2{,}5\times10^{6}$ кл/мл	Руководство ExpiSf™, табл. 3
5	ВР 2.4	Сток P0 на амплификацию	10–20 мкл на 200 мл культуры	Руководство ExpiSf™
6	ТП 3.1	Среда ExpiSf™ CD Medium	1000 мл на 1 л культуры	Руководство ExpiSf™, табл. 4
7	ТП 3.1	Посевная культура	$5{,}0\times10^{9}$ клеток на 1 л (5×10^{6} кл/мл)	Руководство ExpiSf™, табл. 4
8	ТП 3.1	ExpiSf™ Enhancer	0,8 мл на 200 мл = 4,0 мл/л	Руководство ExpiSf™, табл. 4
9	ТП 3.2	Вирусный сток при MOI = 5	2–4 мл на 200 мл = 10–20 мл/л	Руководство ExpiSf™, табл. 4
10	ТП 4.1	Буфер для ресуспендирования осадка	1 объём на 1 объём культуры	Руководство ExpiSf™, прил. С
11	ТП 4.1	Ингибиторы протеаз (100×)	1 % об. от объёма буфера	Руководство ExpiSf™, прил. С

Продолжение таблицы 22

№	Стадия	Материал	Норма расхода	Источник нормы
12	ТП 4.2–4.3	Объём пробы за цикл	19,0 мл на колонку 1,0 мл	Протокол хроматографической очистки Expsf_29.05.24
13	ТП 4.2–4.3	Буфер A	54,15 мл за цикл	Протокол хроматографической очистки Expsf_29.05.24
14	ТП 4.2–4.3	Буфер B	16,35 мл за цикл	Протокол хроматографической очистки Expsf_29.05.24
15	ТП 4.4	Степень концентрирования	в 10–20 раз	Таблица 16
16	ТП 7.2	Адъювант Sepivac SWE	0,25 мл на дозу (соотношение фаз 50:50)	Проект НД
17	ТП 9.1	Наночастицы хитозана	1–5 мг/мл	Таблица 20
18	ТП 9.2	Сахароза (криопротектор)	5 % = 50 мг/мл	Таблица 20
19	Все стадии	Потери на контроль и архивные образцы	10 % от загрузки	Принято в настоящей работе

Расход буферов за один цикл хроматографии складывается из промывки насосов (5,00 мл A и 5,00 мл B), эквилибрации 5 CV при 0 % B, дочистки пробы 0,50 мл, двух стадий отмывки по 15 CV, линейного градиента элюции 0→100 % B объёмом 20,0 мл и реэквилибрации 5 CV при 0 % B. Суммарный расход за цикл – 70,50 мл. Норма посева 5×10^6 кл/мл относится к стадии ТП 3.1, выполняемой за 18–24 ч до инфицирования. Плотность клеток на момент инфицирования (ТП 3.2) составляет $6{,}5–7{,}0\times10^6$ кл/мл согласно CPP 1 таблицы 16, что соответствует диапазону $5–7\times10^6$ кл/мл, установленному руководством.

Таблица 23 – Материальный баланс I этапа

Блок 1 – Получение посевного вирусного материала (ВР 2.3–2.4), один цикл генерации

Взято	Количество	Получено	Количество
Культура *ExpiSf9*™ для трансфекции	25 мл ($62{,}5\times10^6$ клеток)	Сток P0, титр $1\times10^9–5\times10^9$ ивч/мл	25 мл
Рекомбинантная бакмидная ДНК	12,5 мкг	Рабочий сток P1	200 мл
ExpiFectamine™ Sf	30 мкл	Отход: клеточный дебрис (300 × g, 5 мин)	–
Opti-MEM™ I	1,0 мл	Обеспечиваемый объём производственной культуры	10–20 л
Культура *ExpiSf9*™ для амплификации	200 мл ($2{,}0\times10^8$ клеток)		
Сток P0 на амплификацию	10–20 мкл		

Блок 2 – Получение АФС, на 1 л культуральной жидкости

Взято	Количество	Получено	Количество
Среда ExpiSf™ CD Medium	1000 мл	АФС S-ECD	1,5–2,0 мг
Посевная культура *ExpiSf9*™	$5{,}0\times10^{9}$ клеток	либо АФС RBD	2,0–2,4 мг
ExpiSf™ Enhancer	4,0 мл	Объём культуральной жидкости на сборе	1014–1024 мл
Вирусный сток P1 (MOI = 5)	10–20 мл	Отход: клеточный дебрис (ТП 3.3, 300 × g, 5 мин)	–
Фосфатно-солевой буфер для ресуспендирования (ТП 4.1)	1000 мл	Отход: нерастворимая фракция лизата (16 000 × g, 10 мин)	–
Ингибиторы протеаз, 100×	10,0 мл	Объём осветлённого лизата	1010 мл
Буфер A (ТП 4.2–4.3), 54 цикла	2,92 л	Отход: промывные фракции (2 × 15 CV)	1,62 л
Буфер B (ТП 4.2–4.3), 54 цикла	0,88 л	Отход: промывки насосов, эквилибрация, реэквилибрация	1,08 л
Фосфатно-солевой буфер для диафильтрации (ТП 4.4)	не более 0,76 л	Объединённый элюат (фракции по 1,0 мл)	не более 1,08 л
		Ретентат после концентрирования в 10–20 раз	не более 54–108 мл
		Отход: пермеат УФ/ДФ	по объёму концентрирования
		Потери на контроль качества и архивные образцы	10 %
Итого буферов хроматографии	3,81 л	Итого отходов хроматографии	2,73 л

Объём осветлённого лизата принят равным сумме объёма буфера для ресуспендирования и объёма внесённых ингибиторов протеаз: 1000 + 10 = 1010 мл. Число циклов хроматографии: 1010 / 19 = 54.

Верхняя граница объёма объединённого элюата равна суммарному объёму градиента элюции за 54 цикла (20,0 мл × 54 = 1,08 л). Фактический объём определяется числом собранных целевых фракций и устанавливается по данным выпуска опытных партий; расход фосфатно-солевого буфера на диафильтрацию рассчитан на 7 диаобъёмов ретентата.

Таблица 24 – Материальный баланс NARUVAX-C19, серия 1000 доз

Загрузка рассчитана на 1111 доз.

Взято	Количество	Получено	Количество
Эквивалент культуральной жидкости	2,8–3,7 л	Готовая лекарственная форма	1000 доз по 0,5 мл
Среда ExpiSf™ CD Medium	2,8–3,7 л	Антиген в выпущенной продукции	5,00 мг
Посевная культура *ExpiSf9*™	$1{,}39\times10^{10}$–$1{,}85\times10^{10}$ клеток	Объём товарной продукции	500 мл
ExpiSf™ Enhancer	11,1–14,8 мл	Образцы на контроль качества и в архив	111 доз (56 мл)
Вирусный сток P1 (MOI = 5)	28–74 мл	Отходы I этапа (см. таблицу 23)	–
Фосфатно-солевой буфер для лизиса	2,8–3,7 л	Потери на розливе и укупорке (УМО 8.1)	в пределах 10 %
Ингибиторы протеаз, 100×	27,8–37,0 мл		
Буфер A (148–197 циклов)	8,0–10,7 л		
Буфер B (148–197 циклов)	2,4–3,2 л		
АФС S-ECD (в пересчёте на белок)	5,56 мг		
Фосфатно-солевой буфер pH 7,4	до 278 мл водной фазы		
Адъювант Sepivac SWE	278 мл		
Флаконы стеклянные I класса, 5 мл	1111 шт.		
Пробки резиновые, колпачки Flip-off	1111 компл.		

Концентрация антигена в водной фазе – 20 мкг/мл. Объёмное соотношение водной и масляной фаз – 50:50 (ТП 7.2). Общий объём эмульсии на загрузку – 556 мл.

Таблица 25 – Материальный баланс NARUVAX-C19/Nano, серия 1000 доз

Загрузка рассчитана на 1111 доз.

Взято	Количество	Получено	Количество
Эквивалент культуральной жидкости	3,5–4,2 л	Готовая лекарственная форма	1000 доз
Среда ExpiSf™ CD Medium	3,5–4,2 л	Инкапсулированный RBD в выпущенной продукции	5,00 мг
Посевная культура *ExpiSf9*™	$1{,}73\times10^{10}$–$2{,}08\times10^{10}$ клеток	Потери: неинкапсулированный RBD в супернатанте (ТП 9.1)	2,76 мг
ExpiSf™ Enhancer	13,9–16,6 мл	Образцы на контроль качества и в архив	111 доз
Вирусный сток P1 (MOI = 5)	35–83 мл	Отходы I этапа (см. таблицу 23)	–
Фосфатно-солевой буфер для лизиса	3,5–4,2 л	Потери на розливе (ТП 9.2) и укупорке (УМО 11.1)	в пределах 10 %

Продолжение таблицы 25

Взято	Количество	Получено	Количество
Ингибиторы протеаз, 100×	34,7–41,6 мл		
Буфер A (185–222 цикла)	10,0–12,0 л		
Буфер B (185–222 цикла)	3,0–3,6 л		
АФС RBD (в пересчёте на белок)	8,32 мг		
Маннозилированный хитозан	0,56–2,78 г		
Сахароза (криопротектор, 5 %)	27,8 г		
Флаконы стеклянные I класса, 3 мл	1111 шт.		
		η стадии инкапсуляции	66,8 %

Объём суспензии перед лиофилизацией – 556 мл. Масса наночастиц рассчитана для концентрации 1–5 мг/мл согласно таблице 20. Эффективность инкапсуляции принята по данным, опубликованным в [91].

4.5 Оценка материальной себестоимости производства

Оценка материальной себестоимости выполнена на основе норм расхода сырья и материалов (таблица 22) и материального баланса производственных линий (таблицы 23–25). За базис расчёта принята условная серия 1000 доз готовой лекарственной формы с загрузкой на 1111 доз, что соответствует принятым 10 % потерь на внутрипроизводственный контроль и закладку архивных образцов. Цены на сырьё и расходные материалы приняты по каталогу Thermo Fisher Scientific; цена закупаемого адъюванта Sepivac SWE принята по коммерческому инвойсу поставщика (Seppic). В качестве ингибитора протеаз на стадии лизиса использован фенилметилсульфонилфторид (PMSF) в концентрации 1 мМ. Пересчёт в тенге выполнен по официальным курсам Национального Банка Республики Казахстан: 451,05 тг/долл. США и 504,95 тг/евро. В расчёт включены только материальные затраты по каталожным (закупочным) ценам; затраты на оплату труда, энергоресурсы, амортизацию оборудования и многоразовых хроматографических сорбентов, доставку и косвенные налоги не учитывались. Себестоимость одной дозы получена делением суммарной стоимости материалов серии на 1000 доз.

Результаты расчёта для субъединичной инъекционной вакцины NARUVAX-C19 приведены в таблице 26, для интраназальной нановакцины NARUVAX-C19/Nano – в таблице 27.

Таблица 26 – Материальная себестоимость одной дозы вакцины NARUVAX-C19

Компонент	Расход на серию 1000 доз	Цена за единицу	Стоимость на серию, долл. США
Среда ExpiSf CD Medium	2,8–3,7 л	175,50 $/л	491–649
ExpiSf Enhancer	11,1–14,8 мл	1,30 $/мл	14–19
Ингибитор протеаз PMSF (1 мМ)	0,49–0,64 г	24,00 $/г	12–15
Реактивы буферов хроматографии (имидазол, NaCl, фосфаты)	10,4–13,9 л	–	43–55
Адъювант Sepivac SWE	278 мл	≈ 6,90 $/мл	1917
Первичная упаковка (флакон 5 мл, пробка, колпачок)	1111 компл.	0,75 $/компл.	833
Посевной вирусный материал (амортизирован на 10–20 л)	–	–	10–15
Итого на серию (1000 доз)			3321–3505
Себестоимость 1 дозы			3,32–3,50 $ (≈ 1500–1580 ₸)

Таблица 27 – Материальная себестоимость одной дозы вакцины NARUVAX-C19/Nano

Компонент	Расход на серию 1000 доз	Цена за единицу	Стоимость на серию, долл. США
Среда ExpiSf CD Medium	3,5–4,2 л	175,50 $/л	614–737
ExpiSf Enhancer	13,9–16,6 мл	1,30 $/мл	18–22
Ингибитор протеаз PMSF (1 мМ)	0,61–0,73 г	24,00 $/г	15–18
Реактивы буферов хроматографии (имидазол, NaCl, фосфаты)	13,0–15,6 л	–	52–62
Наночастицы (хитозан, D-манноза, триполифосфат)	0,56–2,78 г хитозана	–	2–10
Сахароза (криопротектор)	27,8 г	0,05 $/г	1,4
Первичная упаковка (флакон 3 мл, пробка, колпачок)	1111 компл.	0,70 $/компл.	778
Посевной вирусный материал (амортизирован на 10–20 л)	–	–	12–18
Итого на серию (1000 доз)			1493–1645
Себестоимость 1 дозы			1,49–1,65 $ (≈ 675–740 ₸)

Материальная себестоимость одной дозы составляет 3,32–3,50 долл. США (≈ 1500–1580 тг) для инъекционной вакцины NARUVAX-C19 и 1,49–1,65 долл. США (≈ 675–740 тг) для интраназальной нановакцины NARUVAX-C19/Nano. Инъекционная форма примерно вдвое дороже: её себестоимость определяется прежде всего стоимостью закупаемого адъюванта (около 55 %) и первичной упаковки (около 24 %). Интраназальная нановакцина, несмотря на более высокий расход культуральной жидкости вследствие потерь антигена на стадии инкапсуляции (эффективность 66,8 %), оказывается дешевле за счёт отсутствия адъюванта; в структуре её затрат преобладают первичная упаковка и

питательная среда. Полученные значения отражают масштаб опытного производства и каталожные цены реактивов научного назначения; при переходе к промышленному масштабу и оптовых закупках себестоимость обеих форм снижается, что согласуется с отмеченным преимуществом бакуловирусной технологии по экономичности производства.

Приведённые значения соответствуют опытному (лабораторному) масштабу и каталожным ценам реактивов научного назначения и содержат значительный резерв снижения при переходе к опытно-промышленному производству. Во-первых, оптовые закупки и прямые поставки сырья технического и GMP-назначения устраняют наценку мелкой лабораторной расфасовки – прежде всего по трём доминирующим статьям: адъюванту, питательной среде и первичной упаковке. Во-вторых, оптимизация стадии аффинной очистки – переход с колонки объёмом 1,0 мл на колонку 50–100 мл – сокращает число хроматографических циклов со 148–222 до 2–4 при сохранении критических параметров процесса что кратно снижает удельный расход буферов и трудозатраты. В-третьих, дальнейшая оптимизация условий экспрессии и повышение удельного выхода рекомбинантного белка уменьшают объём культуральной жидкости на дозу и, соответственно, расход среды, буферов и ингибитора протеаз. Для интраназальной формы дополнительный резерв обеспечивает повышение эффективности инкапсуляции: при её росте с 66,8 до 80 % расходный коэффициент по антигену снижается с 1,66 до 1,39, а потребность в культуральной жидкости – до 2,9–3,5 л на 1000 доз (см. раздел 4.4). Наконец, увеличение размера серии распределяет условно-постоянные затраты (посевной вирусный материал, образцы для контроля качества и архива) на больший выпуск. В совокупности указанные факторы обеспечивают существенное снижение материальной себестоимости обеих лекарственных форм относительно оценок опытного масштаба.

4.6 Оценка профиля примесей

Профиль примесей активной фармацевтической субстанции и готовых лекарственных форм оценивали в соответствии с подходом ICH Q6B, разделяющим примеси биотехнологического препарата на процесс-зависимые – привносимые клеткой-продуцентом, питательной средой, реагентами и материалами стадий выделения и очистки, – и продукт-зависимые, представляющие собой молекулярные варианты целевого белка, образующиеся при биосинтезе, очистке и хранении.

Вспомогательные вещества состава готовых лекарственных форм – наноэмульсионный адъювант Sepivac SWE, маннозилированный хитозан, триполифосфат натрия, сахароза и олигонуклеотидный адъювант CpG 55.2 – к примесям не относятся и нормируются как компоненты состава. Примесями являются их остаточные непрореагировавшие количества, продукты деградации и остаточные растворители, применённые при их получении. Свободный неинкапсулированный антиген также не является примесью: он представляет собой то же действующее вещество и нормируется показателем «эффективность инкапсуляции» (таблица 19).

Для каждой примеси ниже указан уровень обоснования: (1) собственные аналитические данные – метод, его предел обнаружения или количественного определения и полученный результат; (2) расчёт клиренса – кратность разведения, число циклов диафильтрации или разделяющая способность стадии по технологической схеме (таблица 16); (3) вещество на данном производстве не применялось, что исключает его присутствие.

Таблица 28 – Сводные данные по профилю примесей активных фармацевтических субстанций S-ECD и RBD

Примесь	Класс по Q6B	Метод контроля либо основание клиренса	Субстан-ция S-ECD	Субстан-ция RBD	Уровень
Белки клетки-хозяина	Процесс-зависимые	Электрофорез в полиакриламидном геле с денситометрией. Клиренс: повышенная ионная сила и 30 мМ имидазола в лизирующем буфере, ступенчатая отмывка ТП 4.2, гель-фильтрация ТП 4.3	Степень чистоты более 95 %	Степень чистоты более 95 %	1 и 2
Остаточная ДНК клетки-хозяина и вектора	Процесс-зависимые	Флуориметрия суммарной двухцепочечной ДНК. Норма не более 10 нг на дозу (таблица 1)	Ниже предела обнаруже-ния; предел в пересчёте на дозу не более 1,0 нг, то есть не менее чем в 10 раз ниже нормы	То же	1
Остаточный бакуловирус	Процесс-зависимые	Гель-фильтрация ТП 4.3: вирион размером 40–60 нм в поперечнике при длине 200–400 нм выходит в исключённом объёме. Дополнительно проскок ТП 4.2, поскольку gp64 не несёт полигистидиновой метки	Полное разделение с целевым белком 140–160 кДа	Полное разделение с целевым белком 25–28 кДа	2
Посторонние агенты, эндогенные ретровирусы, микоплазмы	Процесс-зависимые	Испытания Главного и Рабочего банков клеток; микоплазмы по ОФС 2.1.6.12 Фармакопеи ЕАЭС	Не обнару--жены	Не обнару-жены	1
Компоненты среды ExpiSf CD и ExpiSf Enhancer	Процесс-зависимые	Не несут полигистидиновой метки: проскок и ступенчатая отмывка ТП 4.2, гель-фильтрация ТП 4.3, замена буферной системы на фосфатно-солевой буфер ТП 4.4	Удаляются	Удаляются	2

Продолжение таблицы 28

Примесь	Класс по Q6B	Метод контроля либо основание клиренса	Субстанция S-ECD	Субстанция RBD	Уровень
Антибиотики (ампициллин, канамицин, гентамицин)	Процесс-зависимые	Применяются только на стадиях BP 2.1–2.2 в клетках E. coli DH10Bac; в производственную культуру клеток насекомых и в буферы выделения не вносятся	Не применяются; контроль в субстанции не требуется	То же	3
Сырьё животного и дрожжевого происхождения	Процесс-зависимые	Применяется исключительно химически определённое сырьё без сыворотки крови и экстрактов	Не применяется	Не применяется	3
Имидазол	Процесс-зависимые	30 мМ в лизирующем буфере и до 500 мМ при элюции, что соответствует 34,0 г/л в элюате. Удаление: гель-фильтрация ТП 4.3 и диафильтрация ТП 4.4, с учётом разведения субстанции в 50–100 раз при составлении дозы	Суммарный клиренс не менее трёх порядков	То же	2
Ионы никеля и нитрилотриуксусная кислота	Процесс-зависимые, элементные	ICH Q3D: никель класса 2A, допустимая суточная экспозиция 20 мкг парентерально. При дозировке антигена 5,0 мкг в дозе допустимо 4 мкг никеля на микрограмм белка	Предел может быть превышен лишь при содержании никеля порядка 400 % от массы целевого белка; рутинный контроль в спецификацию не вводится	То же	2
Этанол	Процесс-зависимые	30 % в суспензии Ni-NTA-агарозы и 20 % при дезинфекции системы. ICH Q3C, класс 3, предел 5000 ppm. Обе операции отделены от нанесения образца реэквилибрацией колонки	Контроль остаточного содержания не требуется	То же	2
Triton X-100	Процесс-зависимые	1 % (10 г/л) в лизирующем буфере. Удаление: проскок и ступенчатая отмывка ТП 4.2, реэквилибрация, гель-фильтрация ТП 4.3. Ультрафильтрация ТП 4.4 как стадия удаления не учитывается: мицеллы имеют кажущуюся массу около 90 кДа	Удаляется	Удаляется	2

Продолжение таблицы 28

Примесь	Класс по Q6B	Метод контроля либо основание клиренса	Субстанция S-ECD	Субстанция RBD	Уровень
Фенилметилсульфонилфторид и продукты его гидролиза	Процесс-зависимые	1 мМ в лизирующем буфере. При pH 7,4–8,0 гидролизуется с периодом полупревращения 35–55 мин. Фенилметансульфоновая кислота и фторид-ион удаляются стадиями ТП 4.3–4.4 наравне с имидазолом	К завершению стадии аффинной хроматографии реагент не сохраняется	То же	2
Коктейль ингибиторов протеаз	Процесс-зависимые	1 % от объёма буфера. Компоненты низкомолекулярны либо имеют массу значительно ниже целевого белка и разделяются с ним на стадиях ТП 4.2–4.4	Удаляется	Удаляется	2
Глицерин, ЭДТА, восстанавливающие и хаотропные агенты	Процесс-зависимые	Целевой белок выделяется в растворимой фракции без стадии рефолдинга. Дитиотреитол 50 мМ применяется только при подготовке аналитических проб и в продукт не попадает	Не применяются	Не применяются	3
Элементные примеси классов 1, 2B и 3	Процесс-зависимые, элементные	ICH Q3D: намеренно не применяются ни на одной стадии, катализаторы переходных металлов не используются. Вода очищенная по ОФС 2.2.1.13 не допускает присутствия тяжёлых металлов	Не применяются	Не применяются	3
Органические растворители классов 1 и 2	Процесс-зависимые	ICH Q3C: на всех стадиях не применялись (таблицы 2, 3, 16, 20). Из класса 3 применяется только этанол	Не применяются; контроль в спецификацию не вводится	То же	3
Агрегированные и высокомолекулярные формы	Продукт-зависимые	Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография. Целенаправленное удаление на стадии гель-фильтрации ТП 4.3	Инструментально на данном этапе не определялось	Инструментально на данном этапе не определялось	1 и 2
Фрагменты и усечённые формы	Продукт-зависимые	Электрофорез в восстановительных условиях по появлению полос меньшей молекулярной массы относительно целевой. Меры: ингибиторы протеаз в лизирующем буфере, ведение операций выделения при 4 °C	Целевая полоса 140–160 кДа	Целевая полоса 25–28 кДа	1

Продолжение таблицы 28

Примесь	Класс по Q6B	Метод контроля либо основание клиренса	Субстанция S-ECD	Субстанция RBD	Уровень
Окисленные, дезамидированные и неправильно свёрнутые формы	Продукт-зависимые	Пептидное картирование и масс-спектрометрия. Конформационная целостность подтверждается иммуноблоттингом. Снижение риска: хранение при минус 20 °C в защищённом от света месте, укупорка лиофилизата в атмосфере сухого азота	Специфическая реакция с антителами положительная	Специфическая реакция с антителами положительная	1 и 2
Бактериальные эндотоксины	Процесс-зависимые	Метод с рекомбинантным фактором C, калибровка в диапазоне 0,005–5,0 ЭЕ/мл при чувствительности 0,005 ЭЕ/мл. Норма не более 1,0 ЭЕ/мкг белка (таблица 1)	0,2 ЭЕ/мкг белка — 20 % от нормы	0,15 ЭЕ/мкг белка — 15 % от нормы	1

Общим для всех процесс-зависимых примесей субстанции является дополнительный клиренс на стадии составления дозы. При концентрации субстанции S-ECD 0,5–1,0 мг/мл (таблица 1) и дозировке антигена 5,0 мкг в дозе 0,5 мл (таблица 18) в одну дозу входит от 5 до 10 мкл субстанции, то есть любая привнесённая стадиями выделения и очистки примесь разбавляется дополнительно в 50–100 раз. Этот коэффициент учтён во всех приведённых ниже расчётах уровня (2) и не требует отдельных измерений.

Примеси, связанные с клеткой-продуцентом и вектором

Белки клетки-хозяина поступают на колонку в составе объединённого образца – осветлённой культуральной жидкости и лизата клеточного осадка (стадии ТП 3.3 и ТП 4.1–4.2, таблица 16). Соотношение фракций определяет суммарную нагрузку по белкам клетки-хозяина и остаточной ДНК. Селективность металл-хелатной хроматографии по полигистидиновой метке снижает их содержание, однако не исключает соочистки белков клетки-хозяина, содержащих природные гистидин-богатые участки, способные координироваться с ионами Ni^{2+}. Применённые технологические меры – повышенная ионная сила и 30 мМ имидазола в лизирующем буфере (подраздел 3.6), ступенчатая отмывка слабосвязавшихся белков и завершающая гель-фильтрация (ТП 4.3), удаляющая остаточные белковые примеси и агрегированные формы, – обоснование уровня (2). Достигнутая степень чистоты составляет более 95 % по данным электрофореза в полиакриламидном геле с денситометрией (таблица 1, подраздел 3.7) – обоснование уровня (1). Вместе с тем следует учитывать, что предел обнаружения денситометрии при окрашивании Кумасси бриллиантовым синим составляет порядка 0,5–1 % от общего белка в пробе и не позволяет охарактеризовать содержание белков клетки-хозяина на уровне, принятом для биотехнологических препаратов.

Остаточная ДНК клетки-хозяина поступает из того же источника. Клиренс обеспечивается последовательно: осветлением лизата центрифугированием, проскоком несвязавшихся компонентов на стадии ТП 4.2

и гель-фильтрацией ТП 4.3, на которой высокомолекулярная ДНК выходит в исключённом объёме и разделяется с целевым белком.

Остаточный бакуловирус присутствует в культуре к моменту сбора в силу принципа системы экспрессии: рабочий вирусный сток имеет титр не менее 1×10^8 ивч/мл, инфицирование проводится при MOI = 5 (таблица 16, ТП 3.2). Решающей стадией клиренса является гель-фильтрация ТП 4.3: бакуловирусная частица имеет размер порядка 40–60 нм в поперечнике при длине 200–400 нм и выходит в исключённом объёме колонки, то есть полностью разделяется с целевым белком молекулярной массой 25–160 кДа; дополнительный вклад вносит проскок на стадии ТП 4.2, поскольку оболочечный белок gp64 не несёт полигистидиновой метки, – обоснование уровня (2). Стерилизующая фильтрация с пором 0,22 мкм (ТП 5.1) как стадия удаления бакуловируса не рассматривается, поскольку размер вириона допускает его прохождение через такую мембрану.

Посторонние агенты контролируются на уровне Главного и Рабочего банков клеток: выполнены испытания на отсутствие контаминации адвентивными агентами и эндогенными ретровирусами (подраздел 2.2), контроль отсутствия микоплазм проводится согласно ОФС 2.1.6.12 Фармакопеи ЕАЭС – обоснование уровня (1). Риск внесения агентов животного происхождения с сырьём исключён применением исключительно химически определённого сырья, не содержащего сыворотки крови и экстрактов животного или дрожжевого происхождения (подраздел 2.1.3) – обоснование уровня (3).

Примеси, связанные со средой культивирования

Культивирование проводится в химически определённой бессывороточной среде ExpiSf CD Medium, содержащей аминокислоты, витамины, минеральные соли, глюкозу, антиоксиданты, фосфатные буферные системы и стабилизаторы, защищающие клетки от механических повреждений (подраздел 3.1). Среда не требует добавок; дополнительно вносится только ExpiSf Enhancer в норме 4,0 мл/л за 18–24 часа до инфицирования (таблица 22). Компоненты среды и стимулятора не несут полигистидиновой метки и удаляются в проскоке и на ступенчатой отмывке стадии ТП 4.2, затем на гель-фильтрации и при замене буферной системы на PBS (ТП 4.4) – обоснование уровня (2).

Антибиотики (ампициллин 100 мкг/мл, канамицин 50 мкг/мл, гентамицин) применяются исключительно на стадиях ВР 2.1–2.2 – при амплификации плазмиды и сине-белой селекции бакмид в клетках E. coli DH10Bac (подраздел 3.6). В среду производственной культуры клеток насекомых и в буферы стадий выделения и очистки антибиотики не вносятся, и от целевого продукта их отделяют стадии выделения бакмидной ДНК, трансфекции и двух пассажей амплификации вирусного стока – обоснование уровня (3), контроль антибиотиков в субстанции не требуется. Антивспениватель и плюроник как отдельные добавки не вносились – обоснование уровня (3).

Примеси, связанные с аффинной очисткой

Имидазол вносится дважды: 30 мМ в лизирующий буфер и до 500 мМ на стадии элюции, что соответствует 34,0 г/л в элюате (подраздел 3.7). Удаление обеспечивается двумя независимыми стадиями: гель-фильтрацией ТП 4.3, на которой молекула имидазола (68,08 г/моль) полностью входит в поры сорбента и разделяется с белком, и диафильтрацией ТП 4.4 методом последовательного разбавления ретентата буфером PBS. С учётом дополнительного разведения субстанции в 50–100 раз при составлении дозы суммарный клиренс имидазола составляет не менее трёх порядков – обоснование уровня (2).

Ионы никеля поступают с Ni-NTA-матрицы и относятся к элементным примесям. По ICH Q3D никель входит в класс 2A с допустимой суточной экспозицией 20 мкг для парентерального пути введения. При дозировке антигена 5,0 мкг в дозе это соответствует допустимому соотношению 4 мкг никеля на микрограмм белка, то есть предел может быть превышен лишь при содержании никеля порядка 400 % от массы целевого белка. Исходя из этой оценки риска рутинный контроль никеля в спецификацию не вводится. Этот же расчёт распространяется на продукты вымывания хелатирующего лиганда нитрилотриуксусной кислоты (191,14 г/моль), удаляемые теми же стадиями, что и имидазол – обоснование уровня (2).

Полигистидиновая метка на С-конце остаётся в составе молекулы активной субстанции: стадия её ферментативного отщепления технологической схемой не предусмотрена (таблица 16), а идентификация субстанции выполняется вестерн-блоттингом с антителами к этой метке (подраздел 3.6). Следовательно, протеаза для отщепления, отщеплённый пептид и неполностью расщеплённая форма как примеси не образуются – обоснование уровня (3). Полигистидиновая метка при этом рассматривается не как примесь, а как структурный элемент действующего вещества, включённый в расчётную молекулярную массу и описание молекулы в проекте нормативного документа.

Этанол применяется в составе суспензии Ni-NTA-агарозы (30 %, таблица 2) и при дезинфекции системы по завершении цикла (20 %, подраздел 3.7). По ICH Q3C этанол относится к классу 3 с допустимым суточным потреблением 50 мг и пределом 5000 ppm. Обе операции отделены от нанесения образца реэквилибрацией колонки стартовым буфером – обоснование уровня (2); с учётом клиренса стадий ТП 4.3–4.4 и разведения дозы контроль остаточного этанола не требуется.

Примеси, связанные с буферами и реагентами выделения

Натрий-фосфатный буфер (20 мМ) и хлорид натрия (300–500 мМ) на стадии ТП 4.4 заменяются на целевой фосфатно-солевой буфер, то есть переходят в состав субстанции как его компоненты и к примесям не относятся.

Triton X-100 вносится в лизирующий буфер в концентрации 1 % (10 г/л). Основной стадией его удаления является аффинная хроматография: детергент не связывается с сорбентом, удаляется в проскоке и на ступенчатой отмывке, после чего колонка реэквилибрируется; дополнительный клиренс обеспечивает гель-фильтрация ТП 4.3 – обоснование уровня (2). Стадия ультрафильтрации ТП 4.4 как стадия удаления детергента не рассматривается: при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования Triton X-100 формирует

мицеллы с кажущейся молекулярной массой около 90 кДа, сопоставимой с пределом отсечения применяемых мембран, и через них не проходит.

Фенилметилсульфонилфторид вносится в концентрации 1 мМ и в водных средах при pH 7,4–8,0 самопроизвольно гидролизуется с периодом полупревращения порядка 35–55 мин, то есть к завершению стадии аффинной хроматографии реагент как таковой практически не сохраняется. Продукты гидролиза – фенилметансульфоновая кислота и фторид-ион – низкомолекулярны и удаляются стадиями ТП 4.3–4.4 наравне с имидазолом – обоснование уровня (2).

Ингибитор сериновых протеаз фенилметилсульфонилфторид применён исключительно на стадии лизиса клеточного осадка в лабораторном масштабе и к числу компонентов состава не относится. В водной среде реагент подвергается быстрому гидролизу с образованием фенилметилсульфоновой кислоты и фторид-иона, не обладающих ингибиторной активностью. Последующая каскадная очистка, включающая металлохелатную аффинную хроматографию, гель-фильтрацию и ультрафильтрацию с диафильтрацией против фосфатно-солевого буфера, обеспечивает разведение низкомолекулярных компонентов лизирующего буфера на несколько порядков.

Коктейль ингибиторов протеаз широкого спектра вносится в объёме 1 % от объёма буфера (таблица 22). Его компоненты низкомолекулярны либо имеют молекулярную массу значительно ниже целевого белка и разделяются с ним на стадиях ТП 4.2–4.4 – обоснование уровня (2). Состав коктейля подлежит объявлению в спецификации сырья, поскольку отдельные коммерческие коктейли содержат компоненты животного происхождения, что должно быть согласовано с требованием об исключительно химически определённом сырье.

Глицерин, этилендиаминтетраацетат, восстанавливающие агенты (дитиотреитол, β-меркаптоэтанол, трис(2-карбоксиэтил)фосфин) и хаотропные агенты в технологическом процессе не применялись: целевой белок выделяется в растворимой фракции без стадии рефолдинга (таблица 16) – обоснование уровня (3). Дитиотреитол в концентрации 50 мМ используется исключительно при подготовке аналитических проб для электрофореза (подраздел 3.7) и в продукт не попадает.

Продукт-зависимые примеси

Агрегированные формы удаляются целенаправленно на стадии гель-фильтрации ТП 4.3 (таблица 16), их выявление и оценка монодисперсности выполняются методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (подраздел 2.2) – обоснование уровня (1) и (2).

Фрагменты и усечённые формы могут образовываться при протеолизе после лизиса клеток. Принятые меры – введение ингибиторов протеаз в лизирующий буфер и ведение всех операций выделения при 4 °C (подраздел 3.6, таблица 16). Контроль осуществляется электрофорезом в восстановительных условиях по появлению полос меньшей молекулярной массы относительно целевой (25–28 кДа для RBD, 140–160 кДа для S-ECD, таблица 1) – обоснование уровня (1) в пределах разрешающей способности метода.

Окисленные и дезамидированные формы, а также неправильно свёрнутый белок относятся к молекулярным вариантам, выявляемым пептидным картированием и масс-спектрометрией (подраздел 2.2). Снижение риска окислительной деградации обеспечивается хранением субстанции при минус 20 °C в защищённом от света месте и укупоркой лиофилизата в атмосфере сухого азота (подраздел 4.2.3) – обоснование уровня (2). Сохранение конформационной целостности подтверждается специфической реакцией с антителами в иммуноблоттинге (таблица 1) и результатами доклинических исследований иммуногенности (главы 5 и 6).

Вариабельность гликозилирования – закономерная особенность избранной системы экспрессии: клетки насекомых формируют преимущественно пауциманнозные гликаны без терминальных сиаловых кислот и способны присоединять ядровую α-1,3-фукозу.

Элементные примеси и остаточные органические растворители

Оценка риска по ICH Q3D показывает, что из всех классов элементных примесей применимым к данному процессу является только никель (класс 2A), намеренно вводимый в составе хроматографической матрицы. Элементы класса 1 (кадмий, свинец, мышьяк, ртуть), класса 2B и класса 3 намеренно не применяются ни на одной стадии; катализаторы переходных металлов в синтезе не участвуют. Контаминация с водой исключена требованиями на воду очищенную по ОФС 2.2.1.13 Фармакопеи ЕАЭС, не допускающими присутствия тяжёлых металлов (подраздел 2.1.3) – обоснование уровня (3).

Из органических растворителей по ICH Q3C в процессе применяются только вещества класса 3 – этанол и (при подтверждении) уксусная кислота, для которых установлен общий предел 5000 ppm. Растворители класса 1 и класса 2 на всех стадиях не применялись (таблицы 2, 3, 16, 20), что исключает их присутствие – обоснование уровня (3), рутинный контроль остаточных растворителей в спецификацию не вводится.

Бактериальные эндотоксины и микробиологическая чистота

Содержание бактериальных эндотоксинов рассмотрено в подразделах 3.7 и 3.9: для субстанции норма составляет не более 1,0 ЭЕ/мкг белка при фактически полученных 0,2 ЭЕ/мкг для S-ECD и 0,15 ЭЕ/мкг для RBD, для готовой инъекционной формы – не более 100 ЭЕ в дозе 0,5 мл (таблица 18). Основным источником эндотоксинов для интраназальной формы является хитозан как сырьё природного происхождения, поэтому соответствующий показатель вносится в спецификацию сырья. Микробиологическая чистота лиофилизата нормируется согласно ОФС 2.1.6.6 Фармакопеи ЕАЭС для препаратов для нанесения на слизистые оболочки.

Выводы по разделу 4

1. Обоснован состав инъекционной лекарственной формы NARUVAX-C19: объёмное соотношение раствора антигена и наноэмульсионного масляного адъюванта Sepivac SWE™ 50:50 задано конструкцией адъюванта как двукратного концентрата и не подлежит оптимизации. При прививочной дозе 0,5 мл это обеспечивает введение сквалена 9,75 мг, сорбитана триолеата 1,175 мг и полисорбата 80 1,175 мг при конечной концентрации цитратного буфера 5

мМ. Отклонение к соотношению 70:30 снизило бы содержание сквалена до 5,85 мг, то есть до 60 % от клинически валидированного уровня.

2. Разработана технологическая схема получения инъекционной формы из пяти операций – ТП 7.1–7.3 и УМО 8.1–8.2 (таблица 17): разведение субстанции S-ECD фосфатно-солевым буфером pH 7,4 до концентрации антигена 20 мкг/мл в водной фазе, асептическое объединение по 0,25 мл каждой фазы, деликатная гомогенизация инверсией при 2–8 °C с отказом от финальной стерилизующей фильтрации для сохранения гранулометрического состава нанокапель. Содержание действующего вещества в опытных образцах составляет 5,0 ± 0,5 мкг белка в дозе 0,5 мл.

3. Установлена спецификация показателей качества готовой инъекционной формы из четырнадцати позиций (таблица 18), включающая водородный показатель от 6,4 до 7,6, извлекаемый объём не менее 0,5 мл, содержание бактериальных эндотоксинов не более 100 ЭЕ в дозе 0,5 мл, отсутствие фазового разделения эмульсии и уровень ингибиции нейтрализующих антител не менее 30 % в суррогатном тесте нейтрализации. Обоснованы условия хранения при температуре от 2 до 8 °C без замораживания и предварительный срок годности 12 месяцев, в том числе исходя из подтверждённой производителем стабильности адъювантной основы не менее 24 месяцев при +4 °C.

4. Получена и охарактеризована коллоидная система доставки антигена на основе хитозана, модифицированного D-маннозой (таблица 19): средний гидродинамический диаметр «пустых» наночастиц 180 ± 12 нм и наночастиц с инкапсулированным RBD 290 ± 18 нм, ζ-потенциал +35 и +30 мВ соответственно, эффективность инкапсуляции RBD 66,8 %. Сканирующая электронная микроскопия подтвердила округлую форму и гладкую поверхность частиц без признаков агрегации (рисунок 8).

5. Интраназальная нановакцина NARUVAX-C19/Nano получена методом контролируемого ионного гелеобразования с последующей стабилизацией лиофилизацией; полный цикл включает стадии ТП 9.1–9.2, ТП 10.1–10.3 и УМО 11.1–11.2 (таблица 20): гелеобразование при pH 4,5–5,0, введение 5 % сахарозы в качестве криопротектора при концентрации наночастиц 1–5 мг/мл, глубокое замораживание при −80 °C со скоростью 0,5–1,0 °C/мин в течение 4 ч, первичная сушка при вакууме 0,05–0,13 мбар и температуре продукта ниже −32 °C в течение 16–24 ч, вторичная сушка при вакууме менее 0,05 мбар и +15 °C в течение 12 ч до остаточной влажности менее 2–3 %. Полученный лиофилизат соответствует требованиям не менее 12 месяцев при температуре от минус 17 до минус 30 °C, не менее 6 месяцев при температуре от 2 до 8 °C и до 7 суток при +22 °C, восстанавливаясь в физиологическом растворе в течение 30 с (таблица 21).

6. Подтверждена совместимость активной фармацевтической субстанции со вспомогательными веществами обеих форм: связывание антигена в наночастицах носит электростатический характер и не сопровождается образованием ковалентных связей, а компоненты наноэмульсионного адъюванта химически инертны по отношению к белку. Профиль примесей

оценён в соответствии с ICH Q6B с разделением на процесс-зависимые и продукт-зависимые. Показано, что на стадии составления дозы в неё входит от 5 до 10 мкл субстанции, что обеспечивает дополнительный клиренс всех привносимых очисткой примесей, а из элементных примесей применимым к процессу является только никель (класс 2A по ICH Q3D) с допустимым соотношением 4 мкг на микрограмм белка.

7. Составлен материальный баланс технологического процесса в соответствии с ОСТ 64-02-003-2002 раздельно для двух производственных линий (таблицы 22–25) при базисе 1 л культуральной жидкости для I этапа и условной серии 1000 доз с загрузкой на 1111 доз – для II этапа. Выход субстанции составляет 1,5–2,0 мг/л для S-ECD и 2,0–2,4 мг/л для RBD. На серию инъекционной формы требуется 5,56 мг субстанции S-ECD, что эквивалентно 2,8–3,7 л культуральной жидкости; на серию интраназальной формы – 8,32 мг субстанции RBD, или 3,5–4,2 л культуральной жидкости, при технологических потерях 2,76 мг неинкапсулированного антигена. Удельная потребность в культуральной жидкости для интраназальной линии на 12–25 % выше и полностью определяется потерями на стадии инкапсуляции.

8. Выполнена оценка материальной себестоимости производства (таблицы 26, 27): 3,32–3,50 долл. США (≈1500–1580 тг) на дозу для инъекционной вакцины NARUVAX-C19 и 1,49–1,65 долл. США (≈675–740 тг) на дозу для интраназальной нановакцины NARUVAX-C19/Nano. В структуре затрат инъекционной формы преобладают адъювант (около 55 %) и первичная упаковка (около 24 %). Определены резервы снижения себестоимости при переходе к опытно-промышленному масштабу: замена хроматографической колонки объёмом 1,0 мл на колонку 50–100 мл сокращает число циклов со 148–222 до 2–4, а повышение эффективности инкапсуляции с 66,8 до 80 % снижает расходный коэффициент по антигену с 1,66 до 1,39 и потребность в культуральной жидкости до 2,9–3,5 л на 1000 доз.

5 Фармакологические исследования

Фармакологические исследования являются ключевым этапом фармацевтической разработки иммунобиологических лекарственных средств и направлены на установление специфической активности, безопасности, переносимости, а также механизмов действия лекарственного средства до начала клинических испытаний. В соответствии с требованиями ГОСТ 33647–2015, ЕАЭС МР 1.3.2.2.11–2021 и международными рекомендациями ICH (S6(R1), M3(R2)), доклиническая фармакологическая оценка вакцинного препарата представляет собой научно обоснованную и регламентированную систему испытаний, обеспечивающую доказательства целесообразности перехода к клиническому этапу.

Завершающим этапом фармацевтической разработки, согласно концепции «встроенного качества» (Quality by Design), является комплексная валидация полученных готовых лекарственных форм.

Данный этап испытаний не преследует самостоятельных медико-физиологических целей, а направлен на технологическую верификацию разработанных препаратов NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano. Оценка параметров безопасности и специфической биологической активности на животных моделях выступает прямым доказательством корректности выбранных технологических режимов.

Современные тенденции в разработке вакцин направлены на создание высокоэффективных, безопасных и технологичных препаратов с использованием рекомбинантных белков, платформ на основе вирусоподобных частиц, а также систем направленной доставки антигенов. В данной работе объектом фармакологического исследования являются два экспериментальных иммунобиологических препарата, разработанных в рамках единой технологии:

NARUVAX-C19, субъединичная вакцина на основе полноразмерного S-белка и рецептор-связывающего домена (RBD) вируса SARS-CoV-2, экспрессированных в системе *baculovirus/insect cell expression system (BEVS)* с использованием клеточной линии *ExpiSf9*™;

NARUVAX-C19/Nano, интраназальная лекарственная форма, содержащая рекомбинантный RBD-белок, инкапсулированный в катионные наночастицы на основе хитозана, модифицированного маннозой, с адъювантным компонентом CpG55.2 (иммуномодулирующий олигонуклеотид), предназначенная для стимуляции как системного, так и мукозального иммунного ответа.

Указанные препараты обладают различными способами доставки, механизмами презентации антигена и, соответственно, требуют дифференцированного подхода к доклинической фармакологической оценке. При этом оба варианта вакцинных формул соответствуют требованиям к иммунобиологическим лекарственным средствам, изложенным в ЕАЭС НД ЛС 1.3.1.0001.15.

Фармакологическая часть доклинической разработки включала исследование специфической активности (в том числе иммуногенности и протективной эффективности), системной и локальной безопасности, а также иммунопатологических реакций на фоне введения вакцины. Исследование

выполнено Испытательным центром НЦЭЛС и МИ МЗ РК в условиях GLP; диссертант участвовал в составлении программы исследования, наработке и передаче опытных серий препарата и анализе первичных данных отчёта. Этико-правовое сопровождение осуществлялось в соответствии с положениями Хельсинкской декларации, нормативами OECD и национальными стандартами. Все протоколы испытаний утверждены Локальной этической комиссией, регистрационные номера представлены в Приложении.

Обоснование выбора моделей животных, дозировок, кратности введения, путей доставки и объёма биоматериала для анализа осуществлялось с учётом рекомендаций EMA/CHMP/IWP/83508/2011, руководства ВОЗ, по доклинической оценке, вакцин (WHO TRS 927, Annex 1), а также фармакопейных требований к доклиническим исследованиям иммунобиологических препаратов. В качестве моделей использовались беспородные мыши, сирийские хомяки, крысы, морские свинки, кролики и макаки-резусы, что обеспечило многоуровневую проверку гипотез о безопасности и специфической активности разрабатываемых препаратов.

Представленные далее разделы включают структурированное описание методологии, дизайна и результатов фармакологических исследований вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano, с интерпретацией данных в контексте нормативных требований к иммунобиологическим лекарственным средствам на этапе доклинической разработки. Проведённые исследования сформировали доказательную базу для последующего обоснования допустимости перехода к I фазе клинических испытаний.

5.1 Фармакологические исследования субъединичной вакцины NARUVAX-C19 на грызунах

Исследование безопасности субъединичной вакцины NARUVAX-C19 на грызунах

Подострая токсичность определена на одном виде мелких лабораторных животных – крысах. Было использовано пять групп крыс (одна контрольная и четыре экспериментальные), которым вводили разные дозы вакцины. Дополнительно была включена группа беременных животных.

Для определения показателей подострой токсичности исследуемая вакцина вводилась экспериментальным животным – крысам массой 180–200 г внутримышечно в различных объемах ежедневно в течение 7 дней с требованиями стандарта GLP РК.

Характеристика исследуемых групп крыс, количество использованных животных, путь, доза и длительность введения, представлена в таблице 29.

Таблица 29 – Характеристика экспериментальных групп при исследовании подострой токсичности

Номер группы	Кол-во животных	Вводимая доза, режим и путь введения	День эвтаназии
Крысы			
№1 Контрольная группа (плацебо)	5♀ 5♂*	Физ. раствор 0,5 мл в/м** однократно, в течение 7 дней	На 8-й день

Продолжение таблицы 29

Номер группы	Кол-во животных	Вводимая доза, режим и путь введения	День эвтаназии
№2 Опытная	5♀ 5♂	Вакцина 0,04 мл ежедневно 7 дней в/м (1 профилактическая доза для крыс)	На 8-й день
№3 Опытная	5♀ 5♂	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней в/м (5-кратная профилактическая доза)	На 8-й день
№4 Опытная	5♀ 5♂	0,4 мл ежедневно в течение 7 дней в/м (10-кратная профилактическая доза)	На 8-й день
№5 Опытная (беременные)	5♀	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней в/м (5-кратная профилактическая доза)	На 8-й день
Примечание: ♀ – самка ♂- самец, **в/м-внутримышечно			

Расчет дозы. Максимальная однократная доза вакцины для человека составляет 0,5 мл (или 0,007 мл/кг при массе тела 70 кг). Эквитерапевтическая доза препарата для крыс составляет 0,007х39/6,5=0,04 мл. На одну крысу массой 200 г требуется 0,04 мл. В исследовании использовались три дозы: максимальная профилактическая, 5-кратная профилактическая и 10-кратная профилактическая, соответственно, 0,04 мл (0,2 мг/кг); 0,2 мл (1,0 мг/кг) и 0,4 мл (2,0 мг/кг).

Животным контрольной группы вводился тем же путем физиологический раствор в аналогичном объеме также в течение 7 дней.

Ежедневно проводилась оценка отклонений в общем состоянии здоровья с регистрацией признаков токсичности, а также потребления корма и воды, внешнего вида, состояния кожного и шерстного покрова, слизистых оболочек, динамики массы тела, поведенческих реакций и двигательной активность.

Проводили отбор образцов крови для определения гематологических и биохимических показателей по окончании эксперимента.

Масса тела регистрировалась при формировании групп животных (за сутки до первого введения вакцины) и далее на второй, пятый и седьмой день эксперимента с записью в протоколе исследования. После окончания эксперимента животные подвергались эвтаназии (декапитация). После эвтаназии животных проводился визуальный осмотр животного на предмет наружных патологических признаков с последующим вскрытием.

Произведен забор внутренних органов печень, почки и легкие для проведения патоморфологических исследований (SOP-GLP-NC-B14).

Внутренние органы крыс (сердце, печень, легкие, селезенка и почки) взвешивались для определения массовых коэффициентов.

Лабораторные исследования проведены после иммунизации, на 8-й день после введения вакцины. Забор крови у животных осуществляли после 14-15-часового голодания.

Результаты исследования подострой токсичности вакцины NARUVAX-C19

При внутримышечном введении крысам вакцины NARUVAX-C19 в соответствующей дозе (таблица 30) общее состояние животных опытных группы визуально не отличалось от контрольной группы. Интенсивность и характер двигательной активности, координация движений, тонус скелетных мышц сохранялись на прежнем уровне в течение всего эксперимента.

Поведенческие реакции, а также реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители были без изменений. Состояние волосяного и кожного покрова было в норме. Результаты токсического влияния вакцины на выживаемость лабораторных крыс в субхроническом эксперименте представлена в таблице 31.

Таблица 30 – Показатели выживаемости животных в эксперименте субхроническая токсичность

Группы экспериментальных животных	Название ЛП, доза, режим и путь введения	Количество павших/ общее количество животных	Смертность (%)
№1 Контрольная	Физ. раствор 0,5 мл в/м* однократно, в течение 7 дней	0/10	0,0
№2 Опытная	Вакцина 0,04 мл ежедневно 7 дней в/м	0/10	0,0
№3 Опытная	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней в/м	0/10	0,0
№4 Опытная	0,4 мл ежедневно в течение 7 дней в/м	0/10	0,0
№5 Опытная (беременные)	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней в/м	0/10	0,0
Примечание: в/м-внутримышечно			

Динамика массы тела животных экспериментальных групп представлена в таблице 31. Результаты исследований показывают прибавку массы тела животных опытных групп в течение всего периода наблюдения. Статистически значимых различий в приросте массы тела по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

Таблица 31 – Динамика массы тела экспериментальных крыс, подострая токсичность

Номер группы	Пол	Динамика массы (г), время после начала опыта			
		Фон (до введения вакцины)	через 24 часа	через5 дней	через7 дней
№1 Контрольная	♀*	183,4 ± 3,5	183,7 ± 3,4	188,3 ± 3,4	193,2 ± 3,4
	♂	185,2 ± 4,4	185,5 ± 4,4	190,4 ± 4,3	194,6 ± 4,0
№2 Опытная	♀	181,6 ± 0,9	181,8 ± 0,9	186,6 ± 0,9	192,1 ± 1,0
	♂	185,1 ± 4,7	185,2 ± 4,6	190,3 ± 4,8	196,0 ± 4,7

Продолжение таблицы 31

Номер группы	Пол	Динамика массы (г), время после начала опыта			
		Фон (до введения вакцины)	через 24 часа	через5 дней	через7 дней
№3 Опытная	♀	184,0 ± 3,7	184,2 ± 3,8	189,0 ± 3,8	194,3 ±3,1
	♂	188,9 ± 4,1	189,0 ± 4,1	193,5 ± 4,1	198,7 ±4,0
№4 Опытная	♀	183,9 ± 3,7	184,2 ± 3,6	189,7 ± 3,5	195,2 ± 3,3
	♂	190,0± 2,5	190,6 ± 2,1	195,5 ± 2,8	200,6 ± 2,7
№5 Опытная (беременные)	♀	229,0 ± 1,9	229,5 ± 2,0	234,6 ± 2,3	239,7 ± 2,1
Примечание: ♀ – самка ♂- самец					

По окончании эксперимента через 7 дней животные всех групп были подвергнуты эвтаназии. Органы животных извлекали, взвешивали и проводили отбор для последующего гистологического исследования.

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между группами не установлено. Шерсть животных имела опрятный вид, была блестящей, без очагов облысения. При осмотре грудной и брюшной полостей нарушений в расположении внутренних органов не отмечалось.

Величина и форма сердца изменений не представляли. Мышца сердца была коричневатой, плотной. Поверхность легких имела бледно-розовую окраску, ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску.

Желудок имел обычную форму и размеры, просвет был заполнен плотным пищевым содержимым. Слизистая тела желудка была бледно-розовой, блестящей, складчатой.

Макроскопические показатели (форма и размеры) печени оставались без изменений. Ткань печени имела коричневатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Поджелудочная железа была бледно-розовой, дольчатой.

Величина и форма почек не отличались от контроля, капсула легко снималась. Поверхность органа была гладкой, однородной коричневато-сероватой окраски. Форма, размеры и плотность надпочечников, яичников или яичек не отличались от нормы.

Селезенка имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию. Оболочки головного мозга были тонкими, прозрачными.

При макроскопическом исследовании плацента имела дисковидную форму без видимых патологических очагов, материнская часть равномерно дольчатая без дефектов, красно-коричневого цвета, пуповина отходит центрально, умеренно извита, патологических очагов не выявлено.

После вскрытия животных внутренние органы всех экспериментальных групп не отличались визуально (рисунок 9).



№1 Контрольная группа (плацебо)



№2 Опытная группа



№3 Опытная группа



№4 Опытная группа



№5 Опытная группа (беременные)

Рисунок 9 – Макроскопическое исследование внутренних органов экспериментальных групп

Для определения массового коэффициента органов проводили взвешивание внутренних органов животных (легкие, печень, селезенка, сердце, почки) и определяли их относительную массу в расчете на 100 г массы тела крыс. В дальнейшем показатели относительной массы внутренних органов крыс экспериментальных групп статистически обрабатывали и сравнивали с таковыми у контрольных животных.

Установлено, что относительная масса взвешенных органов крыс экспериментальных групп не имеют статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой (таблица 32).

Таблица 32 – Массовые коэффициенты (МК) органов у животных при внутримышечном введении вакцины

Орган	Сердце		Печень		Селезенка		Легкие		Почки	
Номер группы	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %
№1 контрольная	1,24 ± 0,04	0,64	11,40 ± 0,16	5,88	1,35 ± 0,08	0,70	3,11 ± 0,05	1,60	2,32 ± 0,03	1,19
№2 опытная	1,36 ± 0,08	0,71	10,62 ± 0,23	5,55	1,41 ± 0,05	0,73	2,63 ± 0,43	1,38	2,54 ± 0,06	1,33
№3 опытная	1,40 ± 0,04	0,72	11,15 ± 0,27	5,72	1,46 ± 0,07	0,75	3,20 ± 0,02	1,64	2,58 ± 0,04	1,32
№4 опытная	1,39 ± 0,01	0,70	11,12 ± 0,45	5,57	1,23 ± 0,09	0,62	3,36 ± 0,06	1,68	2,46 ± 0,04	1,23
№5 опытная (беременные)	1,43 ± 0,05	0,59	11,00± 0,37	4,59	1,38 ± 0,12	0,58	3,39 ± 0,15	1,41	2,62 ± 0,13	1,09

Из таблицы 30 видно, что не установлено значимых различий в массовых коэффициентах внутренних органов экспериментальных животных, что свидетельствует об отсутствии токсического влияние на организм животного.

Эти данные подтверждаются результатами патоморфологических исследований.

Результаты гистологического исследования

Животные были подвергнуты декапитации с применением лабораторной гильотины на восьмой день эксперимента. Кусочки тканей печени, почек, легких, плода фиксировали в нейтральном формалине, затем проводили по спиртам восходящей концентрации и окрашивали гематоксилином и эозином. При микроскопическом исследовании были получены следующие данные.

Контрольная группа. Животным этой группы вводили физиологический раствор 0,5 мл в/м однократно в течение 7 дней.

Гистологическое строение печени характеризовалось наличием долек, в центре которых располагалась центральная вена, с радиарно отходящими гепатоцитами. Они формируют печеночные балки. Между ними находятся кровеносные и желчные капилляры (рисунок 10). На периферии трех долек печени расположена триада, она представлена артерией, веной и желчным сосудом. Гистологическое строение почек и легких не нарушено (рисунки 11,12).

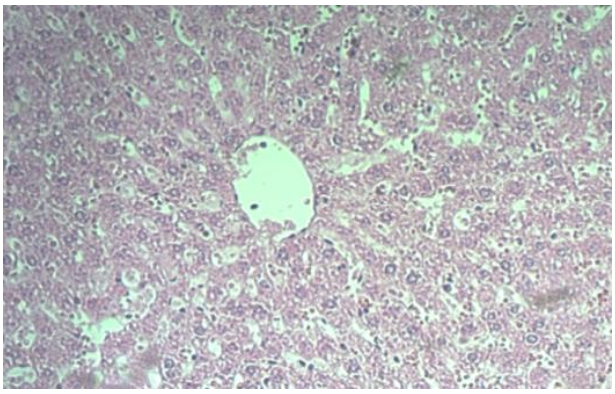


Рисунок 10 – Печеночная ткань здоровой крысы. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

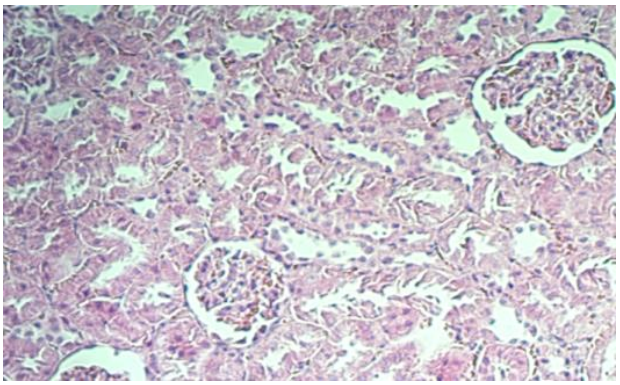


Рисунок 11 – Почечная ткань здоровой крысы. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

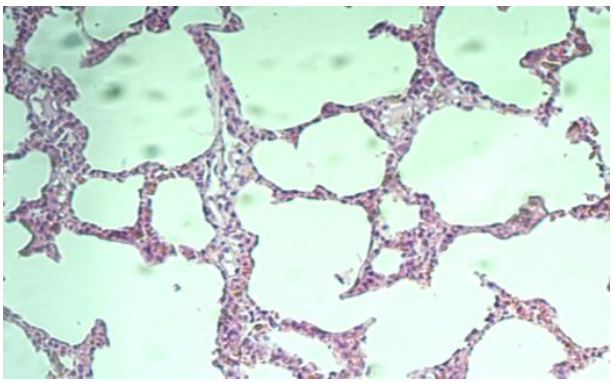


Рисунок 12 – Ткань легких здоровой крысы. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Опытная группа №2. Животным этой экспериментальной группы вводили 0,04 мл вакцины в/м ежедневно 7 дней (1 профилактическая доза для крыс).

Гистологическое строение печени было не нарушено. В отдельных участках наблюдалось расширение синусоидов за счет отека (рисунок 13). Структурное строение почек не нарушено и представлено клубочками, канальцами, стромой с сосудами местами определялись участки с очагами отека (рисунок 14). Гистологическое строение ткани легких не изменено в отдельных участках утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека, полнокровие крупных сосудов легких (рисунок 15).

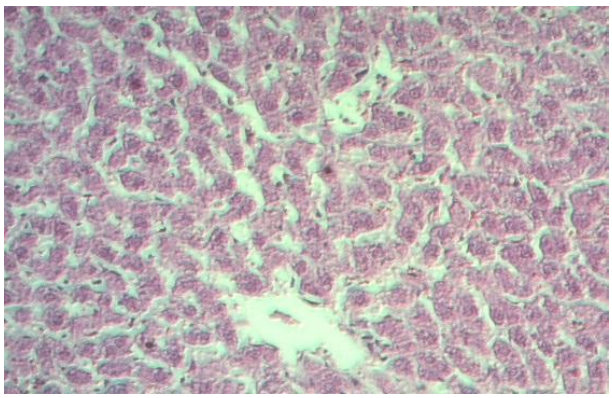


Рисунок 13 – Печень, расширение синусоидов за счет отека. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

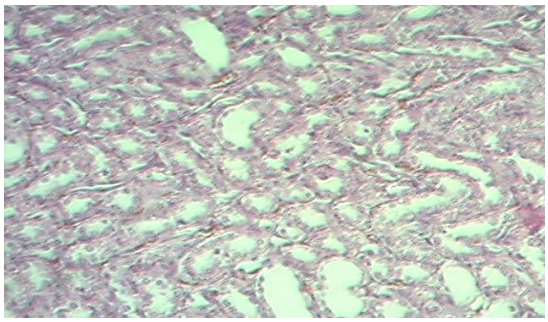


Рисунок 14 – Почка, очаги отека. Окраска гематоксилин эозин Увеличение ×200

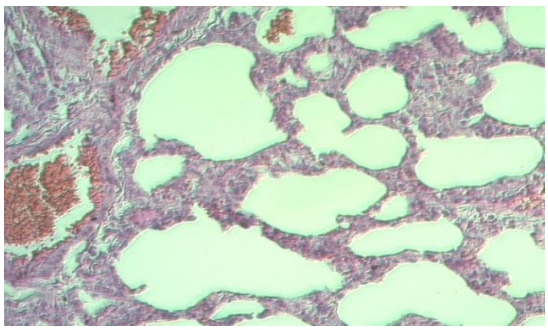


Рисунок 15 – Легкое, полнокровие крупных сосудов с отеком ткани. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Опытная группа №3. Животным этой экспериментальной группы вводили 0,2 мл вакцины в/м ежедневно в течение 7 дней (5 кратное увеличение профилактической дозы).

В печени структура органа сохранялась, в отдельных участках наблюдался отек ткани с полнокровием сосуда (рисунок 16). Гистологическое строение ткани почки сохранено, определялись очаги отека стромы в корковом слое почки, наблюдалось расширение просвета канальца. Картина нефрогидроза (рисунок 17). Строение легких не нарушено, однако наблюдалось очаговое утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека и полнокровных сосудов (рисунок 18).

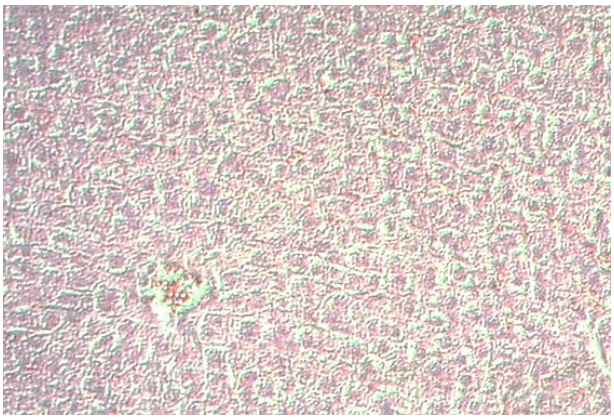


Рисунок 16 – Печень, очаги отека ткани, с полнокровием сосуда. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

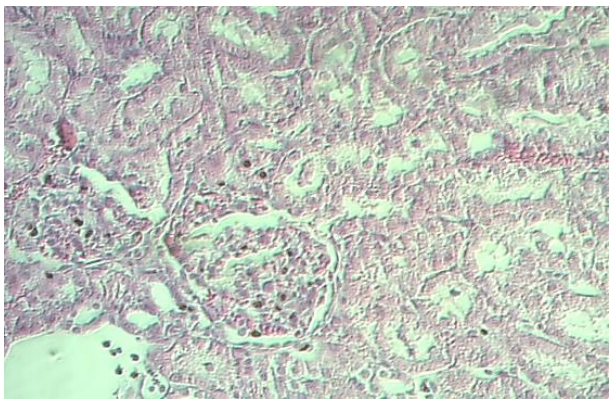


Рисунок 17 – Почка, очаги отека коркового слоя, с расширением просвета канальца. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

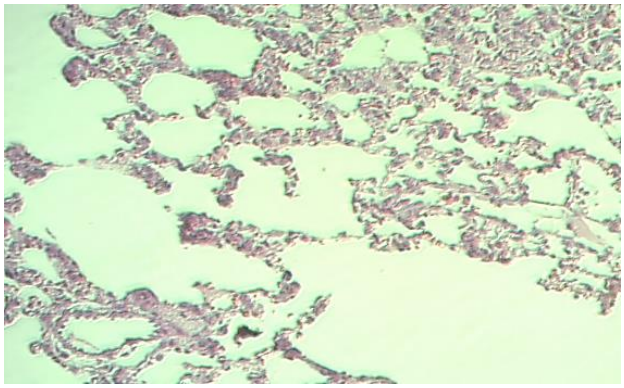


Рисунок 18 – Легкое, утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека и полнокровных сосудов. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Опытная группа №4. Животным этой экспериментальной группы вводили 0,4 мл вакцины в/м (10 кратное увеличение профилактической дозы).

В печени структура органа сохранялась, в отдельных участках наблюдался отек ткани с полнокровием сосуда (рисунок 19). При гистологическом исследовании почки структура органа не изменена, отмечались очаги отека ткани с очагами нефрогидроза (рисунок 20). Ткань легких сохраняла свою гистологическую структуру. Наряду с этим выявлялась картина нарушения кровообращения в виде полнокровия межальвеолярных сосудов с отеком (рисунок 21).

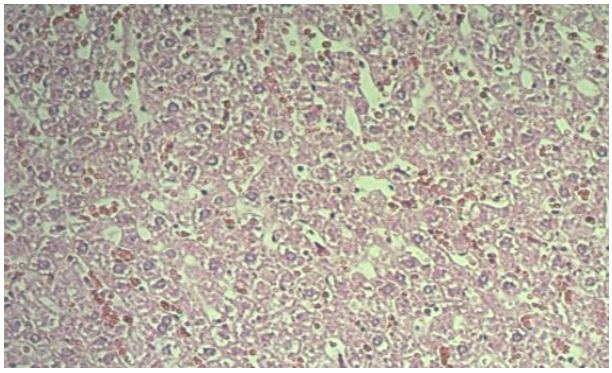


Рисунок 19 – Печень, очажки отека ткани, с полнокровием сосуда. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

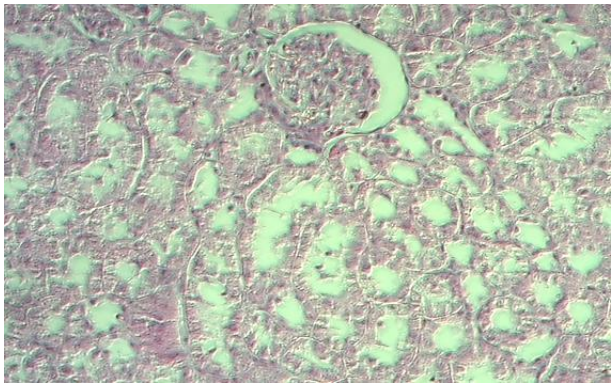


Рисунок 20 – Почка, отек ткани, с картиной нефрогидроза. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

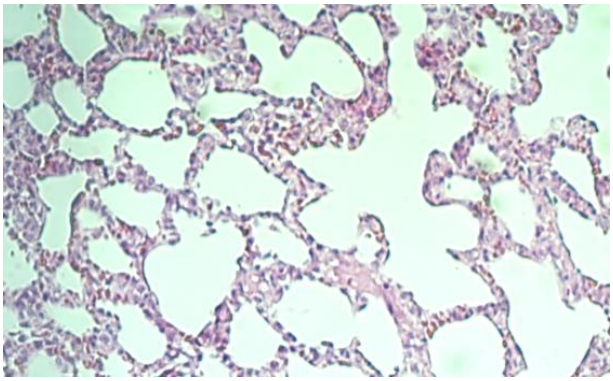


Рисунок 21 – Ткань легкого, полнокровие межальвеолярных сосудов с отеком ткани. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Опытная группа №5 (беременные). Животным этой экспериментальной группы вводили 0,2 мл вакцины в/м ежедневно в течение 7 дней (5 кратное увеличение профилактической дозы).

Гистологическое строение органов сохранялось, однако были выявлены признаки нарушения кровообращения. В ткани элемента плода выявлялись очаговые кровоизлияния (рисунок 22). В эмбриональной ткани печени наблюдался отек с очагами некроза гепатоцитов, которые были представлены аморфными розовыми массами (рисунок 23). Ткань эмбрионального легкого имела тонкие межальвеолярные перегородки, в одном из сосудов определялась плазма крови (рисунок 24).

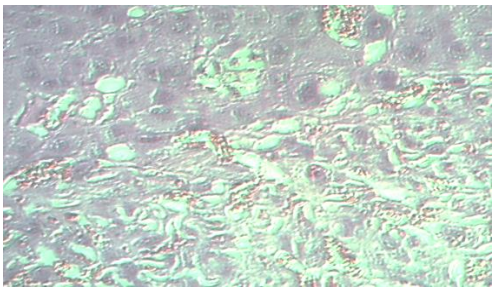


Рисунок 22 – Ткань плода с очаговыми кровоизлияниями. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

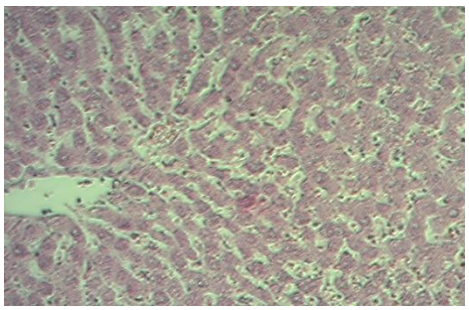


Рисунок 23 – Печень плода, отек ткани с очагами некроза гепатоцитов. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

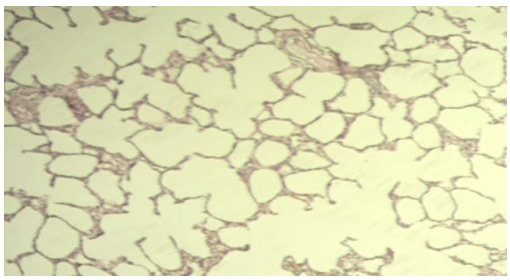


Рисунок 24 – Эмбриональная ткань легких, в просвете сосуда плазма крови. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Таким образом, проведение комплексного морфологического исследования основных и наиболее важных внутренних при оценке подострой токсичности вакцины NARUVAX-C19 позволило сделать заключение, что при введении токсических доз вакцины (0,04 мл, 0,2 мл и 0,4 мл) микроскопические изменения в клетках органов характеризовались небольшим нарушением кровообращения в виде полнокровия сосудов и отеком тканей. Морфологические изменения у беременных крыс при исследовании тканей плода помимо отека тканей и нарушения кровообращения, характеризовались наличием в печени микрофокусов некроза гепатоцитов. Явно выраженных патологических изменений во всех исследуемых органах не обнаружено.

Гематологические и биохимические исследования.

На восьмой день эксперимента подострой токсичности у животных производился забор крови для изучения биохимического и морфологического анализа крови. Полученные результаты представлены в таблицах 31 и 32.

Как видно из таблицы 33 биохимические показатели крови животных всех экспериментальных групп находились в пределах нормы за исключением общего белка для животных группы №4. Для них этот показатель был снижен по сравнению с контролем. По-видимому, это связано с введением десятикратной дозы вакцины 0,4 мл, однако это отличие не является достоверным. При этом смертности животных не наблюдалось.

Уровень глюкозы у подопытных животных всех групп практически не отличался от данных контрольной группы.

Для установления фактора токсического влияния на работу внутренних органов и систем необходимо проведение исследований по оценке отдаленных последствий влияния вакцины на живой организм. Это должно быть принято во внимание при проведении клинических исследований. Остальные биохимические показатели крови были в пределах физиологических норм для всех групп.

При анализе результатов морфологического состава крови экспериментальных крыс было установлено, что все гематологические показатели контрольной и опытной группы находились в пределах физиологической нормы (таблица 34).

Таким образом, морфологический анализ крови животных в подостром эксперименте не выявил изменения в составе периферической крови по

сравнению с контрольной группой. Проведенные исследования показали, что вакцина не оказывает повреждающее действия на систему крови.

Более наглядно сравнительный анализ полученных биохимических показателей крови и гематологических показателей общего анализа крови животных показан на рисунках 25 и 26.

Таблица 33 – Биохимические показатели крови животных (крыс) при изучении подострой токсичности

Показатели биохимического анализа крови	№ группы тест-системы				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
TB	2,00 ± 0,52	1,74 ± 0,43	1,86 ± 0,58	2,14 ± 0,61	1,45 ± 0,07
D	0,16 ± 0,08	0,14 ± 0,05	0,16 ± 0,08	0,22 ± 0,08	0,10 ± 0,00
ALP U/l	378,5 ± 103,0	449,6 ± 117,3	720,8 ± 167,0	565,2 ± 280,4	155,4 ± 63,85
Krea µmol/l	87,50 ± 27,45	76,56 ± 6,10	78,95 ± 8,10	79,24 ± 11,55	69,80 ± 0,14
TP g/l	73,78 ± 7,22	70,02 ± 6,49	67,08 ± 2,29	64,90 ± 3,56	69,10 ± 6,78
U mMol/l	5,42 ± 1,88	6,26 ± 0,98	5,88 ± 0,72	5,98 ± 0,52	5,75 ± 1,20
AST	201,7 ± 66,35	221,9 ± 60,98	229,8 ± 25,70	218,2 ± 44,29	208,1 ± 52,11
ALT	61,40 ± 11,21	67,90 ± 24,00	76,06 ± 22,48	70,42 ± 22,61	71,30 ± 25,17
Gluk mMol/L	8,04 ± 0,79	8,74 ± 0,65	6,96 ± 0,91	7,92 ± 0,81	6,70 ± 0,00

Таблица 34 – Гематологические показатели общего анализа крови животных (крысы) в эксперименте «подострая токсичности»

Показатели исследования гемограммы	Номер группы тест-системы				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
WBC	5,28 ± 2,73	5,34 ± 3,63	6,38 ± 2,48	5,10 ± 0,97	3,50 ± 2,4
LYM	90,78 ± 2,23	89,00 ± 2,74	91,58 ± 1,20	93,02 ± 1,97	87,60 ± 2,40
MID	7,22 ± 2,26	8,78 ± 2,71	6,36 ± 0,55	5,62 ± 1,72	9,55 ± 2,75
RBC	6,75 ± 0,54	6,62 ± 0,83	6,64 ± 0,58	6,75 ± 0,69	5,85 ± 0,27
HGB	138,6 ± 11,28	142,6 ± 14,43	137,2 ± 5,40	138,6 ± 7,86	126,5 ± 0,70
HCT	40,50 ± 2,61	41,80 ± 6,00	41,08 ± 4,58	43,50 ± 2,26	34,20 ± 1,13
PLT	496,6 ± 160,1	582,4 ± 179,1	517,6 ± 154,7	421,0 ± 86,57	569,0 ± 96,17
NEUT	2,00 ± 0,24	2,22 ± 0,60	1,95 ± 0,77	1,36 ± 0,32	2,85 ± 0,35
СОЭ	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,20 ± 0,44	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

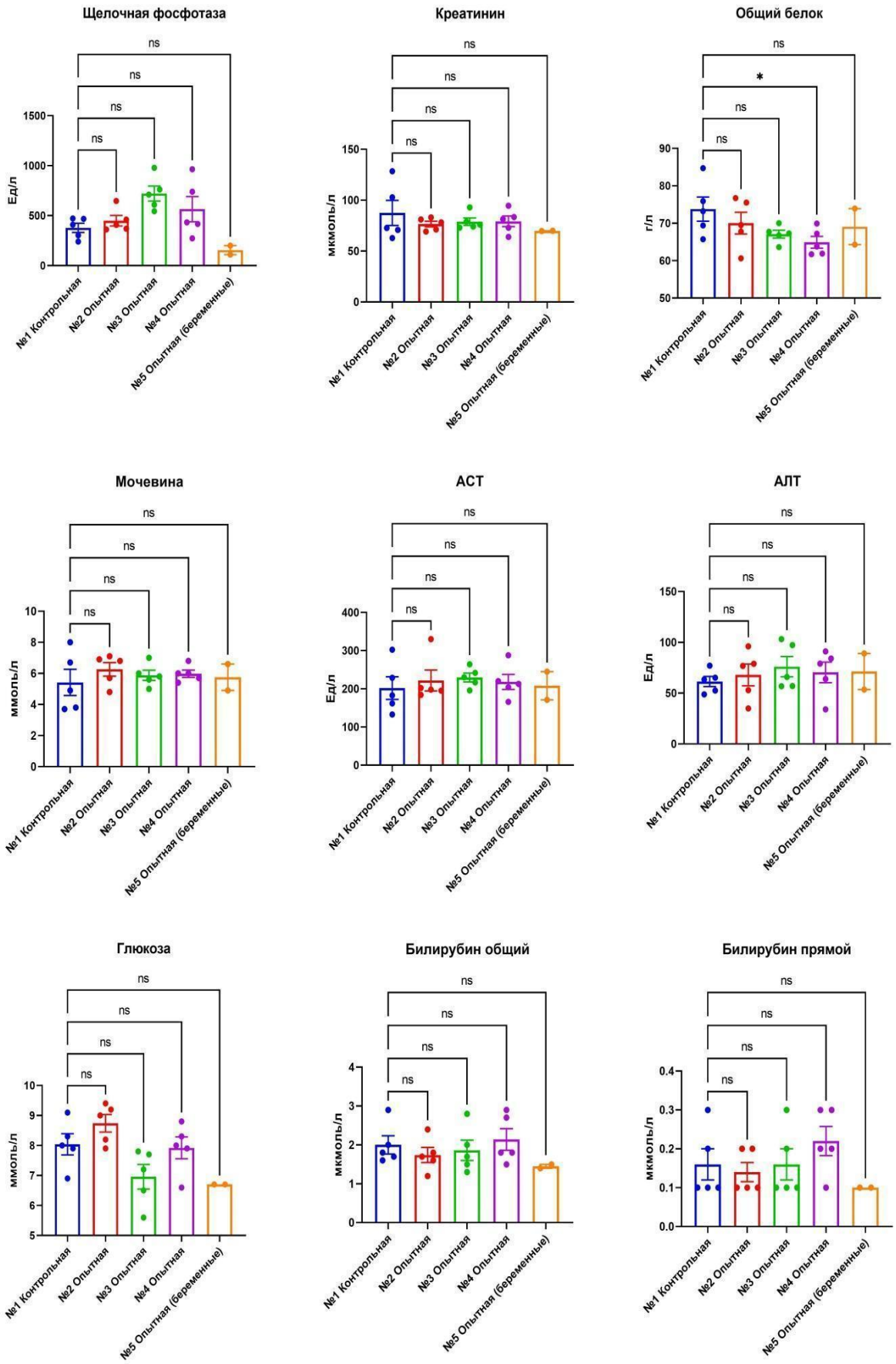


Рисунок 25 – Биохимические показатели крови животных (крыс) при изучении подострой токсичности

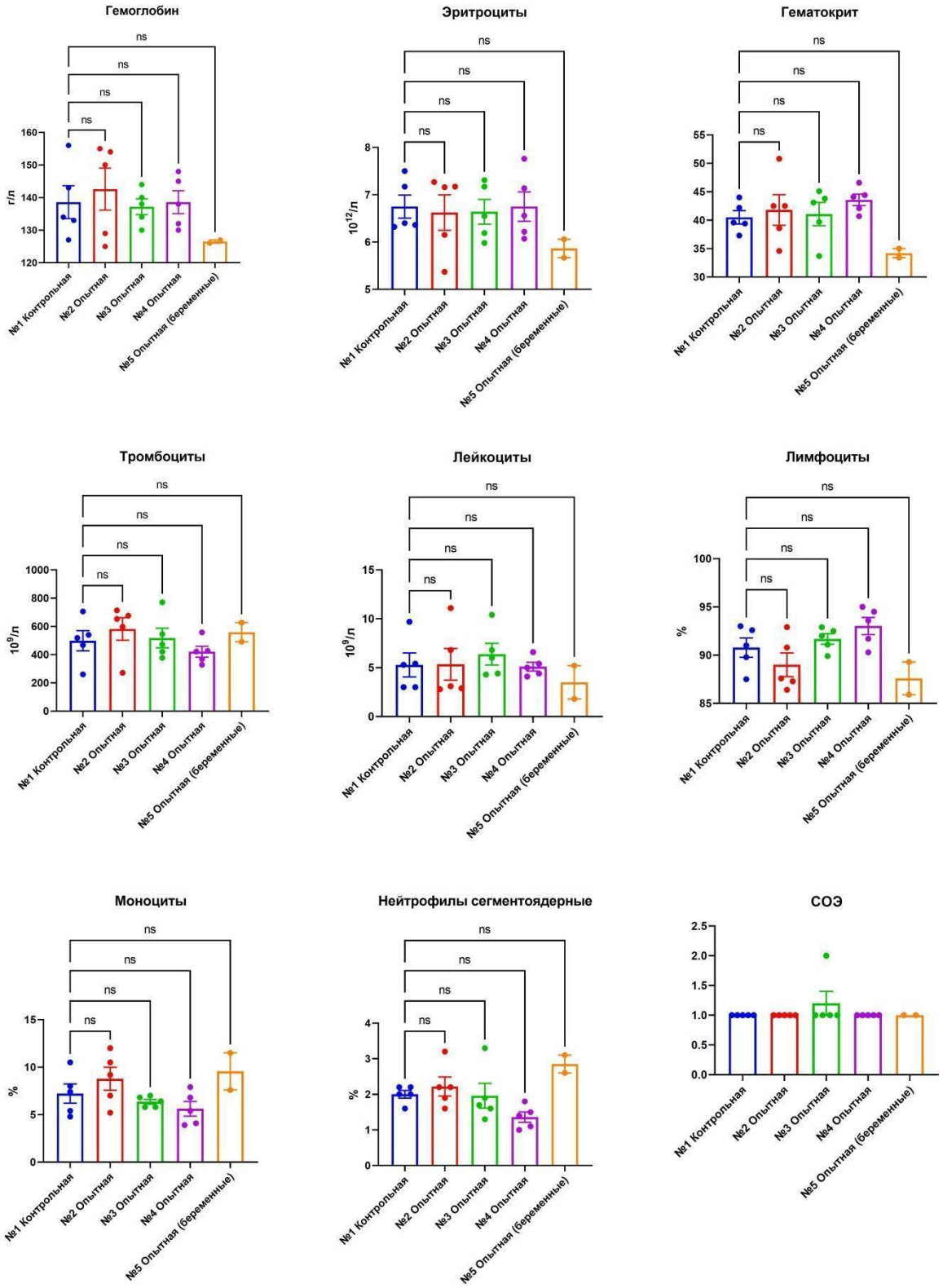


Рисунок 26 – Гематологические показатели общего анализа крови животных (крыс) при изучении подострой токсичности

Аллергенность

Исследование аллергизирующих свойств иммунобиологического препарата NARUVAX-C19 вакцина субъединичная адъювантированная для

профилактики COVID-19 проведено на двух видах лабораторных животных (мыши и морские свинки). Дополнительно была включена группа беременных животных. В эксперимент включены здоровые, половозрелые особи обоего пола. Разброс по исходной массе не превышал 10 %.

Результаты общей анафилаксии

При оценке реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактическая реакция) на морских свинках в опытных группах, сенсибилизированных введением вакцины, не было выявлено проявлений реакции анафилактического шока. Индекс по Weigle для морских свинок после сенсибилизации вакциной в дозах 0,05 мл и 0,08 мл, а также в контрольной группе, был равен нулю для всех групп. На основе этого был сделан вывод, что вакцина не обладает анафилактогенной активностью и не вызывает гиперчувствительности немедленного типа в реакции общей анафилаксии.

Результаты ГЗТ

Установлено, что индекс отека лапки у животных в опытных и контрольных группах не отличался между собой, что свидетельствует об отсутствии проявления аллергической реакции замедленного типа.

В ходе комплексного фармакологического скрининга внутримышечной адъювантированной вакцины NARUVAX-C19 доказан ее высокий профиль системной безопасности. Установлено отсутствие острой токсичности при однократном парентеральном введении предельных доз (25,0 мг/кг для мышей и крыс, что эквивалентно 50 человеческим дозам), при этом признаков системной интоксикации не наблюдалось.

Многократное (в течение семи дней) субхроническое внутримышечное введение препарата в дозах до в дозах до 2,0 мл/кг показало отличную системную переносимость: вакцина не вызывает дистрофических, склеротических или воспалительных процессов во внутренних органах, а также не оказывает негативного влияния на гематологические и биохимические показатели крови.

Доказана полная ареактогенность препарата в тестах на аллергизирующую активность: внутримышечная форма с масляным адъювантом не вызывает гиперчувствительности немедленного типа (индекс Weigle равен нулю) и гиперчувствительности замедленного типа. Кроме того, подтверждено отсутствие токсического воздействия на организм беременных крыс и развитие плода.

5.2 Исследование безопасности субъединичной вакцины NARUVAX-C19 на макаках

Исследование выполнено ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (г. Сочи, Российская Федерация) в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики. Диссертант обеспечивал наработку и контроль качества антигена и является первым автором публикации по результатам исследования.

Данные клинического осмотра

Ежедневно, на протяжении всего эксперимента животные находились под наблюдением с оценкой клинического статуса и симптомов интоксикации по

следующим критериям: внешний вид, состояние шерстного покрова, состояние глаз, состояние носа/дыхание, характер стула, аппетит, окраска слизистых оболочек, положение тела животного, поведение и координация движений, потребление пищи за сутки. Особое внимание уделяли поведенческим реакциям животных, как основному показателю, отражающему состояние нервной системы.

В течение эксперимента отклонений в клиническом статусе животных ни в одной из экспериментальных групп выявлено не было.

Животные оставались активными, отклонений в потреблении корма также не было зафиксировано.

Внешняя оценка места введения препарата

В месте введения препарата ни у одной из обезьян как опытных, так и контрольной групп признаков покраснения, отека на протяжении всего срока наблюдения выявлено не было.

Влияние на динамику массы тела

В динамике – до начала эксперимента (фон), на 7-й, 14-й, 28-й дни – животных взвешивали.

Данные массы тела экспериментальных животных в динамике, а также результаты статистической обработки представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Масса тела экспериментальных животных в динамике

ИИН обезьяны, пол	Группа	Масса тела экспериментальных животных в динамике, г				
		фон	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
37672♂	I, плацебо	9 950	9 520	9340	9 590	9 470
37848♂		11 220	10 900	10710	11 180	10 800
37779♂		7 810	7 910	7850	8 080	8 050
37635♂	II, 5,0 мкг Спайк белка в 0,5 мл	9 460	8 520	8310	8 270	8 170
38355♂	II, 5,0 мкг Спайк белка в 0,5 мл	12 610	12 060	11660	11 380	10 920
37608♂		7 920	7 710	7570	7 640	7 650
38354♂	III, 25мкг Спайк белка в 0,5 мл	10 340	10 200	10140	10 020	10 000
38376♂	III, 25мкг Спайк белка в 0,5 мл	10 940	10 750	10610	10 640	10 530
38957♂		8 230	8 170	7920	7 950	8 010

На рисунке 27 показана динамика изменения веса обезьян по группам. Как видно из представленных данных, во всех группах происходило снижение веса животных и динамика изменения среднего веса по группам была сходной. Не было найдено достоверных отличий между массой тела экспериментальных животных по группам. Коэффициенты корреляции между группой плацебо и обеими экспериментальными группами были невысокими, однако, коэффициент корреляции между группами 2 и 3 был очень высок (0,98), что

говорит о высокой схожести в динамике изменений среднего веса и отсутствии зависимости от дозы препарата.

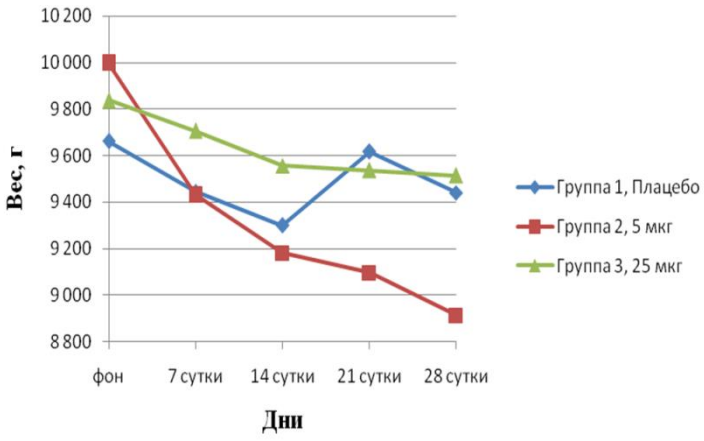


Рисунок 27 – Динамика изменений среднего веса обезьян по группам

Влияние на температуру тела

Термометрию экспериментальным животным проводили в течение 7 дней после каждой инъекции (таблица 36).

Таблица 36 – Результаты термометрии экспериментальных животных в динамике

ИИН обезьяны, пол	Группа	Термометрия экспериментальных животных, t^0C в динамике (дни)															
		Дни (до и после 1 введения)								Дни (до и после 2 введения)							
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
37672♂	I, плацебо	39,0	38,7	38,4	39,0	38,2	38,8	38,6	38,8	39,0	38,5	38,3	38,8	38,8	38,1	38,8	39,0
37848♂		39,3	38,8	38,3	39,1	38,5	38,6	38,9	38,9	39,3	38,1	38,8	38,9	38,6	38,6	38,4	38,7
37779♂		39,4	38,8	38,6	39,2	38,5	38,7	38,8	39,4	39,6	38,4	38,8	38,9	39,1	38,7	38,7	39,0
37635♂	II, 5,0 мкг Спайк белка в 0,5 мл	39,8	38,8	38,8	39,4	38,5	38,6	38,9	39,5	40,3	38,6	38,6	39,0	38,9	39,1	39,1	39,6
38355♂		39,0	38,5	38,6	38,9	38,3	38,6	39,1	39,3	39,7	37,9	38,6	38,8	38,2	38,8	39,0	39,0
37608♂		39,3	38,9	38,5	39,1	38,2	38,7	38,8	39,5	40,0	37,8	38,7	38,9	39,1	38,5	38,5	39,8
38354♂	III, 25мкг Спайк белка в 0,5 мл	39,4	38,8	38,6	39,1	39,2	38,8	39,1	39,8	39,9	38,8	38,9	39,1	39,2	38,9	38,8	39,6
38376♂		39,0	38,8	38,5	38,7	38,7	38,7	38,7	39,1	39,3	38,3	38,8	38,5	38,4	38,5	38,7	39,8
38957♂		38,2	38,9	38,6	39,0	38,6	38,8	38,7	39,2	39,4	38,7	38,7	38,6	38,9	39,1	38,6	39,2

На рисунке 28 показана динамика изменения средней температуры тела экспериментальных животных по группам. Как видно из представленных данных, во всех группах обезьян происходили незначительные колебания средних температур тела животных (в пределах 0,9^{o}C) и динамика этих изменения по группам была сходной. Не было выявлено достоверных отличий в изменениях температур тела между группами животных. Коэффициенты корреляции между группой плацебо и обеими экспериментальными группами были достаточно высоки:

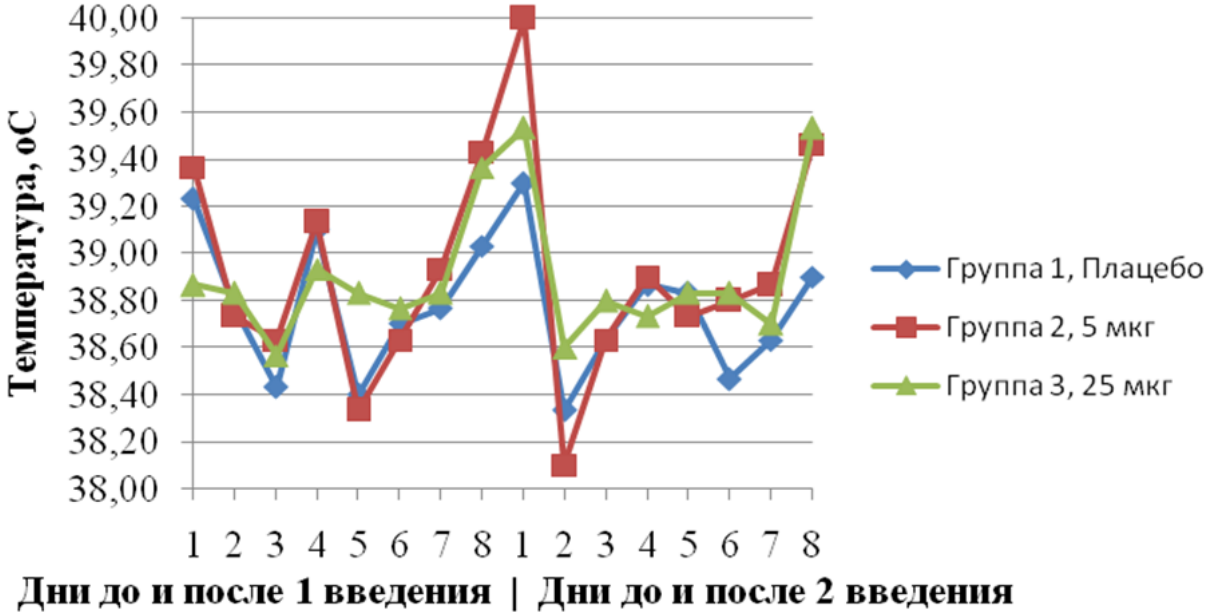


Рисунок 28 – Динамика изменений средней температуры тела обезьян по группам

Влияние на гематологические показатели

Гематологический анализ проводили на 7-й и 21-й дни после введения объекта испытаний.

В таблицах 37–39 представлены результаты гематологического анализа в динамике.

Таблица 37 – Гематологические показатели экспериментальных животных группы № 1, плацебо

ИИН	Показатели гематологического анализа													СОЭ, мм/ч (1 – 5)
	Дни забора крови	Клинический анализ крови							Лейкоцитарная формула, %					
		RBC, × 10^{12}/л (5,0–6,2)	MCV, фл (52–97)	Hgb, г/л (110–145)	MCH, пг (18,0 – 33,0)	Hct (26,0–45,0)	Plt, × 10^{9}/л (200–600)	WBC, × 10^{9}/л (5,5–13)	MO (1–5)	LY (25–55)	NE (35–65)	EO (1–5)	BA (0–2)	
37672	8 день	5,97	72,0	136	22,8	43,0	203	10,7	5,4	30,8	61,4	1,9	0,5	1
	22 день	6,22	72,8	141	22,7	45,3	272	8,9	5,9	43,1	49,4	1,1	0,5	1
37848	8 день	5,58	71,5	126	22,6	39,9	237	19,1	6,9	31,0	60,7	0,2	1,2	2
	22 день	5,89	71,5	133	22,6	42,1	295	9,3	3,5	64,1	31,2	0,4	0,8	1
37779	8 день	6,08	70,9	135	22,2	43,1	396	11,8	2,4	39,6	57,1	0,2	0,7	1
	22 день	5,93	71,7	133	22,4	42,5	383	9,0	4,2	47,5	47,5	0	0,8	1

Таблица 38 – Гематологические показатели экспериментальных животных группы № 2, 5 мкг Спайк-белка в 0,5 мл

ИИН	Показатели гематологического анализа													СОЭ, мм/ч (1 – 5)
	Дни забора крови	Клинический анализ крови							Лейкоцитарная формула, %					
		RBC, × 10^{12}/л (5,0–6,2)	MCV, фл (52–97)	Hgb, г/л (110–145)	MCH, пг (18,0 – 33,0)	Hct (26,0–45,0)	Plt, × 10^{9}/л (200–600)	WBC, × 10^{9}/л (5,5–13)	MO (1–5)	LY (25–55)	NE (35–65)	EO (1–5)	BA (0–2)	
37635	8 день	6,38	69,3	141	22,1	44,2	286	10,0	3,4	51,9	43,4	0,8	0,5	1
	22 день	6,24	69,9	136	21,8	43,6	329	9,7	3,0	51,0	44,8	0,6	0,6	1
38355	8 день	5,75	77,0	140	24,3	44,3	370	14,4	8,3	31,8	59,0	0,5	0,4	2
	22 день	5,02	76,5	122	24,3	38,4	464	13,7	7,7	32,5	58,9	0,2	0,7	1
37608	8 день	6,30	74,8	148	23,5	47,1	410	9,4	2,5	36,4	59,6	0,7	0,8	2
	22 день	5,84	74,1	138	23,6	43,3	425	8,0	3,1	43,5	52,0	0	1,4	1

Таблица 39 – Гематологические показатели экспериментальных животных группы № 3, 25 мкг Спайк-белка в 0,5 мл

ИИН	Показатели гематологического анализа													
	Дни забора крови	Клинический анализ крови							Лейкоцитарная формула, %					СОЭ, мм/ч (1 – 5)
		RBC, × 10^{12}/л (5,0–6,2)	MCV, фл (52–97)	Hgb, г/л (110–145)	MCH, пг (18,0 – 33,0)	Hct (26,0–45,0)	Plt, × 10^{9}/л (200–600)	WBC, × 10^{9}/л (5,5–13)	MO (1–5)	LY (25–55)	NE (35–65)	EO (1–5)	BA (0–2)	
38354	8 день	5,89	72,7	138	23,4	42,8	277	7,4	8,1	41,6	49,0	0,4	0,9	1
	22 день	5,82	72,9	134	23,0	42,4	218	7,7	6,9	38,5	53,4	0,4	0,8	1
38376	8 день	6,34	74,1	143	22,6	47,0	212	8,0	7,7	28,4	62,2	0,7	1,0	1
	22 день	6,33	74,4	144	22,7	47,1	268	7,8	7,9	30,8	59,8	0,2	1,3	1
38957	8 день	5,12	69,5	110	21,5	35,6	317	7,8	5,3	27,5	65,6	0,5	1,1	2
	22 день	5,45	71,2	121	22,2	38,8	305	7,3	6,7	37,8	53,2	0,9	1,4	1

В таблице 40 показана динамика изменения гематологических показателей экспериментальных животных по группам. Как видно из представленных данных, введение препарата в обеих дозах не приводило к изменениям гематологических параметров, и не было найдено достоверных отличий в результатах измерений между группой плацебо и экспериментальными группами, а также между группами обезьян, получивших разные дозы препарата.

Таблица 40 – Динамика изменения гематологических показателей обезьян по группам

Группа	Дата	Параметр	Показатели												
			Клинический анализ крови							Лейкоцитарная формула, %					СОЭ
			RBC× 10^{12}/л	MCV, фл	Hgb, г/л	MCH, пг	Hct	Plt, 10^{9}/л	WBC, 10^{9}/л	MO	LY	NE	EO	BA	
Группа 1, Плацебо	8 день	M	5,88	71,47	132,3	22,53	42,00	278,7	13,87	4,90	33,80	59,73	0,77	0,80	1,33
		SD	0,26	0,55	5,51	0,31	1,82	103,0	4,57	2,29	5,02	2,31	0,98	0,36	0,58
	22 день	M	6,01	72,00	135,7	22,57	43,30	316,7	9,07	4,53	51,57	42,70	0,50	0,70	1,00
		SD	0,18	0,70	4,62	0,15	1,74	58,59	0,21	1,23	11,07	10,00	0,56	0,17	0,00

Продолжение таблицы 40

Группа	Дата	Параметр	Показатели												
			Клинический анализ крови							Лейкоцитарная формула, %					СОЭ
			RBC× 10^{12}/л	MCV, фл	Hgb, г/л	MCH, пг	Hct	Plt, 10^9/л	WBC, 10^9/л	MO	LY	NE	EO	BA	
Группа 2, 5 мкг	8 день	M	6,14	73,70	143,0	23,30	45,20	355,3	11,27	4,73	40,03	54,00	0,67	0,57	1,67
		SD	0,34	3,97	4,36	1,11	1,65	63,29	2,73	3,12	10,53	9,18	0,15	0,21	0,58
		T тест Плацебо/День	0,35	0,39	0,06	0,31	0,09	0,33	0,44	0,94	0,41	0,35	0,87	0,39	0,52
	22 день	M	5,70	73,50	132,0	23,23	41,77	406,0	10,47	4,60	42,33	51,90	0,27	0,90	1,00
		SD	0,62	3,34	8,72	1,29	2,92	69,48	2,93	2,69	9,31	7,05	0,31	0,44	0,00
		T тест Плацебо/День	0,45	0,49	0,55	0,42	0,48	0,16	0,45	0,97	0,33	0,26	0,56	0,50	1
		T тест 8 день/22 день	0,34	0,95	0,12	0,95	0,15	0,40	0,75	0,96	0,79	0,77	0,11	0,30	0,12
Группа 3, 25 мкг	8 день	M	5,78	72,10	130,33	22,50	41,80	268,7	7,73	7,03	32,50	58,93	0,53	1,00	1,33
		SD	0,62	2,36	17,79	0,95	5,77	52,99	0,31	1,51	7,89	8,77	0,15	0,10	0,58
		T тест Плацебо/День	0,82	0,67	0,86	0,96	0,96	0,89	0,08	0,25	0,82	0,89	0,70	0,41	1,00
		T тест 5 мкг/25 мкг	0,57	0,95	0,64	0,91	0,69	0,35	0,00	0,09	0,07	0,10	0,93	0,06	0,37

Продолжение таблицы 40

Группа	Дата	Параметр	Показатели													
			Клинический анализ крови							Лейкоцитарная формула, %					СОЭ
			RBC× 10^{12}/л	MCV, фл	Hgb, г/л	MCH, пг	Hct	Plt, 10^9/л	WBC, 10^9/л	MO	LY	NE	EO	BA	
Группа 3, 25 мкг	22 день	M	5,87	72,83	133,00	22,63	42,77	263,67	7,60	7,17	35,70	55,47	0,50	1,17	1,00
		SD	0,44	1,60	11,53	0,40	4,16	43,66	0,26	0,64	4,26	3,75	0,36	0,32	0,00
		T тест Плацебо/День	0,62	0,46	0,73	0,80	0,85	0,28	0,00	0,03	0,08	0,11	1,00	0,09	1
		T тест 8 день/22 день	0,86	0,68	0,84	0,83	0,83	0,91	0,60	0,90	0,57	0,56	0,89	0,44	0,37
		T тест 5 мкг/25 мкг	0,72	0,77	0,91	0,48	0,75	0,04	0,17	0,18	0,32	0,48	0,44	0,44	1

Данные биохимического анализа

Биохимический анализ проводили на 7-й и 21-й дни после введения объекта испытаний.

В таблицах 41–43 представлены результаты биохимического анализа в динамике.

Таблица 41 – Показатели биохимического анализа, группа 1 (плацебо)

№ обезьяны	Срок эксперимента	GLU (3,9–6,1) ммоль/л	ALP (98–300) Ед/л	ALT (0–40) Ед/л	AST (0–40) Ед/л	ALT / AST (1,0–1,2)	LDH (240–480) Ед/л	TB (2–20) ммоль/л	UREA (2,5–7,5) ммоль/л	CRE (53–115) ммоль/л	CHOL (3,6–5,5) ммоль/л	TG (0,3–1,85) ммоль/л	TP (60–85) г/л	ALB (28–54) г/л	GLB (0–45) г/л	ALB/GLB (0–10)	K (3,0–6,0) ммоль/л	Na (100–150) ммоль/л
37672	8-й день	6,3	207	18	30	0,6	553	5,6	6,9	139	2,22	1,02	67	38	29	1,31	3,8	143
	22-й день	4,1	311	23	32	0,7	478	5,4	6,8	158	1,90	0,83	88	29	59	0,49	4,5	142
37848	8-й день	6,2	192	44	28	1,6	588	7,2	7,2	135	3,52	0,86	80	41	39	1,05	3,6	141
	22-й день	3,9	234	38	29	1,3	533	5,5	7,1	144	2,47	1,01	66	29	37	0,78	4,2	139
37779	8-й день	4,5	231	52	47	1,1	723	6,2	7,8	131	3,10	0,95	76	37	39	0,95	4,7	146
	22-й день	4,8	246	33	36	0,9	704	4,2	7,3	123	3,01	1,01	73	29	44	0,66	4,1	144

Таблица 42 – Показатели биохимического анализа, группа 2 (5,0 мкг Спайк белка в 0,5 мл)

№ обезьяны	Срок эксперимента	GLU (3,9–6,1) ммоль/л	ALP (98–300) Ед/л	ALT (0–40) Ед/л	AST (0–40) Ед/л	ALT / AST (1,0–1,2)	LDH (240–480) Ед/л	TB (2–20) ммоль/л	UREA (2,5–7,5) ммоль/л	CRE (53–115) ммоль/л	CHOL (3,6–5,5) ммоль/л	TG (0,3–1,85) ммоль/л	TP (60–85) г/л	ALB (28–54) г/л	GLB (0–45) г/л	ALB/GLB (0–10)	K (3,0–6,0) ммоль/л	Na (100–150) ммоль/л
37635	8-й день	4,6	255	44	30	1,5	538	7,2	8,1	148	2,81	0,97	72	34	38	0,89	3,2	141
	22-й день	4,6	219	49	32	1,5	597	7,1	8,1	144	2,29	1,15	77	33	44	0,75	3,3	129
38355	8-й день	4,1	213	37	30	1,2	644	7,1	8,0	154	1,78	0,92	69	32	37	0,86	5,8	146
	22-й день	2,0	253	33	32	1,0	651	8,4	8,5	153	1,80	1,97	69	36	33	1,09	4,7	144
37608	8-й день	3,7	131	41	37	1,1	543	5,7	8,4	155	1,64	0,77	61	36	25	1,44	4,1	135
	22-й день	4,2	171	53	36	1,5	522	4,5	8,6	127	2,91	0,93	67	32	35	0,91	3,8	147

Таблица 43 – Показатели биохимического анализа, группа 3 (25,0 мкг Спайк белка в 0,5 мл)

№ обезьяны	Срок эксперимента	GLU (3,9–6,1) ммоль/л	ALP (98–300) Ед/л	ALT (0–40) Ед/л	AST (0–40) Ед/л	ALT / AST (1,0–1,2)	LDH (240–480) Ед/л	TB (2–20) ммоль/л	UREA (2,5–7,5) ммоль/л	CRE (53–115) ммоль/л	CHOL (3,6–5,5) ммоль/л	TG (0,3–1,85) ммоль/л	TP (60–85) г/л	ALB (28–54) г/л	GLB (0–45) г/л	ALB/GLB (0–10)	K (3,0–6,0) ммоль/л	Na (100–150) ммоль/л
38354	8-й день	4,4	187	27	26	1,0	504	6,5	8,5	167	3,10	0,79	74	35	39	0,90	3,7	146
	22-й день	6,1	178	24	29	0,8	573	8,9	8,6	157	3,16	3,46	76	33	43	0,77	4,7	140
38376	8-й день	4,2	328	56	27	2,1	364	7,7	8,7	163	3,35	0,53	81	37	44	0,84	3,5	144
	22-й день	4,5	355	108	62	1,7	475	7,6	8,7	167	2,62	0,64	69	30	39	0,77	4,2	147
38957	8-й день	4,7	199	29	34	0,9	558	7,2	9,5	151	2,15	1,14	77	38	39	0,97	4,1	140
	22-й день	6,4	212	30	25	1,2	436	5,1	9,1	150	2,45	0,81	80	36	44	0,82	4,5	144

В таблице 44 показана динамика изменения биохимических показателей экспериментальных животных по группам. Введение препарата приводило к повышению уровней мочевины и креатинина в группах 2 и 3 на 8 день, и мочевины – на 22 день после введения препарата. При этом эти изменения зависели от дозы и были более выражены в группе 3, получившей 25 мкг. Однако, следует отметить, что эти изменения хотя и были достоверны, но значения параметров, тем не менее, находились в пределах физиологических норм для обезьян. Отдельные изменения в содержании альбумина и калия не носили системного характера и, по-видимому, были следствием вариабельности физиологических показателей животных.

Таблица 44 – Динамика изменения биохимических показателей обезьян по группам

Группа	Дата	Параметр	Показатели															
			GLU	ALP	ALT	AST	ALT / AST	LDH	TB	UREA	CRE	CHOL	TG	TP	ALB	GLB	ALB/ GLB	K	Na
Группа 1, Плацебо	8 день	M	5,67	210,00	38,00	35,00	1,10	621,33	6,33	7,30	135,00	2,95	0,94	74,33	38,67	35,67	1,10	4,03	143,33
		SD	1,01	19,67	17,78	10,44	0,50	89,77	0,81	0,46	4,00	0,66	0,08	6,66	2,08	5,77	0,19	0,59	2,52
	22 день	M	4,27	263,67	31,33	32,33	0,97	571,67	5,03	7,07	141,67	2,46	0,95	75,67	29,00	46,67	0,64	4,27	141,67
		SD	0,47	41,43	7,64	3,51	0,31	117,86	0,72	0,25	17,62	0,56	0,10	11,24	0,00	11,24	0,15	0,21	2,52
Группа 2, 5 мкг	8 день	M	4,13	199,67	40,67	32,33	1,27	575,00	6,67	8,17	152,33	2,08	0,89	67,33	34,00	33,33	1,06	4,37	140,67
		SD	0,45	63,07	3,51	4,04	0,21	59,81	0,84	0,21	3,79	0,64	0,10	5,69	2,00	7,23	0,33	1,32	5,51
Группа 2, 5 мкг	8 день	T тест Плацебо/День	0,07	0,80	0,81	0,70	0,62	0,50	0,65	0,04	0,006	0,18	0,50	0,24	0,05	0,68	0,86	0,71	0,49
	22 день	M	3,60	214,33	45,00	33,33	1,33	590,00	6,67	8,40	141,33	2,33	1,35	71,00	33,67	37,33	0,92	3,93	140,00
		SD	1,40	41,20	10,58	2,31	0,29	64,78	1,99	0,26	13,20	0,56	0,55	5,29	2,08	5,86	0,17	0,71	9,64
		T тест Плацебо/День	0,48	0,22	0,14	0,70	0,21	0,82	0,25	0,003	0,98	0,79	0,28	0,55	0,02	0,27	0,10	0,48	0,79
		T тест 8 день/22 день	0,56	0,75	0,54	0,73	0,76	0,78	1,00	0,30	0,24	0,63	0,22	0,46	0,85	0,50	0,53	0,64	0,92
Группа 3, 25 мкг	8 день	M	4,43	238,00	37,33	29,00	1,33	475,33	7,13	8,90	160,33	2,87	0,82	77,33	36,67	40,67	0,90	3,77	143,33
		SD	0,25	78,17	16,20	4,36	0,67	100,13	0,60	0,53	8,33	0,63	0,31	3,51	1,53	2,89	0,07	0,31	3,06
		T тест Плацебо/День	0,11	0,58	0,96	0,41	0,65	0,13	0,24	0,02	0,009	0,89	0,54	0,53	0,25	0,25	0,15	0,52	1,00
		T тест 5 мкг/25 мкг	0,37	0,54	0,75	0,39	0,88	0,21	0,48	0,09	0,20	0,20	0,74	0,06	0,14	0,18	0,45	0,49	0,50

Продолжение таблицы 44

Группа	Дата	Параметр	Показатели															
			GLU	ALP	ALT	AST	ALT / AST	LDH	TB	UREA	CRE	CHOL	TG	TP	ALB	GLB	ALB/ GLB	K	Na
Группа 3, 25 мкг	22 день	M	5,67	248,33	54,00	38,67	1,23	494,67	7,20	8,80	158,00	2,74	1,64	75,00	33,00	42,00	0,79	4,47	143,67
		SD	1,02	93,93	46,86	20,31	0,45	70,59	1,93	0,26	8,54	0,37	1,58	5,57	3,00	2,65	0,03	0,25	3,51
		T тест Плацебо/День	0,10	0,81	0,45	0,62	0,44	0,39	0,14	0,001	0,22	0,50	0,49	0,93	0,08	0,52	0,17	0,35	0,47
		T тест 8 день/22 день	0,11	0,89	0,59	0,47	0,84	0,80	0,96	0,78	0,75	0,79	0,43	0,57	0,13	0,59	0,05	0,04	0,91
		T тест 5 мкг/25 мкг	0,11	0,60	0,76	0,67	0,76	0,16	0,76	0,14	0,14	0,35	0,78	0,42	0,7	0,28	0,26	0,29	0,57

5.3 Фармакологические исследования субъединичной вакцины NARUVAX-C19/Nano на грызунах

Исследование безопасности субъединичной вакцины NARUVAX-C19/Nano

В зависимости от вида эксперимента животные распределялись по группам, состоящие из контроля и экспериментальных групп.

Все эксперименты проведены в соответствии с требованиями Стандарта надлежащей лабораторной практики РК и на основании Руководств по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ (А.Н. Миронов, Р.У. Хабриев).

Острая токсичность

На протяжении всего исследования животных взвешивали: до начала, на второй, седьмой, четырнадцатые дни эксперимента. Животным контрольной группы тем же путем вводился физиологический раствор в аналогичном объеме. Дозы рассчитывали в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (раздел 3.2). В течение четырнадцати дней ежедневно оценивалось общее состояние животных (потребление корма и воды, внешний вид, состояние кожного и шерстного покрова, слизистых оболочек, динамика массы тела, поведенческие реакции, двигательная активность).

После окончания эксперимента животные были подвергнуты декапитации в соответствии с установленной процедурой. После вскрытия экспериментальных животных был проведен визуальный внешний осмотр внутренних органов. Токсичность препарата оценена по выживаемости, динамике массы тела и по показателю $ЛД_{50.}$

Летальность является одним из наиболее важных показателей острой токсичности. На протяжении всего эксперимента смертность животных отсутствовала, даже при введении максимально допустимых доз и поэтому $ЛД_{50}$ установить не удалось. Результаты представлены в таблице 45.

Таблица 45 – Показатели выживаемости животных в эксперименте «острая токсичность»

Группы экспериментальных животных	Название ЛП, доза, режим и путь введения	Количество павших/ общее количество животных	Смертность (%)
Крысы			
№1 Контрольная	Физ. раствор / 0,4 мл однократно и/н*	0/6	0,0
№2 Опытная	Вакцина / 0,4 мл однократно и/н	0/6	0,0
№3 Опытная (беременные)	Вакцина / 0,4 мл однократно и/н	0/5	0,0
Мыши			
№4 Контрольная	Физ. раствор / 0,1 мл однократно и/н	0/6	0,0
№5 Опытная	Вакцина / 0,1 мл однократно и/н	0/6	0,0

Продолжение таблицы 45

Группы экспериментальных животных	Название ЛП, доза, режим и путь введения	Количество павших/ общее количество животных	Смертность (%)
№6 Опытная (беременные)	Вакцина / 0,1 мл однократно и/н	0/5	0,0
Примечание: *и/н-интраназально			

Масса тела – один из наиболее важных интегральных показателей, отражающих общее состояние животных. Уменьшение массы тела на протяжении эксперимента свидетельствует о системном токсическом воздействии изучаемого препарата на организм животных. В течение всего эксперимента велось наблюдение за изменением веса экспериментальных животных.

Исследуемая вакцина не оказала отрицательного влияния на динамику прироста массы тела.

На протяжении всего исследования наблюдалась положительная динамика массы тела экспериментальных животных (таблицы 46, 47).

Таблица 46 – Динамика массы тела животных в эксперименте «острая токсичность» (крысы)

Период до/после введения вакцины	№1 Контрольная группа		№2 Опытная группа		№3 Опытная группа (беременные)
	F	M	F	M	F
Фон	187,4±3,8	190,6±2,2	190,8±4,2	194,3±2,9	225,0±1,9
Через 24 часа	187,6±3,8	190,7±2,2	191,1±4,3	194,5±2,9	225,2±1,9
Через 7 дней	191,6±3,3	195,7±1,5	196,0±4,2	199,4±2,5	230,1±1,8
Через 14 дней	197,1±2,6	200,7±1,1	201,4±3,7	204,9±2,3	234,6±1,9
Прирост массы тела, г	+9,7	+10,1	+10,6	+10,6	+9,6
Примечание: *F – «female» – самки, M – «male» – самцы					

Таблица 47 – Динамика массы тела животных в эксперименте «острая токсичность» (мыши)

Период до/после введения вакцины	№4 Контрольная группа		№5 Опытная группа		№6 Опытная группа (беременные)
	F	M	F	M	F
Фон	18,8±0,3	19,6±0,3	18,6±0,3	19,4±0,2	25,9±0,8
Через 24 часа	18,9±0,3	19,7±0,3	18,7±0,3	19,5±0,1	26,1±0,8
Через 7 дней	23,7±0,9	24,0±0,6	23,8±0,2	24,6±0,3	29,8±0,9
Через 14 дней	27,7±0,4	28,6±0,4	28,4±0,5	29,2±0,8	35,3±0,7
Прирост массы тела, г	+8,9	+9,0	+9,8	+9,8	+9,4
Примечание: *F – «female» – самки, M – «male» – самцы					

В первый день наблюдения не выявлено никаких отклонений от нормальных показателей жизнедеятельности у всех экспериментальных

животных. Животные имели здоровый внешний вид, демонстрировали адекватные реакции на тактильные, звуковые и световые раздражители, их шерстный покров был блестящим, ровным, гладким.

На основании полученных результатов эксперимента по изучению острой токсичности установлено, что мыши и крысы обоего пола, а также беременные крысы и мыши перенесли максимально допустимый объем (крысы – 0,4 мл, мыши – 0,1 мл) без видимых отклонений от нормы. Общее состояние животных исследуемых групп, интенсивность и характер их двигательной активности, координация движений, тонус скелетных мышц и окраска слизистых оболочек не изменялись на протяжении всего эксперимента. Частота и глубина дыхательных движений, положение хвоста не отличались от аналогичных показателей животных контрольной группы.

Данные вскрытия (некропсия)

При вскрытии животных экспериментальных групп внутренние органы в торакальной и абдоминальной полостях были обычными по цвету, консистенции, анатомо-топографическим параметрам. Внутренние органы животных анатомически правильной формы, их положение анатомически правильно.

Величина и форма сердца изменений не представляли. Мышца сердца была коричневатой, плотной. Поверхность легких имела бледно-розовую окраску, ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску.

Желудок имел обычную форму и размеры, просвет был заполнен плотным пищевым содержимым. Слизистая тела желудка была бледно-розовой, блестящей, складчатой.

Макроскопические показатели (форма и размеры) печени оставались без изменений. Ткань печени имела коричневатый цвет и умеренно плотную консистенцию.

Величина и форма почек не отличались от контроля. Поверхность органа была гладкой, однородной коричневато-сероватой окраски.

Селезенка имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию.

На основании изучения острой токсичности иммунобиологического препарата NARUVAX-C19/Nano – нановакцина для профилактики COVID-19 0,5 мл/доза, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения (НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», Республика Казахстан) на белых беспородных мышах и крысах обоего пола установлено отсутствие токсического воздействия исследуемой вакцины на организм опытных животных.

Подострая (субхроническая) токсичность

Животным контрольной группы вводился тем же путем физиологический раствор в аналогичном объеме также в течение 7 дней.

Ежедневно проводилась оценка отклонений в общем состоянии здоровья с регистрацией признаков токсичности, а также потребления корма и воды, внешнего вида, состояния кожного и шерстного покрова, слизистых оболочек, динамики массы тела, поведенческих реакций и двигательной активность.

Проводили отбор образцов крови для определения гематологических и биохимических показателей по окончании эксперимента.

Масса тела регистрировалась при формировании групп животных (за сутки до первого введения вакцины) и далее на второй, пятый и седьмой день эксперимента с записью в протоколе исследования. После окончания эксперимента животные подвергались эвтаназии (декапитация). После эвтаназии животных проводился визуальный осмотр животного на предмет наружных патологических признаков с последующим вскрытием.

Произведен забор внутренних органов печень, почки и легкие для проведения патоморфологических исследований.

Внутренние органы крыс (сердце, печень, легкие, селезенка и почки) взвешивались для определения массовых коэффициентов.

Лабораторные исследования проведены после иммунизации, на 8-й день после введения вакцины. Забор крови у животных осуществляли после 14-15-часового голодания.

При интраназальном введении крысам вакцины NARUVAX-C19/Nano в соответствующей дозе (таблица 48) общее состояние животных опытных группы визуально не отличалось от контрольной группы. Интенсивность и характер двигательной активности, координация движений, тонус скелетных мышц сохранялись на прежнем уровне в течение всего эксперимента.

Поведенческие реакции, а также реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители были без изменений. Состояние волосяного и кожного покрова было в норме. Результаты токсического влияния вакцины на выживаемость лабораторных крыс в субхроническом эксперименте представлена в таблице 48.

Таблица 48 – Показатели выживаемости животных в эксперименте субхроническая токсичность

Группы экспериментальных животных	Название ЛП, доза, режим и путь введения	Количество павших/ общее количество животных	Смертность (%)
№1 Контрольная	Физ. раствор 0,4 мл и/н* однократно, в течение 7 дней	0/10	0,0
№2 Опытная	Вакцина 0,04 мл ежедневно 7 дней и/н	0/10	0,0
№3 Опытная	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней и/н	0/10	0,0
№4 Опытная	0,4 мл ежедневно в течение 7 дней и/н	0/10	0,0
№5 Опытная (беременные)	0,2 мл ежедневно в течение 7 дней и/н	0/10	0,0
Примечание: *и/н-интраназально			

Динамика массы тела животных экспериментальных групп представлена в таблице 49. Результаты исследований показывают прибавку массы тела животных опытных групп в течение всего периода наблюдения. Статистически

значимых различий в приросте массы тела по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

Таблица 49 – Динамика массы тела экспериментальных крыс (подострая токсичность)

Номер группы	Пол	Динамика массы (г), время после начала опыта			
		Фон (до введения вакцины)	через 24 часа	через 5 дней	через 7 дней
№1 Контрольная	♀*	183,4 ± 3,5	183,7 ± 3,4	188,3 ± 3,4	193,2 ± 3,4
	♂	185,2 ± 4,4	185,5 ± 4,4	190,4 ± 4,3	194,6 ± 4,0
№2 Опытная	♀	183,4 ± 1,3	183,5 ± 1,4	189,0 ± 0,8	194,9 ± 1,2
	♂	186,4 ± 4,0	186,5 ± 4,1	191,7 ± 3,9	197,2 ± 3,8
№3 Опытная	♀	185,2 ± 2,9	185,4 ± 2,9	191,0 ± 2,4	196,9 ± 2,3
	♂	189,7 ± 2,3	189,9 ± 2,2	195,4 ± 2,4	200,9 ± 2,5
№4 Опытная	♀	183,8 ± 3,2	184,0 ± 3,2	189,4 ± 3,5	194,7 ± 3,3
	♂	189,9 ± 1,1	190,0 ± 1,1	194,7 ± 1,3	200,0 ± 1,1
№5 Опытная (беременные)	♀	225,6 ± 3,6	226,0 ± 3,6	232,2 ± 3,6	238,1 ± 3,7
Примечание: *♀ – самка ♂- самец					

По окончании эксперимента через 7 дней животные всех групп были подвергнуты эвтаназии. Органы животных извлекали, взвешивали и проводили отбор для последующего гистологического исследования.

При макроскопическом исследовании внутренних органов различий между группами не установлено. Шерсть животных имела опрятный вид, была блестящей, без очагов облысения. При осмотре грудной и брюшной полостей нарушений в расположении внутренних органов не отмечалось.

Величина и форма сердца изменений не представляли. Мышца сердца была коричневатой, плотной. Поверхность легких имела бледно-розовую окраску, ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску.

Желудок имел обычную форму и размеры, просвет был заполнен плотным пищевым содержимым. Слизистая тела желудка была бледно-розовой, блестящей, складчатой.

Макроскопические показатели (форма и размеры) печени оставались без изменений. Ткань печени имела коричневатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Поджелудочная железа была бледно-розовой, дольчатой.

Величина и форма почек не отличались от контроля, капсула легко снималась. Поверхность органа была гладкой, однородной коричневато-сероватой окраски. Форма, размеры и плотность надпочечников, яичников или яичек не отличались от нормы.

Селезенка имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию. Оболочки головного мозга были тонкими, прозрачными.

При макроскопическом исследовании плацента имела дисковидную форму без видимых патологических очагов, материнская часть равномерно дольчатая без дефектов, красно-коричневого цвета, пуповина отходит центрально, умеренно извита, патологических очагов не выявлено.

После вскрытия животных внутренние органы всех экспериментальных групп не отличались визуально.

Для определения массового коэффициента органов проводили взвешивание внутренних органов животных (легкие, печень, селезенка, сердце, почки) и определяли их относительную массу в расчете на 100 г массы тела крыс. В дальнейшем показатели относительной массы внутренних органов крыс экспериментальных групп статистически обрабатывали и сравнивали с таковыми у контрольных животных.

Установлено, что относительная масса взвешенных органов крыс экспериментальных групп не имеют статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой (таблица 50).

Таблица 50 – Массовые коэффициенты (МК) органов у животных при интраназальном введении вакцины

Орган	Сердце		Печень		Селезенка		Легкие		Почки	
Номер группы	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %	Масса органа, г	МК, %
№1 контрольная	1,19 ±± 0,13	0,50	14,35 ± 3,97	6,08	1,65 ± 0,52	0,70	2,48 ± 0,53	1,05	2,36 ± 0,24	1,00
№2 опытная	1,22 ± 0,20	0,63	10,82 ± 0,17	5,57	1,37 ± 0,09	0,70	2,82 ± 0,39	1,45	2,59 ± 0,16	1,33
№3 опытная	1,05 ± 0,11	0,53	11,06 ± 0,16	5,60	1,23 ± 0,07	0,62	2,58 ± 0,40	1,32	2,39 ± 0,18	1,21
№4 опытная	1,18 ± 0,12	0,59	11,12 ± 0,42	5,60	1,25 ± 0,06	0,63	2,79 ± 0,21	1,39	2,52 ± 0,37	1,27
№5 опытная (беременные)	1,25 ± 0,18	0,51	10,53 ± 0,20	4,40	1,23 ± 0,07	0,51	2,68 ± 0,28	1,12	2,39 ± 0,18	0,99

Из таблицы 50 видно, что не установлено значимых различий в массовых коэффициентах внутренних органов экспериментальных животных, что свидетельствует об отсутствии токсического влияние на организм животного.

Эти данные подтверждаются результатами патоморфологических исследований.

Результаты гистологического исследования

Животные были подвергнуты декапитации с применением лабораторной гильотины на восьмой день эксперимента. Кусочки тканей печени, почек, легких, плода фиксировали в нейтральном формалине, затем проводили по спиртам восходящей концентрации и окрашивали гематоксилином и эозином. При микроскопическом исследовании были получены следующие данные.

Контрольная группа. Животным этой группы вводили физиологический раствор 5,0 мл в/м однократно в течение 7 дней.

Гистологическое строение печени характеризовалось наличием долек, в центре которых располагалась центральная вена, с радиарно отходящими гепатоцитами. Они формируют печеночные балки. Между ними находятся кровеносные и желчные капилляры (рисунок 29). На периферии трех долек печени расположена триада, она представлена артерией, веной и желчным сосудом. Гистологическое строение почек и легких не нарушено (рисунки 30, 31).

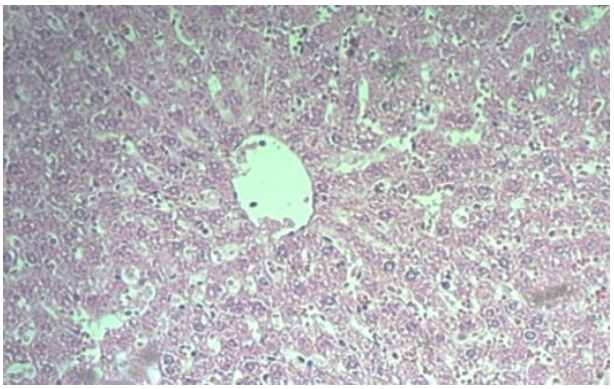


Рисунок 29 – Печеночная ткань здоровой крысы. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение
×200

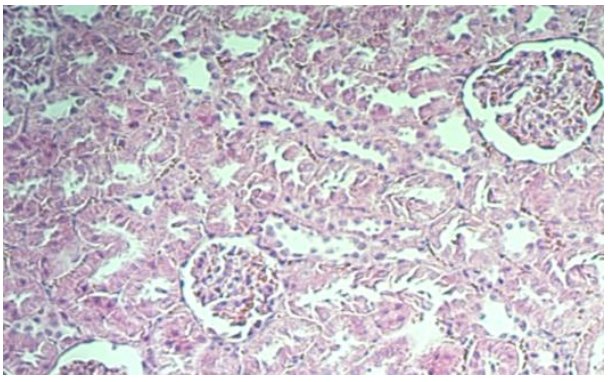


Рисунок 30 – Почечная ткань здоровой крысы. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

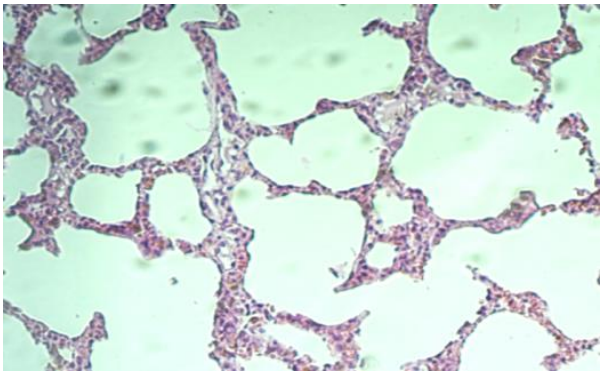


Рисунок 31 – Ткань легких здоровой крысы. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Опытная группа №2. Животным этой экспериментальной группы вводили 0,04 мл вакцины и/н ежедневно 7 дней (1 профилактическая доза для крыс).

Гистологическое строение печени характеризовалось наличием долек, в центре которых располагалась центральная вена, с радиарно-отходящими гепатоцитами. Они формируют печеночные балки. Между ними находятся кровеносные и желчные капилляры. На периферии трех долек печени расположена триада, она представлена артерией, веной и желчным сосудом. В отдельных участках наблюдалось расширение синусоидов за счет отека (рисунок 32). Гистологическое строение почек не нарушено клубочки, канальца, строма с сосудами. В отдельных участках очаги отека (рисунок 33). Гистологическое строение ткани легких не изменено в отдельных участках утолщение межальвеолярных перегородок за счет отека (рисунок 34).

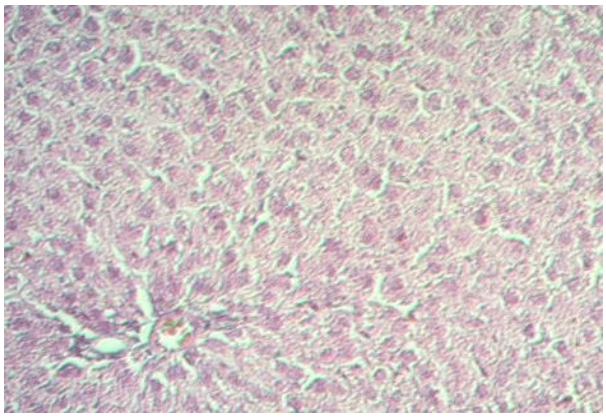


Рисунок 32 – Печень, очаги отека ткани. Окраска гематоксилин эозин Увеличение ×200

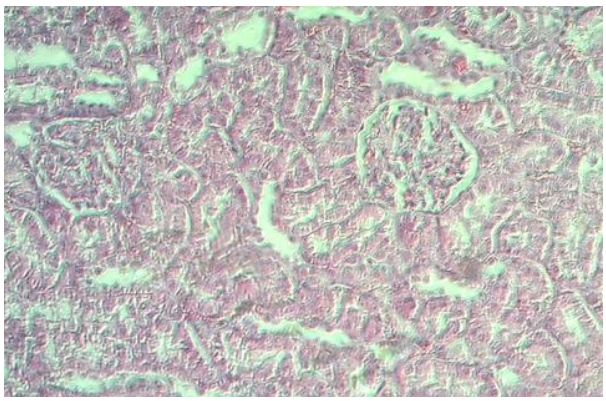


Рисунок 33 – Почка, очаги отека. Окраска гематоксилин эозин
Увеличение ×200

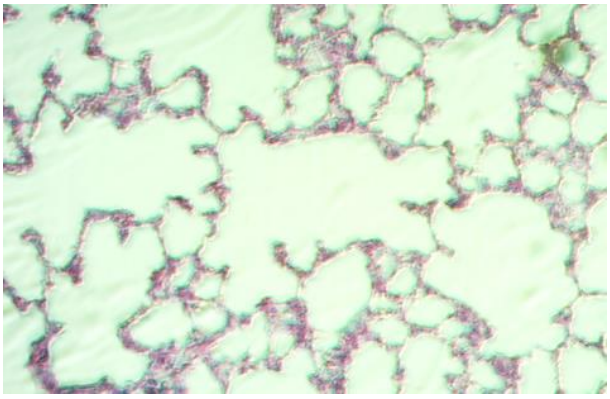


Рисунок 34 – Легкое, очаги отека ткани. Окраска гематоксилин эозин
Увеличение ×200

Опытная группа №3. Животным этой экспериментальной группы вводили 0,2 мл вакцины и/н ежедневно в течение 7 дней (5 кратное увеличение профилактической дозы).

В печени структура органа сохранялась, в отдельных участках наблюдался отек ткани (рисунок 35). Гистологическое строение ткани почки сохранено, определялись очаги отека стромы в корковом слое почки (рисунок 36). Строение легких не нарушено, однако наблюдалось полнокровие крупных сосудов (рисунок 37).

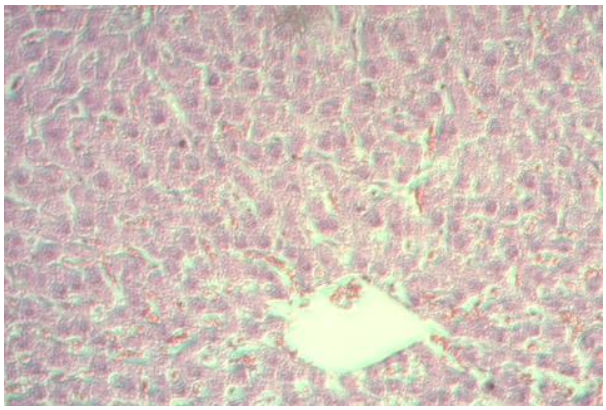


Рисунок 35 – Печень, очаги отека ткани. Окраска гематоксилин эозин
Увеличение ×200

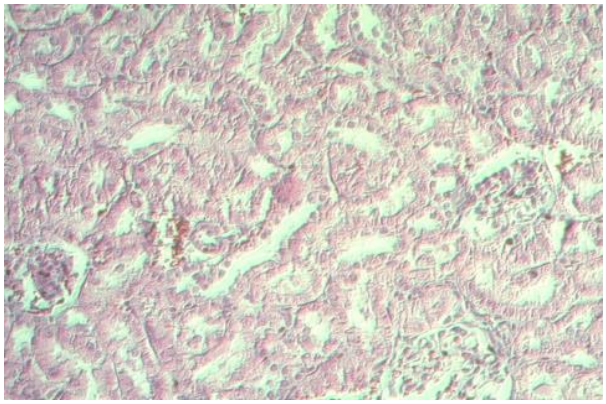


Рисунок 36 – Почка, очаги отека коркового слоя. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

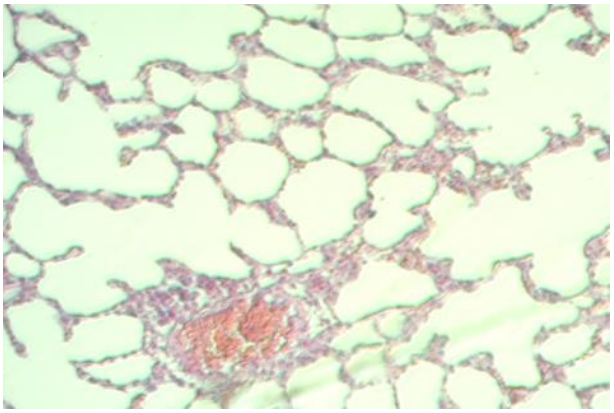


Рисунок 37 – Легкое, полнокровие крупного сосуда. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Опытная группа №4. Животным этой экспериментальной группы вводили 0,4 мл вакцины и/н (10 кратное увеличение профилактической дозы).

В печени структура органа сохранялась, в отдельных участках наблюдалось полнокровие сосудов с очагами отека (рисунок 38). При гистологическом исследовании почки структура органа не изменена, отмечались очаги отека ткани (рисунок 39). Ткань легких сохраняла свою гистологическую структуру. Наряду с этим выявлялась картина нарушения кровообращения в виде полнокровия сосудов (рисунок 40).

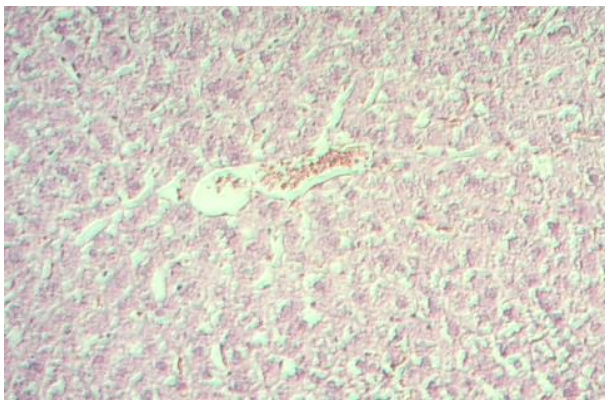


Рисунок 38 – Печень, отек ткани с полнокровием сосуда. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

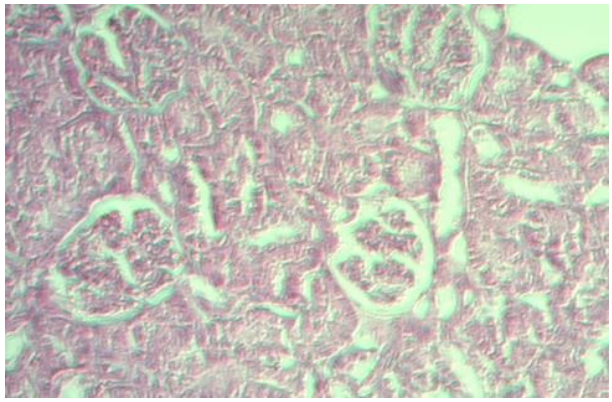


Рисунок 39 – Почка, отек ткани. Окраска гематоксилин эозин
Увеличение ×200

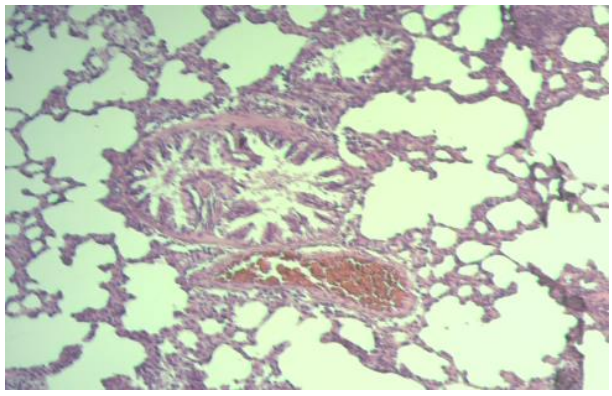


Рисунок 40 – Ткань легкого, полнокровие крупного сосуда. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Опытная группа №5 (беременные). Животным этой экспериментальной группы вводили 0,2 мл вакцины и/н ежедневно в течение 7 дней (5 кратное увеличение профилактической дозы).

При морфологическом исследовании микроскопические изменения носили следующий характер. Гистологическое строение органов сохранялось, однако были выявлены признаки нарушения кровообращения. В ткани элемента плода выявлялись очаговые кровоизлияния (рисунок 41). В эмбриональной ткани печени наблюдался отек с микрофокусами некроза гепатоцитов, которые были представлены аморфными розовыми массами

(рисунок 42). В ткани плаценты наряду с отеком определялись полнокровные сосуды с микрофокусами очаговых кровоизлияний (рисунок 43).

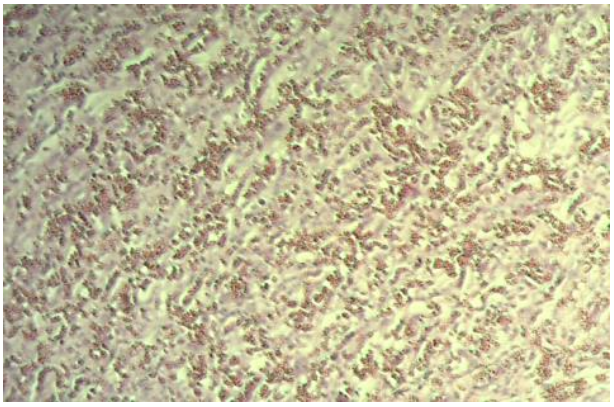


Рисунок 41 – Ткань плода с очаговыми кровоизлияниями. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

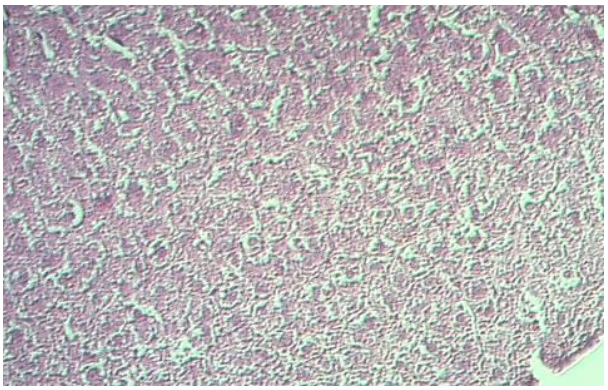


Рисунок 42 – Печень плода, отек ткани с микрофокусами некроза гепатоцитов. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

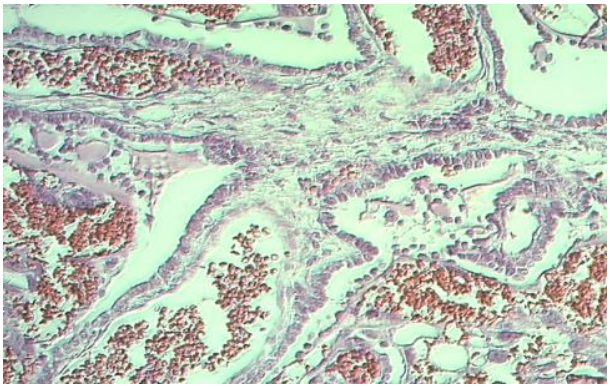


Рисунок 43 – Плацента, отек ткани, очаговое полнокровие сосудов, микрофокусы кровоизлияний. Окраска гематоксилин эозин. Увеличение ×200

Таким образом, проведение комплексного морфологического исследования основных и наиболее важных внутренних при оценке подострой токсичности вакцины NARUVAX-C19/Nano – нановакцина для профилактики COVID-19 позволило сделать заключение, что при введении токсических доз вакцины (0,04 мл, 0,2 мл и 0,4 мл) микроскопические изменения в клетках органов характеризовались отеком тканей с единичными полнокровными

сосудами. Морфологические изменения у беременных крыс при исследовании плаценты и тканей плода помимо отека тканей и нарушения кровообращения, характеризовались наличием в печени микрофокусов некроза гепатоцитов. Сходные по характеру изменения зарегистрированы и при введении инъекционной формы (п. 5.1), в состав которой входит скваленовый адъювант, что не позволяет связать их с каким-либо одним компонентом состава; причинная природа этих изменений в рамках применённого дизайна не установлена. Явно выраженных патологических изменений во всех исследуемых органах не обнаружено.

Гематологические и биохимические исследования

На восьмой день эксперимента подострой токсичности у животных производился забор крови для изучения биохимического и морфологического анализа крови. Полученные результаты представлены в таблицах 51 и 52.

Как видно из таблицы 51 биохимические показатели крови животных всех экспериментальных групп находились в пределах нормы.

Уровень глюкозы у подопытных животных всех групп практически не отличался от данных контрольной группы.

При анализе результатов морфологического состава крови экспериментальных крыс было установлено, что все гематологические показатели контрольной и опытной группы №2,3,5 находились в пределах физиологической нормы (таблица 52). Для животных опытной группы №4 наблюдалось отклонение в некоторых показателях состава форменных элементов крови – увеличение количества моноцитов (моноцитоз) и снижение уровня лимфоцитов (лимфоцитопения). Это связано с ответной реакцией иммунной системы на многократное введение антигена; абсолютные значения показателей оставались в пределах физиологической нормы. Вполне возможно эти показатели могут восстановиться и нормализоваться в последующий период. Для установления фактора токсического влияния на работу внутренних органов и систем необходимо проведение исследований по оценке отдаленных последствий влияния вакцины на живой организм. Это должно быть принято во внимание при проведении клинических исследований. Остальные показатели морфологии крови были в пределах физиологических норм для всех групп.

Таким образом, морфологический анализ крови в подостром эксперименте выявил при введении десятикратной дозы (группа №4) перераспределение лейкоцитарной формулы в виде относительного моноцитоза и относительной лимфоцитопении при сохранении абсолютных значений в пределах физиологической нормы и отсутствии статистически значимых отличий от контроля (рисунки 44, 45). Выявленные изменения расценены как ответная реакция на многократное введение экзогенного антигена, а не как проявление гематотоксичности.

Для оценки биохимических и гематологических показателей всех опытных групп животных был проведен сравнительный анализ в графическом изображении (рисунки 44, 45). Результаты показывают, что полученные значения всех четырех опытных групп практически не отличаются от контроля (ns).

Таблица 51 – Биохимические показатели крови крыс при изучении подострой токсичности

Показатели биохимического анализа крови	№ группы тест-системы				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
TB	2,00 ± 0,52	2,44 ± 0,57	1,46 ± 0,08	1,68 ± 0,33	1,35 ± 0,07
D	0,16 ± 0,08	0,26 ± 0,05	0,10 ± 0,00	0,14 ± 0,05	0,10 ± 0,00
ALP U/l	378,5 ± 103,0	454,4 ± 154,7	445,8 ± 131,2	571,4 ± 177,8	252,9 ± 0,707
Krea µmol/l	87,50 ± 27,45	90,64 ± 10,94	71,06 ± 6,62	72,50 ± 6,28	85,20 ± 8,40
TP g/l	73,78 ± 7,22	69,86 ± 4,76	65,00 ± 3,98	70,24 ± 3,97	66,35 ± 4,03
U mMol/l	5,42 ± 1,88	7,94 ± 1,95	6,78 ± 0,75	6,06 ± 1,11	7,00 ± 1,27
AST	201,7 ± 66,35	244,3 ± 50,07	251,3 ± 89,5	266,9 ± 61,55	173,1 ± 10,04
ALT	61,40 ± 11,21	73,30 ± 16,72	48,52 ± 18,2	79,65 ± 20,90	62,70 ± 15,41
Gluk mMol/L	8,04 ± 0,79	7,18 ± 0,90	7,62 ± 0,77	7,72 ± 0,88	6,80 ± 1,69

Таблица 52 – Гематологические показатели общего анализа крови крыс в эксперименте «подострая токсичности»

Показатели исследования гемограммы	Номер группы тест-системы				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
WBC	5,28 ± 2,73	6,50 ± 1,75	7,40 ± 2,75	7,14 ± 0,75	6,60 ± 0,28
LYM	90,78 ± 2,23	93,76 ± 1,50	92,26 ± 2,72	85,25 ± 3,38	92,40 ± 2,40
MID	7,22 ± 2,26	4,86 ± 1,69	6,00 ± 2,07	12,10 ± 2,92	6,35 ± 2,75
RBC	6,75 ± 0,54	6,87 ± 0,56	6,73 ± 0,24	6,13 ± 0,50	5,37 ± 0,98
HGB	138,6 ± 11,28	143,6 ± 8,38	136,8 ± 6,57	125,6 ± 13,72	120,6 ± 13,44
HCT	40,50 ± 2,61	41,46 ± 4,63	38,60 ± 2,85	36,96 ± 2,77	32,06 ± 3,46
PLT	496,6 ± 160,1	676,6 ± 176,9	665,4 ± 81,52	639,4 ± 257,3	563,0 ± 244,7
NEUT	2,00 ± 0,24	1,38 ± 0,40	1,74 ± 0,71	2,56 ± 0,47	1,25 ± 0,35
СОЭ	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,20 ± 0,44	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

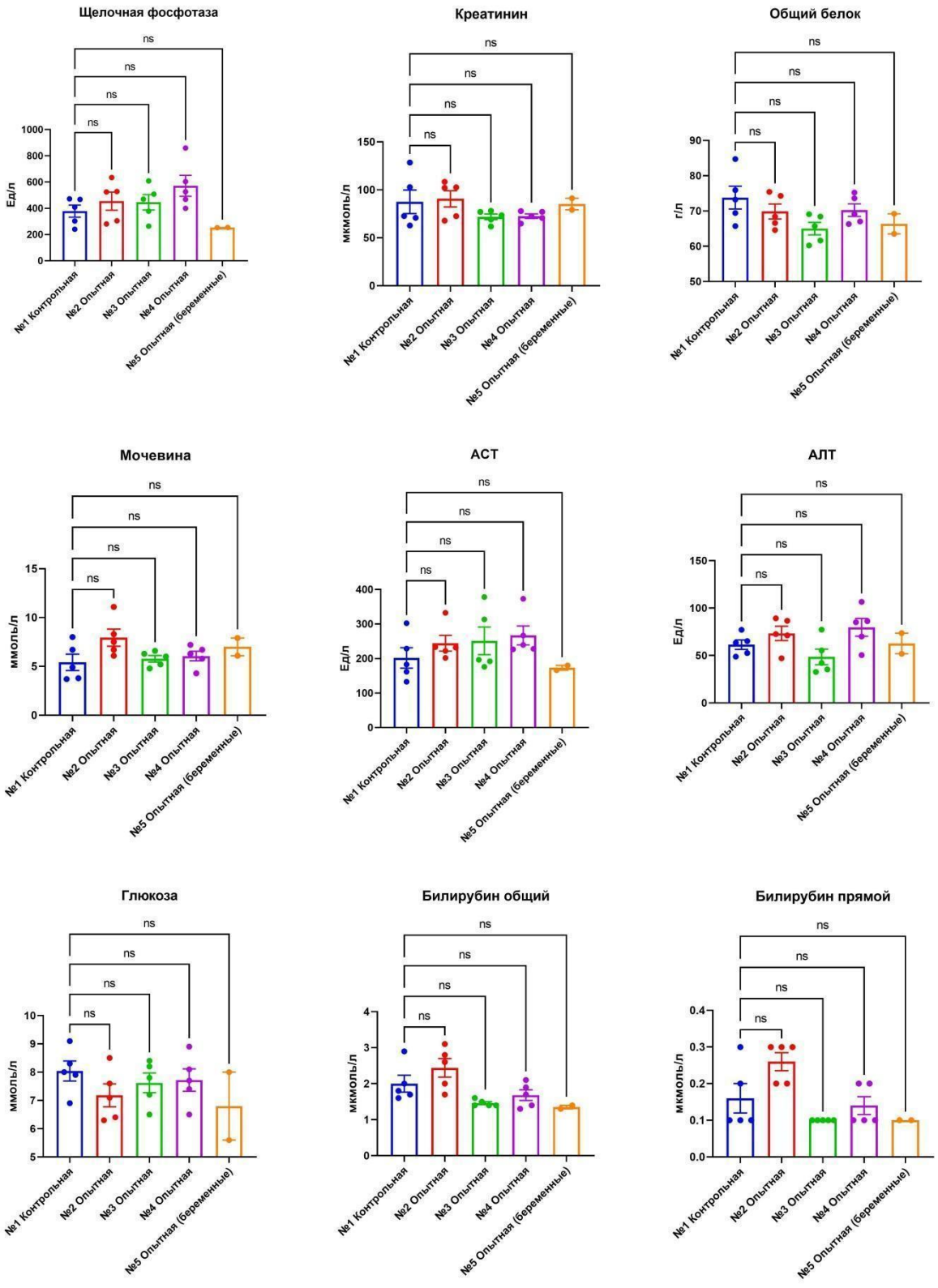


Рисунок 44 – Биохимические показатели крови животных (крыс) при изучении подострой токсичности

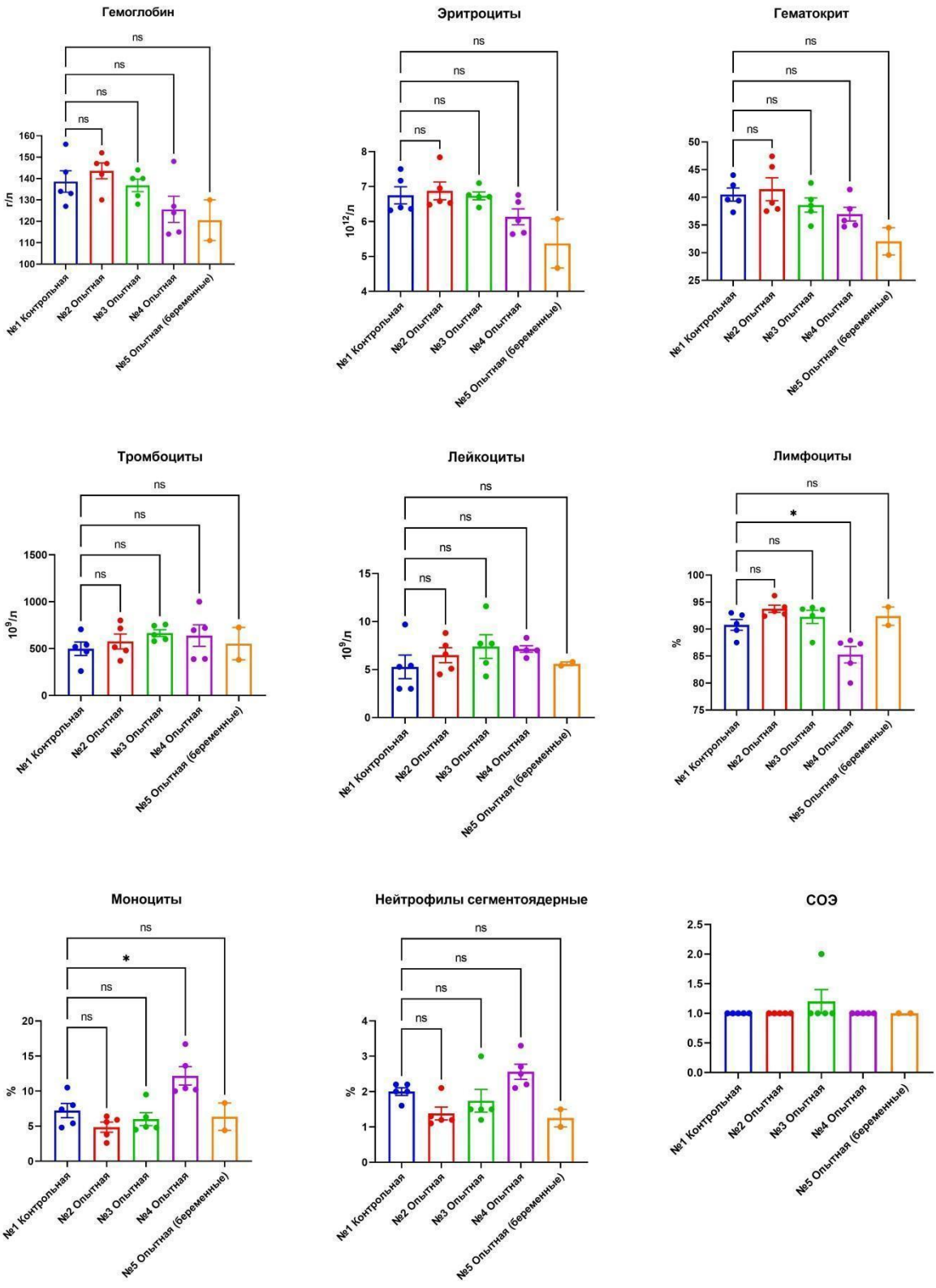


Рисунок 45 – Гематологические показатели общего анализа крови животных (крыс) при изучении подострой токсичности

Аллергенность

Исследование аллергизирующих свойств иммунобиологического препарата NARUVAX-C19/Nano нановакцина для профилактики COVID-19 проведено на двух видах лабораторных животных (мыши и морские свинки).

Дополнительно была включена группа беременных животных. В эксперимент включены здоровые, половозрелые особи обоего пола. Разброс по исходной массе не превышал 10 %.

Реакци я общей анафилаксии (анафилактический шок)

Результаты общей анафилаксии

При оценке реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактическая реакция) на морских свинках в опытных группах, сенсибилизированных введением вакцины, не было выявлено проявлений реакции анафилактического шока. Индекс по Weigle для морских свинок после сенсибилизации вакциной в дозах 0,05 мл и 0,08 мл, а также в контрольной группе, был равен нулю для всех групп. На основе этого был сделан вывод, что вакцина не обладает анафилактогенной активностью и не вызывает гиперчувствительности немедленного типа в реакции общей анафилаксии.

Результаты ГЗТ

Полученные экспериментальные данные по оценке гиперчувствительности замедленного типа на мышах после сенсибилизации введением 0,1 мл вакцины представлены в таблице 53.

Таблица 53 – Индекс отека при изучении ГЗТ

Группы	Количество животных	Индекс отека %		
		♂	♀	N*
№1 контрольная	10	3,50±2,76	2,94±2,81	3,22±2,80
№2 контрольная	10	3,83±1,36	3,18±0,73	3,50±1,14
№3 контрольная	10	2,56±1,94	3,00±1,75	2,78±1,86
№4 опытная	10	2,43±1,40	2,18±1,38	2,30±1,40
№5 опытная	10	2,11±0,84	2,75±1,72	2,43±1,39
№6 опытная	10	3,38±1,71	1,93±1,12	2,65±1,62
Примечание: *N- среднее значение				

Установлено, что индекс отека лапки у животных в опытных и контрольных группах не отличался между собой, что свидетельствует об отсутствии проявления аллергической реакции замедленного типа.

Результаты конъюнктивальной пробы

Конъюнктивальный тест не выявил признаков покраснения конъюнктивы или слезного протока глаз морских свинок, как у самцов, так и у самок, что свидетельствует об отсутствии влияния исследуемого препарата на слизистые оболочки животных и об отсутствии межполовой специфичности токсического воздействия.

Результаты исследования местно-раздражающего действия

Оценку местно-раздражающего действия нановакцины NARUVAX-C19/Nano проводили методом Дрейза (подробное описание методологии и критериев балльной оценки приведено в Главе 2, раздел 2.2). Наблюдение за общим состоянием, поведением и двигательной активностью животных велось в течение всего периода эксперимента. До начала исследования, а также после его завершения производили контрольное взвешивание животных.

В ходе эксперимента при офтальмологическом осмотре кроликов опытной группы наблюдалась следующая картина:

– состояние сосудов века, бульбарной конъюнктивы, слезных протоков, склеры и роговицы оставалось в пределах физиологической нормы (сосуды не расширены);

– признаков гиперемии, отека век (хемоза) и патологических выделений из глаз не зафиксировано;

– помутнения роговицы или изменения реакции радужной оболочки не выявлено.

При однократной инстилляции испытуемой вакцины у кроликов не отмечено видимых признаков раздражения слизистой оболочки глаз, а также изменений клинического статуса в сравнении с животными контрольной группы. Показатели состояния роговицы, радужной оболочки, конъюнктивы и слезного протока у животных экспериментальной и контрольной групп по шкале Дрейза были оценены в 0 баллов на всех сроках наблюдения (сразу после инстилляции, через 1, 24, 48 и 72 часа). Полученные результаты представлены в таблице 52.

Наблюдение за общим состоянием, поведением, двигательной активностью животных велось в течение 24 часов. До начала эксперимента, а также после его завершения производили взвешивание животных.

В ходе эксперимента наблюдали:

– нормальное состояние сосудов (не расширены) века, бульбарной конъюнктивы, слезных протоков, склеры и роговицы;

– гиперемии, отека век и выделений из глаз не наблюдали;

– покраснений и отека слезного протока, конъюнктивы и склеры не наблюдали;

– так же не наблюдали и помутнений роговицы.

Экспериментальные данные свидетельствуют об отсутствии местно-раздражающего действия вакцины на слизистую оболочку глаз экспериментальных животных.

Показатели состояния роговицы, радужной оболочки, конъюнктивы и слезного протока животных экспериментальной и контрольной группы по шкале оценки раздражающего действия, приведенной в таблице 54 была оценена в 0 баллов. Полученные результаты представлены в таблице 54.

Таблица 54 – Результаты оценки местно-раздражающего действия по шкале Дрейза (в баллах)

Номер животного	Сроки после однократной инстилляции				
	0 часов	1 час	24 часа	48 часов	72 часа
Контрольная группа №1					
К1	0	0	0	0	0
К2	0	0	0	0	0
К3	0	0	0	0	0
Экспериментальная группа №2					
К4	0	0	0	0	0
К5	0	0	0	0	0
К6	0	0	0	0	0

При однократной инстилляции испытуемой вакцины у кроликов не отмечено видимых признаков раздражения слизистой оболочки глаз, а также изменений клинического состояния. После внесения в конъюнктивальный мешок кроликам испытуемой вакцины состояние слизистых оболочек глаза не изменялось в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, установлено, что вакцина не оказывает местно-раздражающего действия на слизистые оболочки глаз экспериментальных животных.

Оценка безопасности интраназальной нановакцины NARUVAX-C19/Nano подтвердила ее отличную местную (мукозальную) переносимость и безопасность полимерной системы доставки. При интраназальной аппликации предельных объемов (доза 5,0 мг/кг для мышей и 2,0 мг/кг для крыс) гибели животных или признаков угнетения дыхательной функции не зарегистрировано.

Субхроническое нанесение нановакцины на слизистые оболочки дыхательных путей в течение семи дней не привело к локальным воспалительным процессам в тканях легких или системным патоморфологическим изменениям в паренхиматозных органах. Как и внутримышечная форма, нановакцина доказала свою безопасность для беременных особей и отсутствие прямого эмбриотоксического действия.

Особо следует отметить отсутствие местно-раздражающего действия хитозано-маннозных наночастиц: офтальмологический тест Дрейза показал отсутствие гиперемии, помутнения роговицы или отека конъюнктивы, 0 баллов. Интраназальный препарат также не обладает сенсибилизирующими свойствами, не вызывая реакций анафилаксии или контактной гиперчувствительности.

6 Изучение иммуногенности вакцины NARUVAX-C19

Исследования иммуногенности и протективности, результаты которых приведены в настоящей главе, выполнены на базе Международного центра вакцинологии КазНАИУ совместно с Vaxine Pty Ltd (Австралия) и The Ohio State University (США). Диссертант обеспечивал наработку и контроль качества активных фармацевтических субстанций и опытных серий обеих лекарственных форм, участвовал в составлении программ исследований, обработке первичных данных и интерпретации результатов, а также является автором публикаций, подготовленных по итогам этих исследований.

6.1 Гуморальный иммунный ответ у мышей (BALB/c)

Анти-S IgG и изотипы. Уже через 21 сутки после первой иммунизации у мышей, получивших Spike-белок ECD или rRBD в сочетании с эмульсионным адъювантом SWE, формировались детектируемые уровни анти-S IgG; после второй инъекции титры значимо возрастали и были выше во всех адъювантированных группах по сравнению с антигеном без адъюванта (рисунок 46, a и b). Спектр изотипов свидетельствовал о сбалансированном Th1/Th2-ответе в адъювантированных группах: на 21-е сутки после бустерной вакцинации уровни IgG1 и IgG2a становились сопоставимыми, тогда как при использовании антигена без адъюванта преобладал IgG1, что указывает на Th2-смещение (рисунок 46, b).

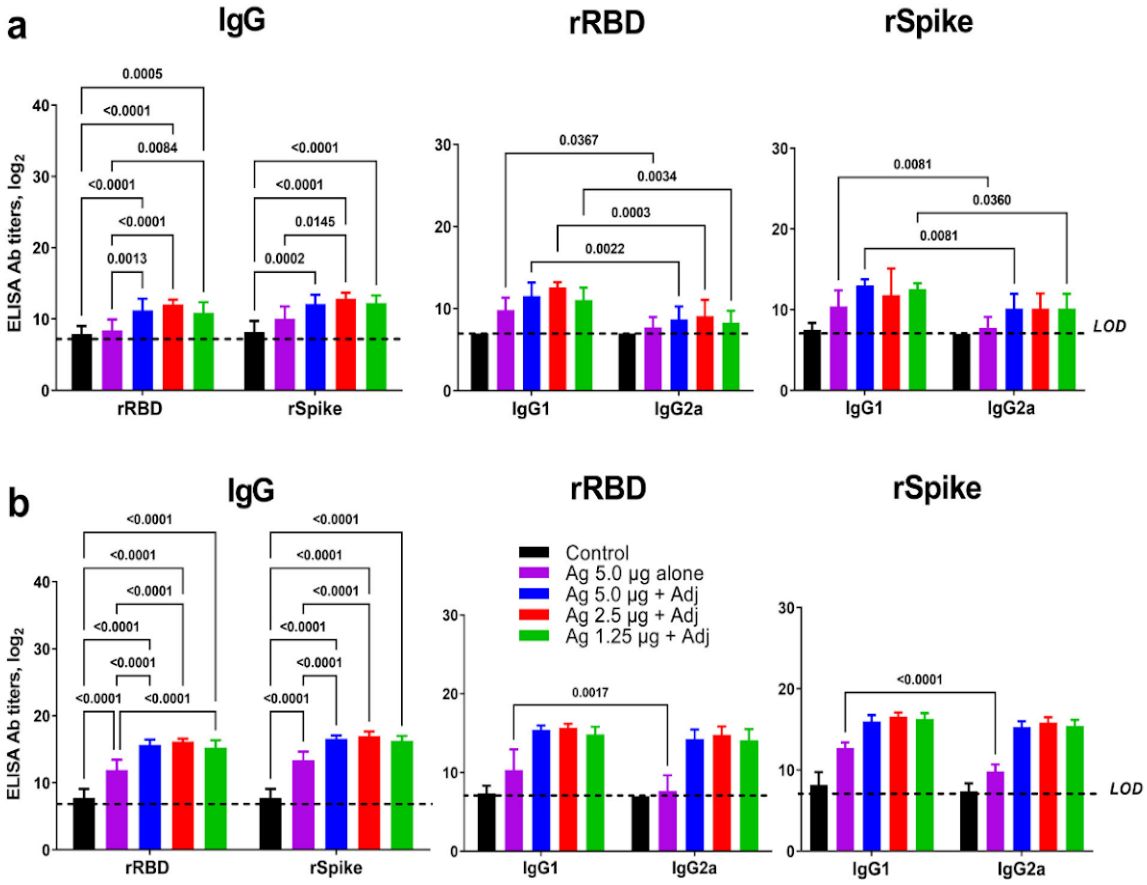


Рисунок 46 – Динамика выработки анти-S IgG (a) и спектр изотипов антител (b) у мышей линии BALB/c после иммунизации

Блокирующие антитела к RBD–ACE2 (sVNT) и нейтрализующие антитела. Способность сывороток ингибировать связывание RBD с рецептором ACE2 фиксировалась уже через 21 сутки после однократной вакцинации. В группах Spike-белок+SWE доля животных с блокирующими антителами составила 57,1–71,4 %, что значимо выше, чем в rRBD+SWE (0–42,8 %). В группах без адъюванта блокирующие антитела не выявлялись. На 21-е сутки после бустерной дозы доля животных с блокирующими антителами достигала 100 % во всех вакцинированных группах, при этом уровни ингибирования были выше у Spike-белок по сравнению с rRBD (рисунок 47, a и b). Оценка нейтрализующей активности (VNT) с использованием живого вируса (WT D614G) показала, что после первой инъекции активность детектировалась в части животных, иммунизированных Spike-белок+SWE, тогда как в rRBD+SWE – лишь у единичных особей (рисунок 47, c). На 21-е сутки после бустера все три дозы Spike-белок+SWE обеспечивали высокие VNT-титры (GMT 475–706), достоверно превосходя антиген без адъюванта, контроль и соответствующие группы rRBD+SWE (рисунок 47, d).

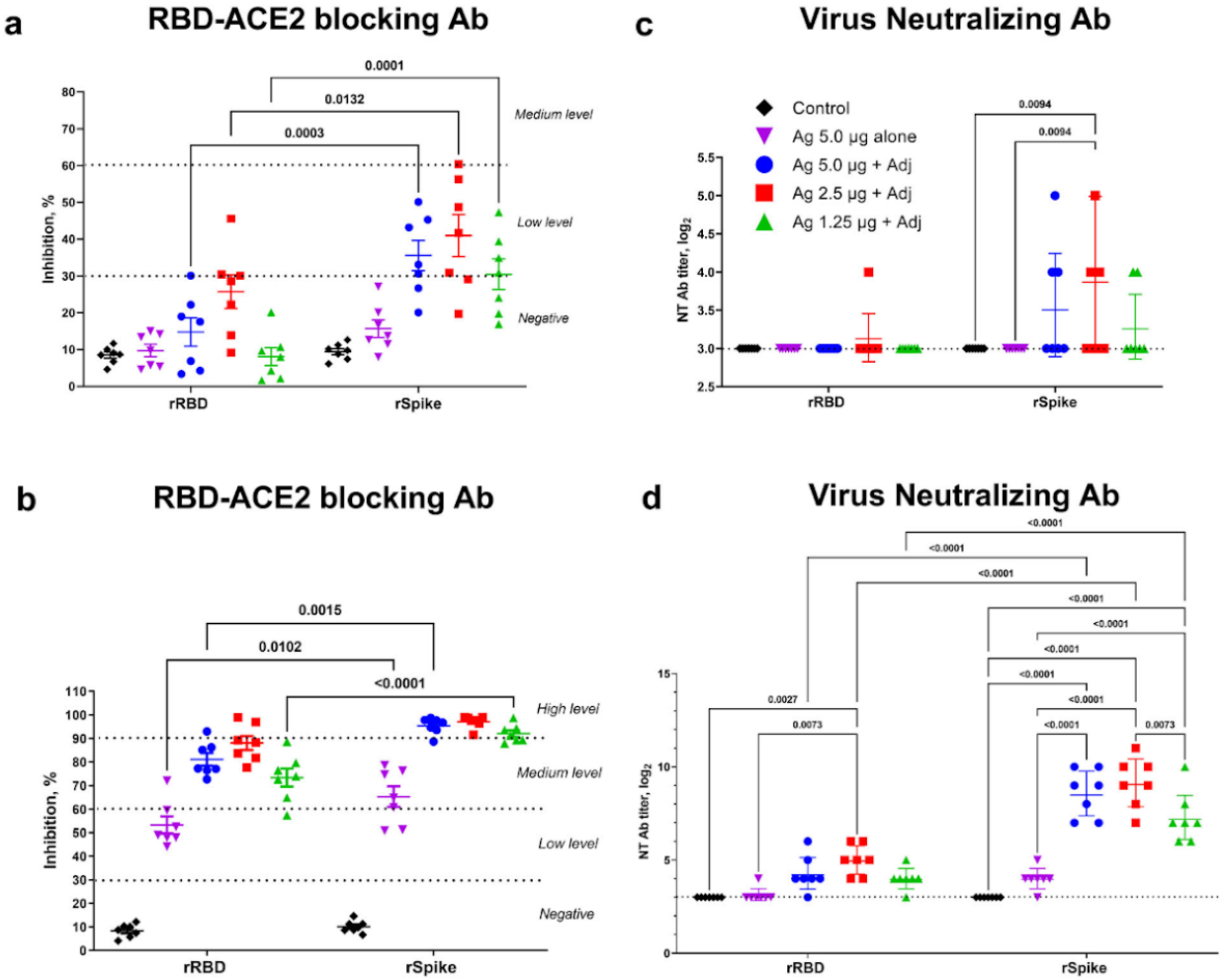


Рисунок 47 – Функциональная активность индуцированных антител у мышей: уровни ингибирования связывания RBD–ACE2 (a, b) и титры вируснейтрализующих антител (c, d). Классификация sVNT: <30 % – отрицательные, 30–59 % – низкие, 60–89 % – средние, ≥ 90 % – высокие

Клеточный иммунный ответ у мышей

Клеточный иммунный ответ у мышей. Двукратная иммунизация Spike-белок+SWE и rRBD+SWE индуцировала выраженную продукцию как Th1-медиаторов (IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-17A), так и Th2-медиаторов (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) относительно контрольных групп. Отмечено преимущество группы Spike-белок+SWE (2,5 мкг) по уровням IL-2, TNF-α и IL-10 над rRBD+SWE (рисунок 48, a). Антиген-стимулированная пролиферация CD4+ клеток была значимо выше контролей в обеих адъювантированных группах; для CD8+ лимфоцитов наблюдалась тенденция к росту, достигшая статистической значимости в группе Spike-белок+SWE (2,5 мкг) (рисунок 48, b).

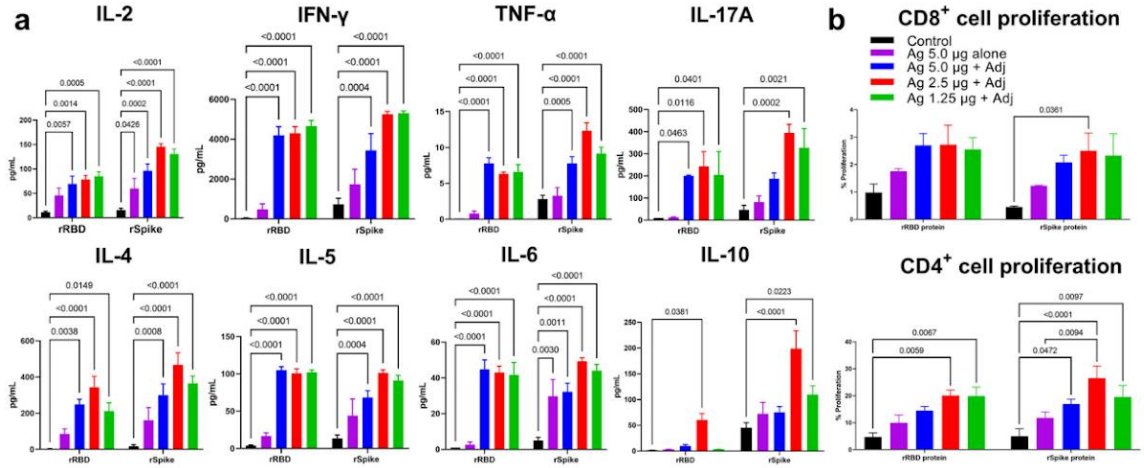


Рисунок 48 – Оценка клеточного иммунного ответа у мышей: секреция цитокинов спленоцитами (a) и антиген-стимулированная пролиферация CD4+ и CD8+ Т-клеток (b)

Иммуногенность у сирийских хомяков. Оценка проводилась на 21-е сутки после второй внутримышечной инъекции (5,0 мкг антигена на животное), а сравнение выполняли с сыворотками реконвалесцентов (рисунок 49). В группе Spike-белок+SWE регистрировались титры анти-S IgG (GMT 35 918), достоверно превышающие показатели группы rRBD+SWE (GMT 14 254), находясь на уровне, сопоставимом или превосходящем реконвалесцентные сыворотки (рисунок 49, a). Блокирующие антитела RBD–ACE2 в группе Spike-белок+SWE у большинства животных классифицировались как «высокие» или «средние», в то время как в группе rRBD+SWE они фиксировались лишь у половины животных на низком уровне (рисунок 49, b). Сыворотки Spike-белок+SWE демонстрировали наивысшие VNT-титры против дикого типа (WT D614G), а также стопроцентную кросс-нейтрализацию варианта Delta, значительно превосходя как группу rRBD+SWE, так и сыворотки реконвалесцентов (рисунок 49, c и d).

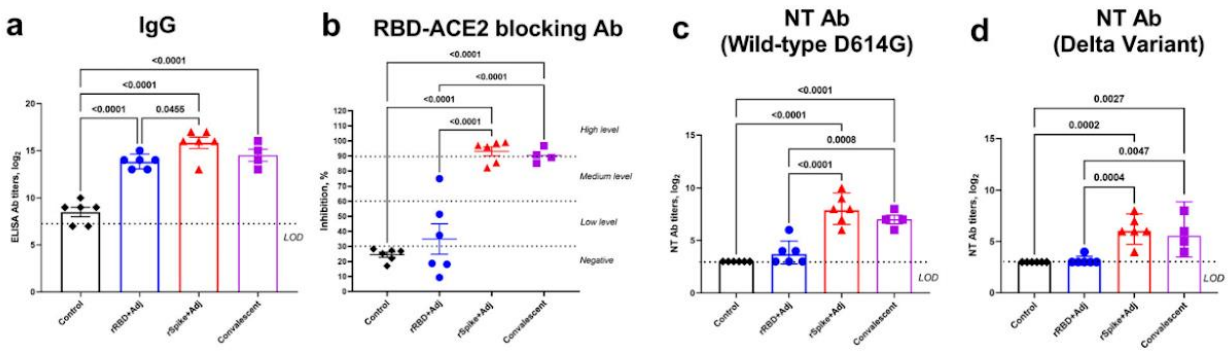


Рисунок 49 – Иммуногенность субъединичной вакцины на модели сирийских хомяков: титры анти-S IgG (a), уровень блокирующих антител RBD–ACE2 (b) и нейтрализующая активность против дикого типа (c) и варианта Delta (d)

Итоговые ассоциации иммунных маркеров. Анализ корреляционной матрицы показал, что наиболее сильными коррелятами защиты лёгких являются предвызовные уровни анти-S IgG, степень ингибирования RBD–ACE2 и титры нейтрализующих антител против WT SARS-CoV-2. Отдельно установлена сильная корреляция между потерей массы тела и баллами лёгочной патологии (r = 0,70; p = 0,001), что подтверждает информативность динамики массы в качестве неинвазивного индикатора тяжести заболевания (рисунок 50).

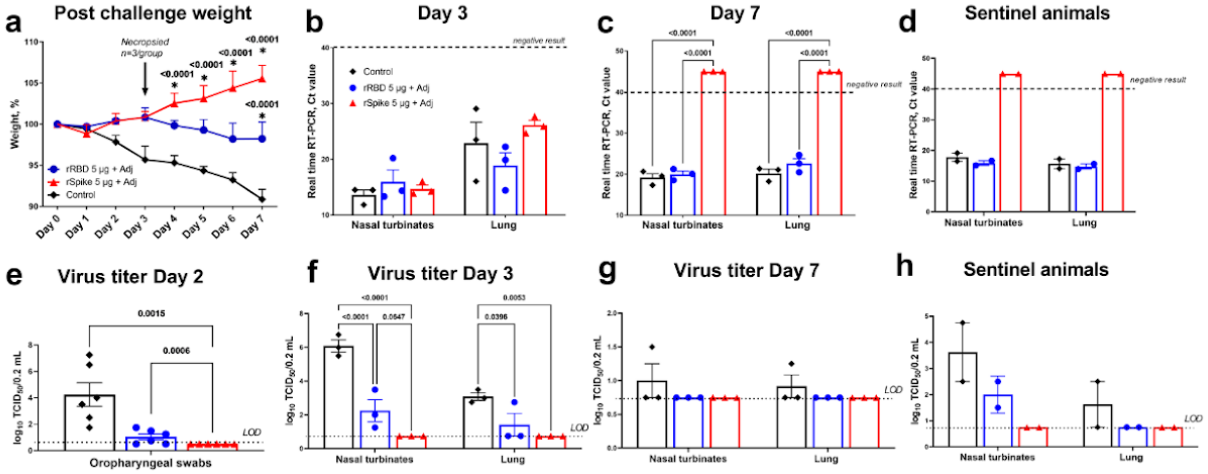


Рисунок 50 – Корреляционная матрица ассоциаций иммунных маркеров с показателями патологии легких и потерей массы тела у вакцинированных животных

6.2 Изучение иммуногенности вакцины NARUVAX-C19/Nano

Гуморальный ответ у мышей (BALB/c)

После одной интраназальной иммунизации нанокомпозиции индуцировали детектируемые анти-RBD sIgA в сыворотке (рисунок 51, a), причём уровни в экстрактах лёгких были ещё более высокими (рисунок 51, b). Все группы с наночастицами достоверно превосходили контроль. При этом бустерная доза не вызывала дополнительного значимого увеличения секреторного IgA. Для сравнения, у мышей, иммунизированных внутримышечно RBD-Alum, sIgA не определялся. В отличие от системного введения, интраназальная лекарственная форма предсказуемо не индуцировала

детектируемых уровней сывороточных анти-RBD IgG, их изотипов, а также блокирующих (sVNT) и вируснейтрализующих антител (рисунок 51, c–e).

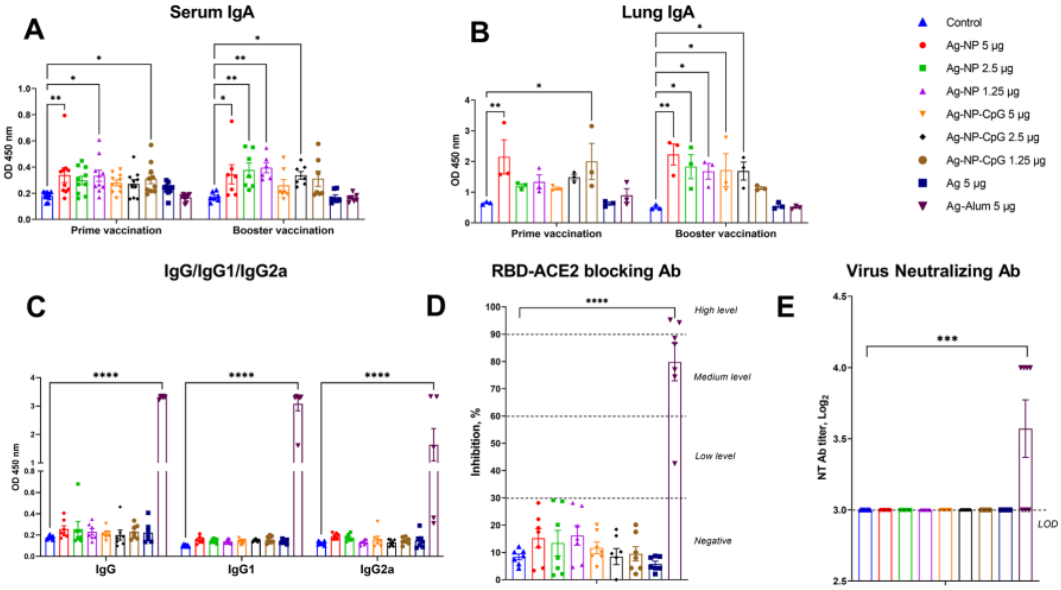


Рисунок 51 – Гуморальный иммунный ответ у мышей при интраназальном введении нановакцины NARUVAX-C19/Nano: уровни секреторного IgA в сыворотке (a) и экстрактах легких (b), сывороточные IgG и их изотипы (c), уровень ингибирования RBD-ACE2 (d) и титры вируснейтрализующих антител (e)

Клеточный иммунитет у мышей

Для объективной оценки эффективности мукозального (интраназального) пути введения нановакцины NARUVAX-C19/Nano в дизайн эксперимента был включен препарат сравнения – внутримышечная инъекция рекомбинантного белка RBD, адъювантированного гидроксидом алюминия (RBD-Alum). Данная группа выступала в роли положительного контроля для оценки системного иммунного ответа и сравнения профиля поляризации Т-хелперов.

По данным рестимуляции спленоцитов антигеном RBD, интраназальная нановакцина индуцировала клетки памяти фенотипа Th1 с секрецией IFN-γ, IL-2 и TNF-α (рисунок 52). Только вариант с добавлением адъюванта CpG вызывал значимые IL-17-ответы (Th17-компонента). Напротив, внутримышечное введение RBD-Alum индуцировало клетки памяти с повышенной продукцией Th2-цитокинов (IL-4, IL-6). Таким образом, профиль ответа при интраназальном введении характеризуется выраженным Th1-сдвигом.

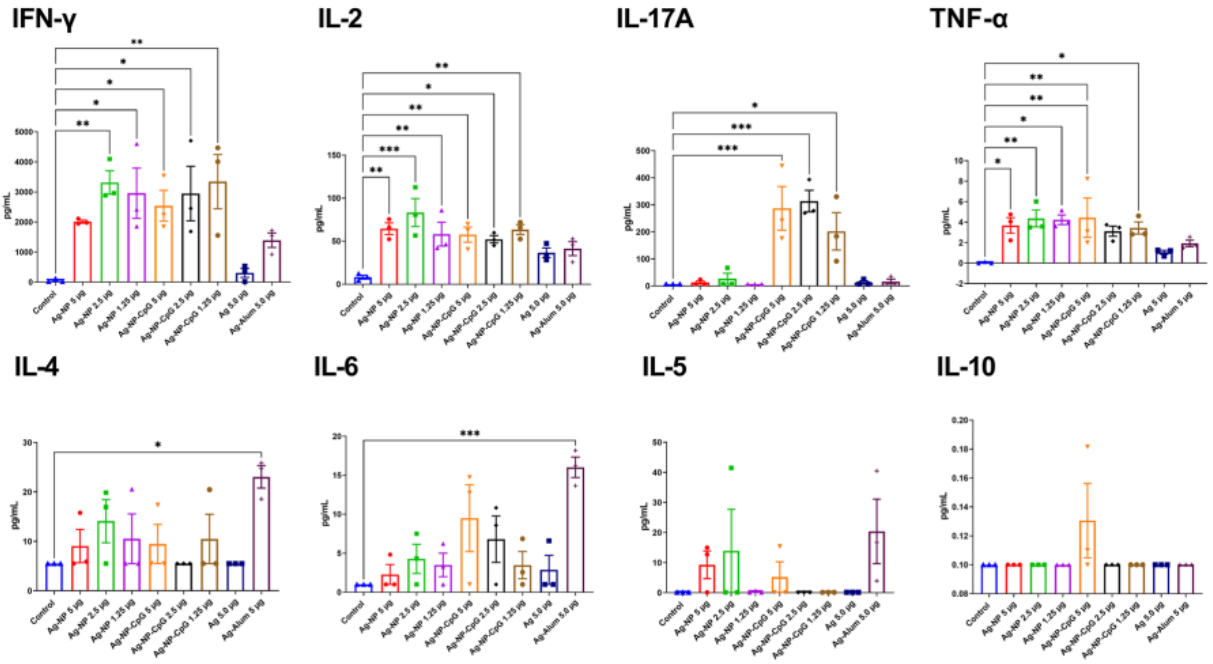


Рисунок 52 – Th-поляризация и цитокиновый профиль клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных нановакциной NARUVAX-C19/Nano

Иммуногенность у новорождённых и старых мышей

Нановакцина была иммуногенна как у новорождённых, так и у старых BALB/c: на 21-е сутки после бустера уровни сывороточного анти-RBD IgA у привитых животных были существенно выше, чем в контроле; при этом у новорождённых наблюдалась тенденция к несколько более высоким значениям IgA.

Резюмируя результаты тестирования нанокомпозиции, можно заключить, что интраназальное применение NARUVAX-C19/Nano обеспечивает формирование выраженного мукозального иммунитета (высокий уровень секреторного IgA в дыхательных путях) и Th1-поляризованного клеточного ответа. При этом инкапсуляция антигена в хитозановые наночастицы подтверждает свою эффективность в качестве системы мукозальной доставки, сохраняя высокую иммуногенность препарата, в том числе у возрастных и новорожденных животных.

6.3 Обсуждение результатов исследования

В рамках настоящей диссертационной работы была разработана и проверена на воспроизводимость технология получения рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 (полноразмерного экстраклеточного домена Spike и рецептор-связывающего домена RBD) с использованием бакуловирусной системы экспрессии (BEVS) на базе суспензионной клеточной линии насекомых *Spodoptera frugiperda* (ExpiSf9™).

Выбор бакуловирусной системы экспрессии (BEVS) обусловлен ее доказанной биобезопасностью и способностью осуществлять сложные посттрансляционные модификации, критически важные для сохранения нативной конформации вирусных гликопротеинов. В отличие от

прокариотических систем, которые не способны обеспечить правильное гликозилирование и фолдинг сложных эукариотических белков, система BEVS позволяет получать конформационно стабильные антигены, что является абсолютным приоритетом при разработке субъединичных вакцин.

В качестве клеточного субстрата в нашей работе была выбрана линия *ExpiSf9*™, культивируемая в химически определенной бессывороточной среде ExpiSf CD Medium. Данная система обеспечивает высокую плотность клеток и высокую воспроизводимость результатов. Важно отметить, что выбор линии, производной от *Sf9*, имеет фундаментальное значение для профиля безопасности будущей вакцины. Как отмечают J. Poodts и соавт. [92], широко используемая клеточная линия High Five™ продуцирует гликопротеины с аллергенной структурой ко́рового альфа-1,3-фукозилирования, что делает ее менее предпочтительной для производства препаратов, предназначенных для человека. Клетки *Sf9*, напротив, генерируют 1,6-фукозилированные N-гликаны (пауциманнозный тип), которые лишены подобной аллергенности и не несут характерных для растительных и дрожжевых систем аллергенных эпитопов. Доказательством исключительной надежности системы экспрессии *Sf9*/BEVS служит успешный вывод на мировой рынок и одобрение Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) вакцины Nuvaxovid, которая также представляет собой полноразмерный рекомбинантный Spike-белок, наработанный в клетках *Sf9*.

Критическим этапом исследования стал подбор технологических параметров биосинтеза. Экспериментально установлено, что наивысшая продуктивность достигается при плотности посева 6,5–7,0×10⁶ клеток/мл и множественности инфицирования (MOI) равной 5, с использованием изотермического режима 27 °C и сбором урожая (Harvest) на 72-й час после инфицирования.

Сопоставление параметров с данными других исследовательских групп демонстрирует различные подходы к максимизации выхода продукта. Так, M. Boumaiza и соавт. [93], оптимизируя производство S1RBD в клетках *Sf9* (система Bac-to-Bac), тестировали MOI в диапазоне от 1 до 10 и установили, что оптимальным является MOI=3 при плотности клеток 2–3×10⁶ клеток/мл, со сбором урожая на 72–96 часов. B. Fernandes и соавт. [94], напротив, использовали более низкую плотность инфицирования (2×10⁶ клеток/мл) и MOI=1 для получения S-белка в клетках Super*Sf9*-2. J. Poodts и соавт. [92] также инициировали инфекцию при 2×10⁶ клеток/мл и MOI=1, собирая продукт на 4-е сутки.

Возможность эффективного инфицирования при значительно более высокой плотности клеток (до 7,0×10⁶ клеток/мл) и высоком MOI=5 в нашем исследовании напрямую связана с применением коммерческой технологии ExpiSf. Данная система предполагает внесение специализированного усилителя ExpiSf Enhancer за 18–24 часа до инфекции, что обеспечивает высокую восприимчивость клеток к вирусу даже при субмаксимальных плотностях. Применение химически определенной среды без добавления сыворотки предотвращает преждевременное истощение субстрата, а выбранное время

сбора (72 ч) позволяет извлечь белок до наступления глубокого лизиса клеток (жизнеспособность >70 %), что критически снижает загрязнение целевого продукта клеточными протеазами и структурными белками бакуловируса (например, gp64).

Реализация отработанного биотехнологического протокола обеспечила наработку рекомбинантных антигенов с выходом 1,5–2,0 мг/л для S-ECD и 2,0–2,4 мг/л для RBD.

Анализ современной литературы показывает, что выход рекомбинантных белков SARS-CoV-2 в BEVS может варьироваться в широких пределах в зависимости от генетических конструкций. B. Fernandes и соавт. [94] смогли достичь выхода полноразмерного S-белка на уровне ~4 мг/л. Для достижения такого результата авторам потребовалось использовать генетически модифицированную клеточную линию Super*Sf9–2* и сконструировать специализированный трансферный вектор pOET5, где ген S-белка был дублирован и находился под контролем сразу двух мощных промоторов, polyhedrin и p10. J. Poodts и соавт.[92] достигли выдающегося выхода RBD в 21,1 мг/л, однако для этого был применен новый химерный промотор *polh-pSeL,* который обладает аддитивной транскрипционной активностью по сравнению со стандартным полиэдриновым промотором. M. Boumaiza и соавт. [93] при масштабировании процесса в 7-литровом биореакторе сообщили о выходе S1RBD до 70 мг/л.

Специфика выделения рекомбинантных антигенов из бакуловирусной системы сопряжена с необходимостью тщательной сепарации целевого продукта от бакуловирусных контаминантов (в частности, мажорного белка gp64), которые обладают схожими физико-химическими характеристиками. В нашей работе для белка RBD, содержащего внутриклеточные фракции, был разработан специализированный лизирующий буфер с 1 % Triton X-100. Аналогичный подход с применением неионных детергентов для экстракции спайк-белка из клеток *Sf9* успешно применяется в промышленном масштабе при производстве вакцины Novavax.

Разработанная нами двухэтапная схема хроматографической очистки, включающая металл-хелатную аффинную хроматографию (Ni-NTA) и гель-фильтрационную хроматографию (polishing) с последующим обессоливанием и концентрированием методом ультрафильтрации/диафильтрации на картриджных концентраторах Pierce Protein Concentrators PES, полностью соответствует современным мировым стандартам. M. Boumaiza и соавт. в своей работе также подтвердили, что комбинация ультрафильтрации и аффинной хроматографии обеспечивает чистоту RBD >95 %. J. Poodts и соавт. использовали аналогичную матрицу Nuvia IMAC Ni-NTA после этапа TFF, достигнув чистоты более 95 % за один хроматографический шаг.

Внедрение полигистидиновой метки в конструкции позволило осуществлять высокоселективную элюцию градиентом имидазола до 500 мМ, что минимизировало коэлюцию белков клетки-хозяина. Важнейшим показателем качества очищенных субстанций стало содержание бактериальных эндотоксинов: 0,2 ЭЕ/мкг белка для S-ECD и 0,15 ЭЕ/мкг белка для RBD, то

есть в 5,0 и 6,7 раза ниже нормы, установленной спецификацией на активную фармацевтическую субстанцию (не более 1,0 ЭЕ/мкг белка). В отличие от бактериальных систем экспрессии (*E. coli*), где удаление эндотоксинов представляет собой сложнейшую технологическую проблему, использование клеток насекомых и бессывороточных сред (ExpiSf CD) изначально снижает риски контаминации липополисахаридами, делая процесс более предсказуемым и безопасным.

Обобщая вышеизложенное, разработанная технология получения рекомбинантных белков Spike и RBD в суспензионной бакуловирусной системе *ExpiSf9*™ демонстрирует высокую надежность и полное соответствие современным трендам биофармацевтического производства. Подобранные параметры Upstream-процесса (MOI=5, изотермический режим 27 °C, сбор на 72 ч) и отработанная каскадная схема Downstream-процесса (лиз с неионным детергентом, Ni-NTA хроматография) позволили получить целевые активные фармацевтические субстанции с чистотой >95 % и благоприятным профилем биобезопасности в исследованных условиях. Сравнение с аналогичными исследованиями последних лет подтверждает, что предложенная биотехнологическая платформа пригодна к масштабированию и экономически обоснована и применима для масштабирования при условии переноса процесса в суспензионные биореакторы в рамках создания субъединичных вакцин против COVID-19.

Полученные нами доклинические данные были опубликованы в серии ведущих международных рецензируемых изданий [91,95,96], которые легли в основу настоящего обсуждения.

Ключевым фактором, определившим высокую эффективность внутримышечной вакцины NARUVAX-C19, стал выбор полноразмерного экстраклеточного домена спайкового белка (S-ECD) в комбинации с масляным наноэмульсионным адъювантом типа «масло-в-воде» (Sepivac SWE). Исследования на мышах показали, что двукратная иммунизация данной композицией индуцирует выраженный и сбалансированный Th1/Th2 иммунный ответ, что подтверждается сопоставимыми уровнями изотипов IgG1 и IgG2a, а также секрецией как Th1 (IFN-γ, IL-2), так и Th2 цитокинов.

Эти результаты полностью согласуются с современными представлениями о механизме действия скваленовых эмульсий (аналогов MF59 и AS03). Как отмечается в независимых источниках, скваленовые адъюванты работают не за счет создания «депо» антигена, в отличие от гидроксида алюминия, а путем формирования транзиторного локального воспалительного микроокружения в месте инъекции, что приводит к быстрому привлечению нейтрофилов, моноцитов и дендритных клеток, а также высвобождению эндогенных сигналов опасности, таких как внеклеточный АТФ. Это стимулирует надежный адаптивный ответ с высокими титрами аффинных антител. Данный вывод подтверждается и недавним исследованием Choque-Guevara и соавт. [90], где было показано, что формулирование RBD-домена SARS-CoV-2 именно со скваленовыми адъювантами значительно улучшает

клеточную и гуморальную иммуногенность у грызунов по сравнению с антигеном без адъюванта.

В работе опубликованной в *npj Vaccines* [95] было проведено прямое сравнение иммуногенности полноразмерного S-ECD и мономерного RBD. Было установлено, что вакцина на основе S-ECD генерирует значительно более высокие титры вируснейтрализующих антител, в том числе перекрестно-нейтрализующих антител к варианту Delta и обеспечивает у сирийских хомяков защиту, характеризовавшуюся отсутствием потери массы тела и блокированием репликации вируса в исследованных условиях. Кроме того, только вакцина на основе S-ECD смогла предотвратить передачу вируса наивным животным при совместном содержании.

Исследования на макаках-резусах [96] подтвердили высокую безопасность и трансляционный потенциал NARUVAX-C19 на приматах. Введение двух доз вакцины не вызывало побочных эффектов и приводило к формированию высоких титров антител, блокирующих связывание RBD с ACE2, а также выраженной Т-клеточной пролиферации и выработке IFN-γ. Интересно отметить, что мы наблюдали обратный дозозависимый эффект или эффект «плато», когда доза антигена 5 мкг оказалась столь же эффективной, как и 25 мкг.

Несмотря на успехи системных вакцин, они, как правило, не способны формировать надежный местный иммунитет на слизистых оболочках верхних дыхательных путей – первичных входных воротах SARS-CoV-2. Для решения этой проблемы нами была разработана нановакцина NARUVAX-C19/Nano. Использование катионного хитозана, модифицированного маннозой, позволило обеспечить мукоадгезию и таргетную доставку антигена (RBD) к антигенпрезентирующим клеткам (через маннозные рецепторы макрофагов), а включение агониста TLR9 (CpG) усилило Т-клеточный ответ.

Результаты, опубликованные [91] в *Scientific Reports* (2023), выявили уникальный профиль иммунного ответа: интраназальная вакцинация мышей индуцировала высокие уровни секреторного IgA (sIgA) в легких и сыворотке, а также выраженный Th1-поляризованный клеточный ответ (IFN-γ, IL-2, TNF-α), но при этом полностью отсутствовали сывороточные IgG и нейтрализующие антитела. Тем не менее, несмотря на отсутствие циркулирующих антител, нановакцина защитила сирийских хомяков от развития клинического заболевания: у животных достоверно снижалась вирусная нагрузка в дыхательных путях и отсутствовали признаки острой легочной патологии (ОРДС).

Создание интраназальной композиции NARUVAX-C19/Nano, включающей антиген RBD, хитозано-маннозную систему доставки и адъювант CpG55.2, было направлено именно на формирование локального иммунного барьера. Опыты *in vivo* на мышиных моделях продемонстрировали, что двукратная аппликация препарата на слизистые оболочки дыхательных путей инициирует интенсивную секрецию IgA (как в сыворотке, так и в бронхоальвеолярном лаваже), сопровождаемую выраженным Th1-клеточным ответом с продукцией интерферона-гамма (IFN-γ) и интерлейкина-2 (IL-2).

Интересно отметить, что несмотря на отсутствие в сыворотке крови выявляемых пулов IgG и вируснейтрализующих антител, данная форма обеспечила надежную протекцию сирийских хомяков: животные были защищены от специфической пневмонии и критической потери массы тела, а вирусная нагрузка в респираторном тракте существенно снизилась после инфицирования SARS-CoV-2.

Подобный иммунологический феномен хорошо согласуется с актуальными данными мировой литературы. В отличие от аденовирусных векторов (например, реплицирующихся систем Ad4-S или ChAd-SARS-CoV-2-S), которые обеспечивают активную внутриклеточную экспрессию антигена и выраженный системный IgG-ответ, интраназальные субъединичные платформы фокусируют защитный потенциал непосредственно в слизистых оболочках. Так, независимые испытания белковых вакцин на макаках-резусах [97] подтвердили, что мукозальный бустер вызывает довольно слабый системный гуморальный и Т-клеточный ответ по сравнению с классической внутримышечной инъекцией. Однако именно такой путь введения генерирует в дыхательных путях значительные концентрации димерного IgA и IFN-α. Эти секреторные антитела, активную выработку которых индуцировала и наша нановакцина, выполняют функцию физического щита, препятствуя связыванию вириона с рецепторами ACE2 еще на этапе проникновения. Аналогичные выводы о критической роли пути доставки были сделаны при изучении вакцин на базе везикул наружной мембраны (OMV-Spike) – лишь интраназальная аппликация приводила к накоплению IgA в респираторном тракте, в то время как внутримышечная инъекция такого эффекта не давала.

Одной из сложнейших задач в профилактике COVID-19 остается прерывание цепочки передачи возбудителя, достижение так называемого «стерилизующего иммунитета». В рамках наших экспериментов инъекционная форма NARUVAX-C19 продемонстрировала способность эффективно снижать или полностью блокировать трансмиссию штаммов дикого типа и варианта Delta. Нановакцина NARUVAX-C19/Nano, напротив, не предотвратила передачу вируса наивным контактным животным, хотя и надежно защитила самих иммунизированных хомяков от тяжелой патологии легких.

Анализ этого ограничения позволяет выделить два ключевых фактора. Во-первых, антигенной мишенью в нанопрепарате служил мономерный рецептор-связывающий домен (RBD). Как показывают исследования, полноразмерный белок Spike, используемый в инъекционной форме NARUVAX-C19, обладает более широким репертуаром Т- и В-клеточных эпитопов, что обеспечивает более плотную и многовекторную вирусную нейтрализацию. Во-вторых, стратегия, опирающаяся исключительно на интраназальную доставку белковых субъединиц, судя по всему, обладает недостаточным потенциалом для формирования абсолютного стерилизующего иммунитета без предварительной системной подготовки организма.

В этом контексте наиболее перспективной выглядит стратегия гетерологичного прайм-буста, получившая в зарубежной литературе название «Prime and Spike». Недавние масштабные работы, в частности, исследования

Sui и соавт. [98], доказывают: комбинация внутримышечного праймирования мРНК-вакциной и последующего интраназального бустирования субъединичным препаратом способна полностью остановить воздушно-капельную трансмиссию SARS-CoV-2 у хомяков. Внутримышечная моновакцинация с этой задачей не справлялась. Иммунологической основой такой эффективности является механизм направленного хоминга: мукозальный бустер привлекает уже сформированные системные B- и T-клетки памяти в эпителий дыхательных путей. Там они дифференцируются в резидентные клетки памяти, обеспечивая локальную секрецию высочайших титров IgA.

Подводя итоги доклинической оценки, можно констатировать, что полученные на лабораторных животных данные о безопасности, иммуногенности и протективной эффективности вакцин NARUVAX-C19 и NARUVAX-C19/Nano соответствуют современным направлениям развития вакцинологии. Внутримышечная форма NARUVAX-C19 в проведённых исследованиях хорошо переносилась, индуцировала системный гуморальный и клеточный иммунный ответ, а у привитых животных при заражении отмечено снижение выраженности поражения лёгких по сравнению с контролем. Интраназальная форма NARUVAX-C19/Nano индуцировала секреторные IgA в дыхательных путях и клеточный ответ с Th1-поляризацией, однако передачу вируса контактным животным не предотвращала. Полученные данные требуют подтверждения в дальнейших исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена разработке технологии приготовления двух экспериментальных вакцин против COVID-19 на основе рекомбинантных белков Spike и RBD, получаемых с использованием бакуловирусной системы экспрессии. Выбор субъединичной платформы обоснован профилем безопасности рекомбинантных белковых антигенов, технологической масштабируемостью бакуловирусной системы и возможностью её адаптации к другим респираторным патогенам с пандемическим потенциалом. Оценка полноты решения поставленных задач позволяет сформулировать следующие основные итоги работы:

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 создания инъекционной формы использован 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 % для S-ECD и RBD 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 по рФС-методу 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). Предвалидация технологического процесса на уровне орбитальных инкубаторов подтверждает воспроизводимость экспрессионной системы по критическим параметрам процесса и стабильность вирусного вектора. Для корректного трансфера технологии в условия пилотных суспензионных биореакторов определены расчетные физико-химические параметры перехода. Расчётные параметры перехода к суспензионным биореакторам включают поддержание коэффициента массопередачи кислорода (kLa) в диапазоне 5–10 $ч^{-1}$ и жестком контроле уровня растворенного кислорода не ниже 40 % от сатурации воздуха. Для предотвращения гидродинамического повреждения клеток насекомых при барботировании газов предусмотрено

лимитирование удельной мощности перемешивания (P/V) и введение в состав питательной среды полоксамеров в качестве протекторов клеточных мембран. Технологический процесс разработан в соответствии с принципами «встроенного качества» (Quality by Design) и требованиями Правил надлежащей производственной практики, что создаёт предпосылки для переноса технологии в условия промышленного производства.

3. На базе полученных субстанций разработаны составы и технологии получения двух лекарственных форм. Для внутримышечного введения создана вакцина NARUVAX-C19, представляющая собой кинетически устойчивую композицию рекомбинантного белка с наноэмульсионным масляным адъювантом Sepivac SWE, сохранявшую 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. Проведен комплекс доклинических исследований безопасности в условиях аккредитованной GLP-лаборатории (НЦЭЛС и МИ МЗ РК), который доказал, 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 предложены условия хранения при температуре от 2 до 8 °C без замораживания и 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 показана сохранность свойств 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.

Таким образом, поставленная цель диссертационной работы достигнута. Совокупность результатов, изложенных в главах 3 и 4, представляет собой последовательное описание технологии приготовления двух вакцин-кандидатов – от получения активной фармацевтической субстанции до готовой лекарственной формы, включая финишные операции и упаковку. 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 World Health Organization. WHO COVID-19 vaccine tracker and landscape [Электронный ресурс]. Geneva: World Health Organization, 2023. URL: https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19/covid-19-vaccine-tracker-and-landscape.

2 Zhao F. Challenges and developments in universal vaccine design against SARS-CoV-2 variants // Npj Vaccines. 2022. Т. 7, № 1. С. 167.

3 Martinez D. R. и др. Chimeric spike mRNA vaccines protect against Sarbecovirus challenge in mice // Science. 2021. Т. 373, № 6558. С. 991–998.

4 Guo L. Targetable elements in SARS-CoV-2 S2 subunit for the design of pan-coronavirus fusion inhibitors and vaccines // Signal Transduct. Target. Ther. 2023. Т. 8, № 1. С. 197.

5 Mao H. H., Chao S. Advances in Vaccines // Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology / под ред. Silva A. C. и др. Cham: Springer, 2019. С. 155–188.

6 O'Hagan D. T., Rappuoli R. The safety of vaccines // Drug Discov. Today. 2004. Т. 9, № 19. С. 846–854.

7 Cox M. M. J. Recombinant protein vaccines produced in insect cells // Vaccine. 2012. Т. 30, № 10. С. 1759–1766.

8 Premanand B., Zhong Wee P., Prabakaran M. Baculovirus Surface Display of Immunogenic Proteins for Vaccine Development // Viruses. 2018. Т. 10, № 6. С. 298.

9 Lu H.-Y., Chen Y.-H., Liu H.-J. Baculovirus as a vaccine vector // Bioengineered. 2012. Т. 3, № 5. С. 271–274.

10 Berger I., Fitzgerald D. J., Richmond T. J. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes // Nat. Biotechnol. 2004. Т. 22, № 12. С. 1583–1587.

11 Korn J. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production // Sci. Rep. 2020. Т. 10, № 1. С. 21393.

12 Felberbaum R. S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors // Biotechnol. J. 2015. Т. 10, № 5. С. 702–714.

13 Kyriakidis N. C. и др. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates // Npj Vaccines. 2021. Т. 6. С. 28.

14 Greinacher A. и др. Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination // N. Engl. J. Med. 2021. Т. 384, № 22. С. 2092–2101.

15 Control C. for D., Prevention. Storage and handling of Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine. 2021.

16 Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development // Nature. 2020. Т. 586, № 7830. С. 516–527.

17 Buchholz U. J. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity // Proc. Natl. Acad. Sci. 2004. Т. 101, № 26. С. 9804–9809.

18 Jiang S., Hillyer C., Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses // Trends Immunol. 2020. Т. 41, № 5. С. 355–359.

19 Lan J. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor // Nature. 2020. Т. 581, № 7807. С. 215–220.

20 Lee W. S. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies // Nat. Microbiol. 2020.

21 Moreno-Fierros L., García-Silva I., Rosales-Mendoza S. Development of SARS-CoV-2 vaccines: should we focus on mucosal immunity? // Expert Opin. Biol. Ther. 2020. Т. 20, № 8. С. 831–836.

22 Le Bert N. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls // Nature. 2020. Т. 584, № 7821. С. 457–462.

23 Belyakov I. M., Ahlers J. D. What Role Does the Route of Immunization Play in the Generation of Protective Immunity against Mucosal Pathogens? // J. Immunol. 2009. Т. 183, № 11. С. 6883–6892.

24 Turner D. L. Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells // Mucosal Immunol. 2014. Т. 7, № 3. С. 501–510.

25 Zhao J. Airway Memory CD4+ T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses // Immunity. 2016. Т. 44, № 6. С. 1379–1391.

26 Illum L. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions // J. Controlled Release. 2003.

27 Lapuente D., Fuchs J., Willar J. Protective mucosal immunity against SARS-CoV-2 after heterologous systemic prime-mucosal boost immunization // Nat. Commun. 2021. Т. 12, № 1.

28 Pati R. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases // Front. Immunol. 2018. Т. 9. С. 2224.

29 Zhao L. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems // Adv. Healthc. Mater. 2014.

30 Azizi P. M. Chitosan nanoparticles as a promising nanomaterial for mucosal delivery of vaccines // Int. J. Biol. Macromol. 2022.

31 Keler T. Mannose receptor-targeted vaccines // Expert Opin. Biol. Ther. 2004.

32 Apostolopoulos V., McKenzie I. F. C. Role of the mannose receptor in the immune response // Curr. Mol. Med. 2001. Т. 1, № 4.

33 Han Y. Mannose-Modified Chitosan-Nanoparticle-Based Salmonella Subunit OralVaccine-Induced Immune Response and Efficacy in a Challenge Trial in Broilers // Vaccines. 2020. Т. 8, № 2. С. 299.

34 Malik A. и др. Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery // Int. J. Nanomedicine. 2018. Т. 13. С. 7959–7970.

35 Polack F. P. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine // N. Engl. J. Med. 2020.

36 Oster M. E. Myocarditis Cases Reported After mRNA-Based COVID-19 Vaccination in the US From December 2020 to August 2021 // JAMA. 2022. Т. 327, № 4. С. 331–340.

37 Lederer K., Castaño D., Gómez Atria D. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation // Immunity. 2020. Т. 53, № 6. С. 1281–1295.

38 Baden L. R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine // N. Engl. J. Med. 2021.

39 Anderson E. J. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults // N. Engl. J. Med. 2020. Т. 383, № 25. С. 2427–2438.

40 Wu K., Werner A. P., Koch M. Serum Neutralizing Activity Elicited by mRNA-1273 Vaccine // N. Engl. J. Med. 2021. Т. 384, № 15.

41 Voysey M., Costa Clemens S. A., Madhi S. A. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK // The Lancet. 2021. Т. 397, № 10269. С. 99–111.

42 Schultz N. H. Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination // N. Engl. J. Med. 2021.

43 Folegatti P. M. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial // The Lancet. 2020. Т. 396, № 10249. С. 467–478.

44 Sadoff J. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19 // N. Engl. J. Med. 2021. Т. 384, № 23. С. 2187–2201.

45 See I., Lale A., Marquez P. Case Series of Thrombosis With Thrombocytopenia Syndrome After COVID-19 Vaccination – United States, December 2020 to August 2021 // Ann. Intern. Med. 2022.

46 Stephenson K. E., Le Gars M., Sadoff J. Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19 // JAMA. 2021.

47 Al Kaabi N. Effect of 2 Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines on Symptomatic COVID-19 Infection in Adults: A Randomized Clinical Trial // JAMA. 2021.

48 Xia S. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial // Lancet Infect. Dis. 2021. Т. 21, № 1. С. 39–51.

49 Xia S. Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials // JAMA. 2020.

50 Tanriover M. D. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey // The Lancet. 2021.

51 Zhang Y. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial // Lancet Infect. Dis. 2021.

52 Heath P. T. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine // N. Engl. J. Med. 2021. Т. 385. С. 1172–1183.

53 Keech C. Phase 1–2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine // N. Engl. J. Med. 2020.

54 Zakarya K. Safety and immunogenicity of a QazCOVID-in® inactivated whole-virion vaccine against COVID-19 in healthy adults: A single-centre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1 and an open-label phase 2

clinical trials with a 6 months follow-up in Kazakhstan // EClinicalMedicine. 2021. Т. 39. С. 101078.

55 Nabirova D. Effectiveness of four vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection in Almaty, Kazakhstan in 2021: retrospective population-based cohort study // Front. Public Health. 2023. Т. 11. С. 1205159.

56 Hoffmann M. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor // Cell. 2020. Т. 181, № 2.

57 Bertram S. TMPRSS2 Activates the Human Coronavirus 229E for Cathepsin-Independent Host Cell Entry and Is Expressed in Viral Target Cells in the Respiratory Epithelium // J. Virol. 2013. Т. 87, № 11. С. 6150–6160.

58 Greaney A. J. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies // Cell Host Microbe. 2021. Т. 29, № 3. С. 463–476.

59 Ahn Y. M. The impact of SARS-CoV-2 spike mutation on peptide presentation is HLA allomorph-specific // Curr. Res. Struct. Biol. 2024. Т. 7. С. 100148.

60 El Mazouri S. Genetic diversity and evolutionary dynamics of the Omicron variant of SARS-CoV-2 in Morocco // Pathog. Glob. Health. 2024. Т. 118, № 3. С. 241–252.

61 Wang Z. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants // Nature. 2021. Т. 592, № 7855. С. 616–622.

62 Barton M. I. Effects of common mutations in the SARS-CoV-2 Spike RBD and its ligand, the human ACE2 receptor on binding affinity and kinetics // eLife. 2021. Т. 10. С. e70658.

63 Demone J. Scalable agroinfiltration-based production of SARS-CoV-2 antigens for use in diagnostic assays and subunit vaccines // PLOS ONE. 2022. Т. 17, № 12. С. e0277668.

64 Schwestka J. Impact of Specific N-Glycan Modifications on the Use of Plant-Produced SARS-CoV-2 Antigens in Serological Assays // Front. Plant Sci. 2021. Т. 12. С. 747500.

65 Tantiwiwat T. Utilization of Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in Escherichia coli for the Development of Neutralizing Antibody Assay // Mol. Biotechnol. 2022.

66 Gstöttner C. Structural and Functional Characterization of SARS-CoV-2 RBD Domains Produced in Mammalian Cells // Anal. Chem. 2021. Т. 93, № 17. С. 6839–6847.

67 Struble L. R. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-COV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding // Protein Sci. 2022. Т. 31, № 5. С. e4300.

68 Costa Clemens S. A. Interchangeability of different COVID-19 vaccine platforms as booster doses: A phase 3 study mimicking real-world practice // Vaccine. 2024. Т. 42, № 19. С. 3989–3998.

69 Arias-Arias J. L. Stable production of recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain in mammalian cells with co-expression of a fluorescent

reporter and its validation as antigenic target for COVID-19 serology testing // Biotechnol. Rep. 2023. Т. 37. С. e00780.

70 Hayden M. K. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Serologic Testing // Clin. Infect. Dis. 2024. С. ciae121.

71 Hussein N. A. Assessment of specific human antibodies against SARS-CoV-2 receptor binding domain by rapid in-house ELISA // Hum. Antibodies. 2022. Т. 30, № 2. С. 105–115.

72 Cibelli N. Advances in purification of SARS-CoV-2 spike ectodomain protein using high-throughput screening and non-affinity methods // Sci. Rep. 2022. Т. 12, № 1. С. 4458.

73 Rosano G. L., Ceccarelli E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges // Front. Microbiol. 2014. Т. 5. С. 172.

74 Jackson C. B. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2022. Т. 23, № 1. С. 3–20.

75 Brindha S., Kuroda Y. A Multi-Disulfide Receptor-Binding Domain (RBD) of the SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in E. coli Using a SEP-Tag Produces Antisera Interacting with the Mammalian Cell Expressed Spike (S1) Protein // Int. J. Mol. Sci. 2022. Т. 23, № 3. С. 1703.

76 Matsunaga R., Tsumoto K. Addition of arginine hydrochloride and proline to the culture medium enhances recombinant protein expression in Brevibacillus choshinensis: The case of RBD of SARS-CoV-2 spike protein and its antibody // Protein Expr. Purif. 2022. Т. 194. С. 106075.

77 Argentinian AntiCovid Consortium. Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in Pichia pastoris and mammalian cells // Sci. Rep. 2020. Т. 10, № 1. С. 21779.

78 Xing H. Display of receptor-binding domain of SARS-CoV-2 Spike protein variants on the Saccharomyces cerevisiae cell surface // Front. Immunol. 2022. Т. 13. С. 935573.

79 Maharjan P. M. Plant-Expressed Receptor Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Protein Elicits Humoral Immunity in Mice // Vaccines. 2021. Т. 9, № 9. С. 978.

80 Hong M. Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Т. 10. С. 994743.

81 Zhang Y. Site-specific N-glycosylation Characterization of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Proteins // Mol. Cell. Proteomics. 2021. Т. 20. С. 100058.

82 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Москва: Гриф и К, 2012.

83 Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123). Страсбург: Совет Европы, 1986.

84 OECD. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents: 9789264070684. Paris: OECD Publishing, 2008.

85 OECD. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion: 9789264185333. Paris: OECD Publishing.

86 High Technology Inc. BioChem SA Semi-Auto Chemistry Analyzer: Operation Manual [Электронный ресурс]. High Technology Inc.

87 World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization: fifty-fourth report: 9789241209878. Geneva: World Health Organization, 2005. T. 927.

88 GenScript. cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit. User Manual: L00847. GenScript.

89 Thermo Fisher Scientific. Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer User Guide: Pub. No. 100024235. Thermo Fisher Scientific.

90 Choque-Guevara R. Squalene in oil-based adjuvant improves the immunogenicity of SARS-CoV-2 RBD and confirms safety in animal models // PLOS ONE. 2022. T. 17, № 8. C. e0269823.

91 Tabynov K., Solomadin M., Turebekov N. An intranasal vaccine comprising SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain protein entrapped in mannose-conjugated chitosan nanoparticle provides protection in hamsters // Sci. Rep. 2023. T. 13, № 1. C. 12115.

92 Poodts J. Improved Expression of SARS-CoV-2 Spike RBD Using the Insect Cell-Baculovirus System // Viruses. 2022. T. 14, № 12. C. 2794.

93 Boumaiza M. Development of an Optimized Process for Functional Recombinant SARS-CoV-2 Spike S1 Receptor-Binding Domain Protein Produced in the Baculovirus Expression Vector System // Trop. Med. Infect. Dis. 2023. T. 8, № 11. C. 501.

94 Fernandes B. Insect Cells for High-Yield Production of SARS-CoV-2 Spike Protein: Building a Virosome-Based COVID-19 Vaccine Candidate // Pharmaceutics. 2022. T. 14, № 4. C. 854.

95 Tabynov K. An adjuvanted subunit SARS-CoV-2 spike protein vaccine provides protection against Covid-19 infection and transmission // Npj Vaccines. 2022. T. 7, № 1. C. 24.

96 Solomadin M. Evaluation of a SARS-CoV-2 spike protein ectodomain subunit vaccine with a squalene emulsion adjuvant in rodents and rhesus macaques // Hum. Vaccines Immunother. 2023. T. 19, № 2. C. 2258571.

97 Sui Y. Protection against SARS-CoV-2 infection by a mucosal vaccine in rhesus macaques // JCI Insight. 2021. T. 6, № 10. C. e148494.

98 Sui Y. Adjuvanted subunit intranasal vaccine reduces SARS-CoV-2 onward transmission in hamsters // Front. Immunol. 2025. T. 16. C. 1514845.

Приложение А

Проект нормативного документа
на гомогенную суспензию
NARUVAX-C19 – Вакцина субъединичная адъювантированная для профилактики COVID-19, 0,5 мл/доза

УТВЕРЖДЕН
Первый Заместитель Председателя
Правления-Ректора
_____ П.Ш.Ибрагимов
«__» _____ 2024г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА
РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК
«____» _____20__г.
М.П.

СОГЛАСОВАН
РГУ «Комитет медицинского фармацевтического контроля МЗ РК»
от «__» _____ 20__г.
№_____
М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Торговое наименование лекарственного препарата

NARUVAX - C19 - COVID-19 инфекциясын алдын алу суббірлікті адъювантталған вакцинасы, 0.5 мл/доза

NARUVAX - C19 - Вакцина субъединичная адъювантированная для профилактики COVID-19, 0.5 мл/доза

NARUVAX - C19 - Subunit adjuvanted vaccine for the prevention of COVID-19, 0.5 mL/dose

Форма: Гомогенная суспензия

Наименование и страна организации-производителя
Республика Казахстан, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения
Республика Казахстан, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

Наименование и страна организации-упаковщика
Республика Казахстан, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

НД РК 42-12854-20	Срок введения установлен с
Вводится впервые	«15» 11 2021 г.
	Срок действия до
	«15» 11 2024 г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ **ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**

1

Приложение Б

Проект нормативного документа на лиофилизат для приготовления раствора NARUVAX-C19/Nano – Нановакцина для профилактики COVID-19, 0,5 мл/доза

УТВЕРЖДЕН
Первый Заместитель Председателя Правления-Ректора
_____ П.Ш.Ибрагимов
«06» 06 2024г.

ЭКСПЕРТИЗА ПРОВЕДЕНА
РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК
«____» _____20__г.
М.П.

ПРИКАЗ
РГУ «Комитет медицинского фармацевтического контроля МЗ РК»
от «____» _____ 20__г.
№ _____
М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Наименование лекарственного препарата

NARUVAX - C19/Nano - COVID-19 инфекциясын алдын алу нановакцинасы, 0.5 мл/доза

NARUVAX - C19/Nano - Нановакцина для профилактики COVID-19, 0.5 мл/доза

NARUVAX - C19/Nano - Nanovaccine for the prevention of COVID-19, 0.5 mL/dose

Форма: Лиофилизат для приготовления раствора

Наименование и страна организации-производителя

Республика Казахстан, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

Наименование и страна владельца регистрационного удостоверения

Республика Казахстан, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

Наименование и страна организации-упаковщика

Республика Казахстан, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

НД РК 42-12854-50	Срок введения установлен с
Вводится впервые	«15» 11 2021 г.
	Срок действия до
	«15» 11 2031 г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ **ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**

Приложение В

Лабораторный регламент
на получение и оценку рекомбинантного белка Spike на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19

Для служебного пользования. Экз. №____

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель
Председателя Правления-Ректора
д.в.н., профессор
Ибрагимов Примкул
Шолпанкулович

«14» мая 2024 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на получение и оценка рекомбинантного белка Spike на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19

Срок действия регламента до «____» _____ 20 г.

Директор Международного
исследовательского центра вакцинологии,
к.в.н., профессор — Кайсар. К. Табынов

Специалист в области биологической
безопасности, иммунологии и вирусологии, PhD,
ассоциированный профессор — Кайрат. К. Табынов

Докторант PhD — М.В. Соломадин

Алматы 2024

Приложение Г

Лабораторный регламент
на получение и оценку рекомбинантного белка RBD на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19

Для служебного пользования. Экз. №____

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель
Председателя Правления-Ректора
д.в.н., профессор
Ибрагимов Примкул
Шолпанкулович

«_28_» мая 2024 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на получение и оценка рекомбинантного белка RBD на основе бакуловирусной технологии для создания вакцины против COVID-19

Срок действия регламента до «____» _____ 20 г.

Директор Международного
исследовательского центра вакцинологии,
к.в.н., профессор — Кайсар. К. Табынов

Специалист в области биологической
безопасности, иммунологии и вирусологии, PhD,
ассоциированный профессор — Кайрат. К. Табынов

Докторант PhD — М.В. Соломадин

Алматы 2024

Приложение Д

Отчет о научно-исследовательской работе

По теме: новая платформа интраназальной SARS-COV-2 вакцины на основе наночастиц: разработка дизайна и испытание на лабораторных моделях животных ИРН AP09259609

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан

Некоммерческое акционерное общество
КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ (НАО КазНАИУ)

Индекс УДК 615.371
Рег. № 0121РК00636
Инв. №

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Председателя
Правления- Ректора
НАО КазНАИУ
_____ П.Ш. Ибрагимов
"20" _____ 2023 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме:
НОВАЯ ПЛАТФОРМА ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ SARS-COV-2 ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ: РАЗРАБОТКА ДИЗАЙНА И ИСПЫТАНИЕ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЯХ ЖИВОТНЫХ
ИРН AP09259609
(заключительный)

Руководитель НИР,
Директор Международного центра
вакцинологии (МЦВ), канд. вет. наук, профессор _____ К.К. Табынов

Алматы 2023

Приложение Е

Копия постерного доклада, представленного на 16-м Вакцинном конгрессе

A subunit SARS-CoV-2 spike protein oil adjuvanted vaccine provides complete protection against infection and viral transmission

Kairat Tabynov[1,2], Maxim Solomadin[1], Nurkeldi Turebekov[3], Meruert Babayeva[1], Gleb Fomin[1], Toktassyn Yerubayev[3], Tlektes Yespolov1, Lei Li[4], Gourapura J. Renukaradhya[5], Nikolai Petrovsky[4], and Kaissar Tabynov[1,2*] (ktabynov@gmail.com)

[1]International Center for Vaccinology, Kazakh National Agrarian Research University (KazNARU), Almaty, Kazakhstan; [2]Preclinical Research Laboratory with Vivarium, M. Aikimbayev National Research Center for Especially Dangerous Infections, Almaty, Kazakhstan; [3]Central Reference Laboratory, M. Aikimbayev National Scientific Center for Especially Dangerous Infections, Almaty, Kazakhstan; [4]Vaxine Pty Ltd and Flinders University, Bedford Park, Australia; [5]Center for Food Animal Health, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University (OSU), Wooster, OH 44691 United States

Introduction. We developed a subunit COVID-19 vaccine called NARUVAX-C19 based on recombinant spike (rSpike) protein extracellular domain (ECD) expressed in insect cells that was then formulated with Sepivac SWE™, a nanoemulsion oil (SWE) adjuvant. In this study, we evaluated the antibody and T-cell responses and protective efficacy of the NARUVAX-C19 vaccine including against virus transmission. For comparison, vaccines based on recombinant monomeric receptor-binding domain (rRBD) protein formulated with oil adjuvants were also included.

Results

Antibody response in mice. After booster immunization, the adjuvanted rSpike protein groups at all three doses (1.25, 2.5, 5 μg) had high neutralizing antibodies titers (geometric mean titers [GMT] 475-706), which were significantly higher than the antigen alone group (GMT 11-20), the controls, and the corresponding groups immunized with SWE-adjuvanted rRBD antigen (GMT 20-40).

Vaccine immunogenicity in hamsters. The SWE-adjuvanted rSpike protein group had the highest titers of neutralizing antibodies (GMT 320), higher than levels in WT convalescent sera (GMT 160) and significantly higher than levels in the SWE-adjuvanted rRBD group (GMT 17.8)

Vaccine efficacy and transmission studies in hamsters. In Syrian hamsters, NARUVAX-C19 provided complete protection (**Fig 2**) against wild-type (D614G) infection and prevented its transmission to naïve animals (n = 2/group) placed in the same cage as challenged animals (n = 6/group)

T-cell immune response in mice. After two immunizations, both the SWE-adjuvanted rRBD and rSpike protein-induced robust cellular immune responses. SWE-adjuvanted rRBD and rSpike protein-induced significantly higher production of both Th1 (IFN-gamma, IL-2, TNF-α, IL-17A) and Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) cytokines compared to antigen-alone and SWE-alone control groups.

SWE-adjuvanted rRBD and rSpike protein-induced significantly higher CD4+ T cell proliferation the controls when stimulated with the corresponding rRBD or rSpike proteins. The CD8+ cell proliferation for SWE-adjuvanted rRBD and rSpike protein trended higher than the control groups **(Fig. 1)**.

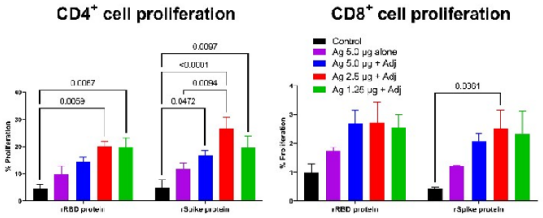


Fig. 1 Antigen-stimulated CD4 + and CD8 + T cell proliferation in splenocytes from rRBD or rSpike protein vaccinated BALB/c mice

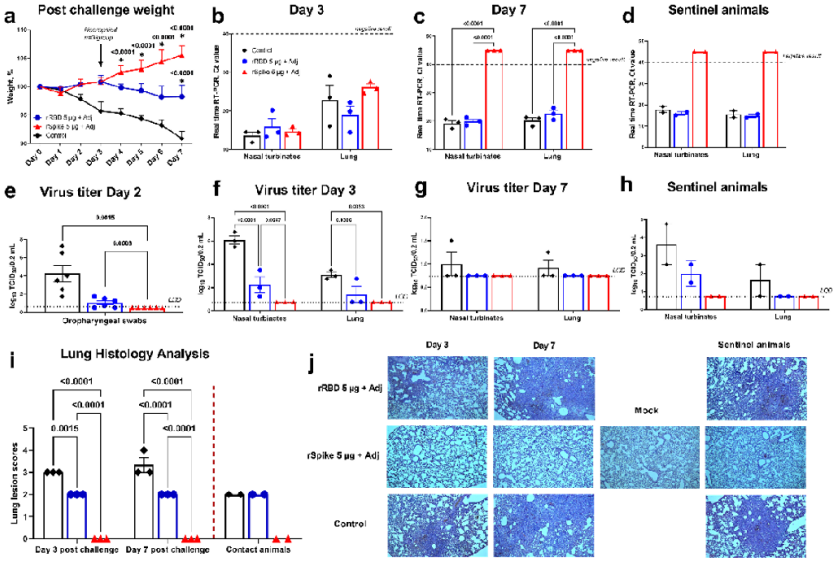


Fig 2. Vaccine protection in Syrian hamsters against SARS-CoV-2 infection and virus transmission.
To assess vaccine efficacy animals (n = 6/group) were intranasally infected with WT SARS -CoV-2 and the following parameters then measured: changes in body weight (**a**; n = 3-6/group); virus excretion from oropharyngeal swabs Day 2 post challenge (**e**; n = 6/group); viral load in nasal turbinates (n = 3/group) and lungs (n = 3/group) by PCR (represented by Ct; **b, c**) and culture of infectious virus (expressed as $\log_{10}$ $TCID_{50}$/0.2 mL; **f, g**); histopathological changes in the lungs (**i, j**), on Days 3 (n = 3/group) and 7 (n = 3/group) after challenge. Efficacy against virus transmission in contact sentinel animals (n = 2/group) was evaluated by detection of viral load (**d, h**), lung pathology scoring (**i, j**). Control included an adjuvant-alone group. Scale bars are 500 μm. Differences in the studied parameters between animal groups were assessed using Tukey's (virus titer; Lung Histology), Dunnett's (postchallenge weight), or Šidák's (viral load in PCR) multiple comparisons test. A $P < 0.05$ value was considered as a significant difference. * in comparison with the cont rol group. LOD limit of detection.

Acknowledgements: The authors thank Sandybaev N.T., Strochkov V.M., and Belousov V., for sequencing the SARS-CoV-2 viruses used in this study. Ryskeldova A.K., Esimseit D.T, Abdeliev B.Z. for help in PCR analysis for SARS-CoV-2. Turegeldieva D.A., Zhambyrbayeva L.S., and Sarmantayeva K.B., for care and maintenance of laboratory animals.

Funding: This research was supported by the grant AP09259609 funded by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan. Development of the recombinant spike protein was supported by National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health under Contracts HHS-N272201400053C and HHSN272201800024C.

Conclusion. A subunit vaccine based on a recombinant spike protein extracellular domain was immunogenic in mice and provided robust protection of Syrian hamsters against infection by wild-type SARS-CoV-2 (D614G) virus in addition to blocking virus transmission to naïve contact animals. The full rSpike ECD antigen was significantly more effective than the antigen only comprising the spike rRBD.

16th Vaccine Congress
12–14 September 2022 • Riva del Garda Congress Centre, Lake Garda, Italy

Tabynov K, et al. An adjuvanted subunit SARS-CoV-2 spike protein vaccine provides protection against Covid-19 infection and transmission. NPJ Vaccines. 2022 Feb 23;7(1):24.