© Коллектив авторов, 2020

Ковыршина А.В.¹, Должикова И.В.¹, Гроусова Д.М.¹, Балясин М.В.¹,
Ботиков А.Г.¹, Панина Л.В.¹, Гордейчук И.В.¹⁻³, Гуляев С.А.³, Зубкова О.В.¹,
Ожаровская Т.А.¹, Попова О.¹, Тухватулин А.И.¹, Токарская Е.А.¹,
Симакова Я.В.¹, Есмагамбетов И.Б.¹, Щебляков Д.В.¹, Евграфова И.М.¹,
Дерябин П.Г.¹, Борисевич С.В.⁴, Народицкий Б.С.^{1,2}, Логунов Д.Ю.¹,
Гинцбург А.Л.^{1,2}

Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 108819, г. Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «48-й центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад-6, Российская Федерация

Резюме

Введение. Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы с высокой летальностью, возбудителем которого является коронавирус БВРС-КоВ. В настоящее время в мире не существует специфических профилактических и терапевтических средств против БВРС. Вакцинопрофилактика позволит ограничить распространение данного заболевания и снизить летальность. Одной из ключевых характеристик вакцин является длительность индуцируемого иммунного ответа, от которой зависит продолжительность протективного эффекта вакцины. К сожалению, данных по длительности поствакцинального иммунного ответа для вакцин против БВРС сейчас недостаточно.

Цель исследования – определение длительности гуморального иммунного ответа у грызунов и приматов и протективного иммунного ответа после иммунизации комбинированной векторной вакциной против БВРС (БВРС-ГамВак-Комби), разработанной нами ранее.

Материал и методы. Длительность гуморального иммунитета исследовали на мышах линии C57BL/6 и обыкновенных грунках. Животных иммунизировали вакциной БВРС-ГамВак-Комби на основе рекомбинантных векторов rAd26 и rAd5. Титр антиген-специфических антител определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Титр вирус-нейтрализующих антител определяли с помощью реакции вирус-нейтрализации против вируса БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012). Длительность протективного иммунитета исследовали на модели летальной инфекции у трансгенных мышей, несущих ген человека *DPP4*, кодирующий рецептор к БВРС-КоВ.

Результаты. Исследование длительности поствакцинального гуморального иммунного ответа у грызунов и приматов показало, что вакцинация животных БВРС-ГамВак-Комби индуцирует формирование напряженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину S БВРС-КоВ, который сохраняется на протяжении не менее 18 мес. Также было показано, что вакцинация позволяет защитить 100 % животных от летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012, 100 ЛД₅₀/мышь), через 7 мес после иммунизации.

Заключение. Напряженность поствакцинального гуморального иммунного ответа, как правило, связана с протективностью вакцины. Одной из ключевых задач при дизайне

Для корреспонденции
Логунов Денис Юрьевич –
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
заместитель директора
по научной работе,
заведующий лабораторией
клеточной микробиологии
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: logunov@gamaleya.org
<https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

вакцин является обеспечение наиболее длительного напряженного иммунного ответа. Длительность поствакцинального иммунного ответа – одна из ключевых характеристик вакцин, которая требует контроля на различных этапах их разработки.

Ключевые слова: вакцина; аденовирусный вектор; ближневосточный респираторный синдром; длительность иммунитета

Статья поступила 16.01.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Ковыршина А.В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Тухватулин А.И., Токарская Е.А., Симакова Я.В., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Евграфова И.М., Дерябин П.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. Иммунология. 2020; 41 (2): 135–143. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143

Финансирование: Исследование выполнено в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 056-00108-18-00 и 056-00078-19-00.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kovyrshina A.V.¹, Dolzhikova I.V.¹, Grousova D.M.¹, Balyasin M.V.¹,
Botikov A.G.¹, Panina L.V.¹, Gordeychuk I.V.¹⁻³, Gulyaev S.A.³, Zubkova O.V.¹,
Ozharovskaya T.A.¹, Popova O.¹, Tukhvatulin A.I.¹, Tokarskaya E.A.¹,
Simakova Ya.V.¹, Esmagambetov I.B.¹, Shcheblyakov D.V.¹, Evgrafova I.M.¹,
Deryabin P.G.¹, Borisevich S.V.⁴, Naroditsky B.S.^{1,2}, Logunov D.Yu.¹,
Gintsburg A.L.^{1,2}

A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV

¹ Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

³ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 108819, st. Moskovskiy, Poliomyelitis Institute ts., Moscow, Russian Federation

⁴ 48 Central Research Institute, Ministry of Defense of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad-6, Russian Federation

Abstract

Introduction. Middle East respiratory syndrome (MERS) is acute inflammatory disease of respiratory system with a high mortality, caused by coronavirus MERS-CoV. At present moment, we still lack specific therapeutic preparations and vaccines against MERS. Vaccine administration can help to limit the spread of the disease and lower the mortality. Duration of vaccine-induced immune response is one of the key characteristics of a vaccine, which is connected with duration of its protective effectiveness. Unfortunately, the data on duration of vaccine-induced immune response against MERS is scarce.

The aim of the study was to determine duration of humoral immune response in mice and primates and duration of protective immune response in mice after immunization with the heterologous virus-vectored vaccine against MERS (BVRS-GamVac-Combi), developed earlier by our research group.

Material and methods. To study duration of humoral immune response, we used mice of C57BL/6 strain and common marmosets. Animals were immunized with the vaccine BVRS-GamVac-Combi, based on recombinant adenoviral vectors rAd26 and rAd5. Antigen-specific-antibody titers were determined with ELISA, virus-neutralizing antibody titers were measured with virus neutralization assay using MERS-CoV (EMC/2012). To study duration of protective immune response, we used a model of lethal infection on transgenic mice, carrying human *DPP4* gene of viral receptor.

For correspondence

Denis Yu. Logunov –
Dr.Sci. (Biological Sciences),
Corresponding Member of RAS,
Deputy Director for Research,
Head of the Laboratory
of Cell Microbiology,
Federal Research Center
for Epidemiology and Microbiology
named after Honorary Academician
N.F. Gamaleya, Moscow,
Russian Federation
E-mail: logunov@gamaleya.org
<https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Results. In present research, we showed that vaccination of animals with BVRS-GamVac-Combi induced robust humoral immune response, which persisted at least 18 months after immunization. In addition, our vaccine protected 100 % of animals from lethal infection for at least 7 months after immunization.

Conclusion. Strength of vaccine-induced immune response is generally connected with a protective effectiveness of a vaccine. One of the key problems of vaccine design is to find a way to provide as long and robust immune response as possible. Duration of vaccine-induced immune response is one of the key characteristics of a vaccine, which demands quality control during multiple steps of a vaccine development.

Keywords: vaccine; adenoviral vectors; Middle East respiratory syndrome (MERS); longevity of immune response

Received 16.01.2020. **Accepted** 20.02.2020.

For citation: Kovyrsina A.V., Dolzhikova I.V., Grousova D.M. Balyasin M.V., Botikov A.G., Panina L.V., Gordeychuk I.V., Gulyaev S.A., Zubkova O.V., Ozharovskaya T.A., Popova O., Tukhvatulina A.I., Tokarskaya E.A., Simakova Ya.V., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Evgrafova I.M., Deryabin P.G., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV. *Immunology*. 2020; 41 (2): 135–43. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143 (in Russian)

Funding. The study was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No 056-00108-18-00 and 056-00078-19-00.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Ближневосточный респираторный синдром (БВРС) – это острое воспалительное заболевание дыхательной системы, возбудителем которого является коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), относящийся к семейству коронавирусов (*Coronaviridae*), род бетакоронавирусов (*Betacoronavirus*). Данное заболевание было впервые диагностировано в июне 2012 г. в Саудовской Аравии [1, 2]. Согласно данным ВОЗ, на конец января 2020 г. зарегистрировано 2519 лабораторно подтвержденных случаев БВРС, в том числе 866 со смертельным исходом, летальность составляет около 34,3 % [3]. Большинство случаев БВРС зарегистрировано в Саудовской Аравии, однако заболевание также выявляли еще в 27 странах, завозные случаи инфекции были зарегистрированы в Европе, Северной Африке, Северной Америке и Азии [4]. Естественным резервуаром вируса являются одногорбые верблюды, заражение человека происходит при контакте с верблюдами, употреблении непастеризованного верблюжьего молока, возможен аэрозольный путь передачи инфекции среди верблюдов, от верблюдов к человеку, а также от человека к человеку [5, 6]. Несмотря на то что в предыдущих вспышках инфекции передача от человека к человеку имела ограниченный характер, сохраняется риск адаптации вируса и повышения контагиозности при передаче между людьми, что представляет потенциальную угрозу для глобального благополучия [7]. Эксперты ВОЗ относят БВРС-КоВ к агентам с пандемическим потенциалом в связи с широким распространением резервуара инфекции, высоким уровнем летальности, отсутствием популяционного иммунитета и эффективных профи-

лактических и терапевтических средств против БВРС. В России на настоящий момент не зафиксированы случаи БВРС, однако в связи с сохраняющейся угрозой распространения БВРС за пределы эндемичных районов и высокой летальностью инфекции [8] разработка вакцинного препарата является актуальной задачей.

Формирование выраженного и длительного иммунного ответа – одна из ключевых задач при разработке вакцин. Перспективной платформой для производства вакцинных препаратов являются рекомбинантные вирусные векторы для доставки антигена. Такие векторы обеспечивают длительную экспрессию антигена в клетках иммунизируемого организма, что приводит к развитию выраженного иммунного ответа. Для формирования длительного иммунного ответа целесообразно проводить двукратную вакцинацию, при этом наиболее оптимальной схемой является гетерологичная вакцинация, когда для первичной и вторичной иммунизации используют различные вирусные векторы [9]. Такой подход был успешно реализован нами при разработке комбинированной векторной вакцины для профилактики болезни, вызванной вирусом Эбола, зарегистрированной в России для медицинского применения в 2015 г. [10].

Нами разработана комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующих гликопротеин вируса БВРС-КоВ (изолят MERS-CoV EMC/2012) – БВРС-ГамВак-Комби. На настоящий момент завершены доклинические исследования безопасности и иммуногенности вакцины, по результатам которых не выявлено противопоказаний к проведению клинических исследований. Начаты клини-

ческие исследования безопасности и иммуногенности комбинированной векторной вакцины [11]. В настоящем исследовании представлены результаты исследования длительности поствакцинального иммунного ответа у грызунов и приматов.

Материал и методы

Исследуемый препарат. Состав комбинированной векторной вакцины для профилактики БВРС в форме лиофилизатов для приготовления раствора для внутримышечной инъекции:

- Компонент 1 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 26 серотипа (rAd26), несущие ген рецептор-связывающего домена гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) на дозу.
- Компонент 2 – рекомбинантные частицы на основе аденовируса человека 5 серотипа (rAd5), несущие ген полноразмерного гликопротеина БВРС-КоВ и ген рецептор-связывающего домена (RBD) гликопротеина БВРС-КоВ, 10^{11} в.ч. на дозу.

Препарат произведен в условиях биотехнологического производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Лабораторные животные. Самки мышей (*Mus musculus*) линии C57BL/6 (18–20 г) в возрасте 6 нед получены из питомника Пущино (Россия). Мыши имели свободный доступ к пище и воде. Животные были размещены в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия).

Трансгенные мыши-гибриды F1 получены в результате скрещивания трансгенных гомозиготных самцов +/+, несущих ген рецептора дипептидил-пептидазы (DPP4) человека (hDPP4) (Медицинский университет Техаса, США) и нетрансгенных самок линии C57BL/6 (Пущино, Россия). Мыши имели свободный доступ к пище и воде. Животные были размещены в системе содержания животных ISOcage (Tecniplast, Италия). Экспрессия трансгена у мышей-гибридов F1 была подтверждена методом иммуноблоттинга.

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*) рождены в специализированном виварии ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Москва, Россия). Животные содержались в Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» в соответствии с требованиями к условиям содержания лабораторных приматов. Все экспериментальные манипуляции с игрунками проводились сертифицированным специалистом, имеющим сертификат Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA) и прошедшим курс обучения работе с приматами (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция) – программа Laboratory Animal Science for Researchers – Non-Human Primates (Наука о лабораторных животных для исследо-

вателей – Нечеловекообразные приматы). Животных в эксперименте идентифицировали введением под кожу RFID-чипа с уникальным 15-значным кодом (Globalvet, Москва).

Эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации (ГОСТ Р 53434-2009, «Принципы надлежащей лабораторной практики»).

Иммунизация и отбор образцов сывороток крови мышей и обыкновенных игрунок. Мышей иммунизировали двукратным внутримышечным введением 3×10^7 в.ч./животное, последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы крови мышей отбирали до иммунизации, через 12 и 18 мес после иммунизации.

Иммунизацию игрунок проводили двукратным внутримышечным введением дозы 10^{11} в.ч./животное, последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Образцы крови собирали до иммунизации, через 12 мес после иммунизации. Сыворотки крови получали путем выдерживания образцов крови при 37 °C в течение 30 мин, затем центрифугирования в течение 15 мин при 450g, после чего отбирали сыворотку. При наличии эритроцитов в сыворотке образцы центрифугировали повторно.

Определение титра антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Титр гликопротеин-специфических антител в сыворотке определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигена применяли белки гликопротеин S БВРС-КоВ (40069-V08B; Sino Biological) и RBD (рецептор-связывающий домен гликопротеина S БВРС-КоВ) (40071-V08B1; Sino Biological). Забивку проводили фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) с добавлением 0,1 % Твин 20 (ФСБ-Т) и 5 % обезжиренного молока (A0830; AppliChem, Испания). Сыворотку титровали двукратным шагом в растворе ФСБ-Т с добавлением 3 % обезжиренного молока. Для детекции гликопротеин-специфических IgG мыши применяли вторичные антитела анти-IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (NXA931; GE Healthcare, США). Для детекции гликопротеин-специфических IgG игрунок применяли сыворотку кролика, предварительно иммунизированного IgG мармозет, и вторичные антитела анти-IgG кролика конъюгированные с пероксидазой хрена (NA934V; GE Healthcare, США). Проявление проводили раствором тетраметилбензидина («НИИОПик», Россия). Реакцию останавливали добавлением 1M H₂SO₄, оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD₄₅₀) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific). Титр IgG определяли как максимальное разведение сыворотки, при котором значение OD₄₅₀ сыворотки иммунизированного животного превосходит значение контрольной сыворотки (сыворотка контрольного неиммунизированного животного или животного до иммунизации) более чем в 2 раза.

Определение титра вирус-нейтрализующих анти-тел. Определение титра вирус-нейтрализующих анти-тел в сыворотке крови иммунизированных животных определяли в реакции нейтрализации по подавлению цитопатического действия, вызванного вирусом БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в монослое клеток Vero B. Реакцию нейтрализации ставили в варианте: постоянная доза вируса – разведения сыворотки. Сыворотку крови мышей инактивировали при температуре 56 °C в течение 30 мин для удаления неспецифических ингибиторов. Разведения всех сывороток готовили на среде DMEM с 2 % инактивированной фетальной бычьей сывороткой, начиная с 1 : 10, затем двукратным шагом до 1 : 5120. Разведения вирус-содержащей суспензии на основе вируса БВРС-КоВ готовили на среде DMEM с 2 % инактивированной фетальной бычьей сывороткой. В приготовленном разведении концентрация вируса БВРС-КоВ составила 1000 ТЦД₅₀/мл. Смесь сыворотки и суспензии вируса 1 : 1 инкубировали в течение 60 мин при 37 °C. Клетки Vero B рассевали в 96-луночные планшеты в количестве 4×10^4 клеток/лунку в объеме 100 мкл, затем к ним добавляли 100 мкл смеси сыворотки и суспензии вируса. Через 4 сут оценивали развитие цитопатического действия. За титр вирус-нейтрализующих антител в исследуемой сыворотке принимали высшее ее разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия в 2 лунках из 3 (по сравнению с контрольными сыворотками).

Исследование длительности протективного иммунитета на модели летальной инфекции БВРС-КоВ у мышей. Исследование длительности протективного иммунитета проводили на модели летальной инфекции у мышей. Использовали мышей-гибридов F1, несущих ген рецептора hDPP4 человека, полученных от скрещивания гомозиготных трансгенных самцов *hdpp4*^{+/+} и нетрансгенных самок линии C57BL/6. Мышей иммунизировали внутримышечно, 3×10^7 в.ч./животное, двукратно последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Через 7 мес после иммунизации животных интраназально заражали БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД₅₀ на животное, затем ежедневно наблюдали выживаемость в течение 30 дней. После завершения эксперимента животных подвергали усыплению.

Статистический анализ

Результаты исследования статистически анализировали в программе GraphPad Prism версии 7.0 (GraphPad Software, США). Данные проверяли на нормальное распределение методом Д’Агостино–Пирсона. Достоверность различий между независимыми выборками оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок или *U*-критерия Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. Для связанных выборок применяли парный *t*-критерий Стьюдента или парный критерий Вилкоксона, в зависи-

Рис. 1. Титры гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови иммунизированных мышей через 12 и 18 мес после вакцинации

По оси абсцисс – время после иммунизации, по оси ординат – реципрокные титры гликопротеин-специфических IgG относительно сывороток контрольных (неиммунизированных) мышей. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % достоверный интервал ($n = 6$).

мости от нормальности распределения данных [12]. Достоверность статистических различий принимали при значении $p < 0,05$ [13].

Результаты

Иммунизация комбинированной векторной вакциной индуцирует формирование длительного выраженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину БВРС-КоВ у грызунов

Длительность гуморального иммунного ответа у грызунов после иммунизации разработанной вакциной исследовали на мышах (*Mus musculus*). Мышей внутримышечно иммунизировали вакциной в дозе 3×10^7 в.ч./животное последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Далее у животных отбирали сыворотку крови через 12 и 18 мес после иммунизации и определяли титры антител, специфических к гликопротеину S БВРС-КоВ. Исследования длительности поствакцинального иммунного ответа у грызунов показали, что у иммунизированных мышей через 12 и 18 мес после иммунизации в сыворотке крови детектируются гликопротеин-специфические IgG в высоком титре: среднее геометрическое титров составило 1 : 182456 через 12 мес 1 : 81275 через 18 мес (рис. 1).

Также определяли титры вирус-нейтрализующих антител к БВРС-КоВ в сыворотках крови мышей через 12 мес после иммунизации: среднее геометрическое титра вирус-нейтрализующих антител составило 1 : 90 (рис. 2). В сыворотке крови контрольных мышей вирус-нейтрализующие антитела не детектированы.

Рис. 2. Титры вирус-нейтрализующих антител в сыворотках крови мышей через 12 мес после вакцинации

По оси ординат – реципрокные титры нейтрализующих антител к вирусу БВРС-КоВ. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % доверительный интервал ($n = 6$).

Иммунизация комбинированной векторной вакциной индуцирует формирование длительного выраженного гуморального иммунного ответа к гликопротеину БВРС-КоВ у приматов

Длительность гуморального иммунного ответа у приматов исследовали на обыкновенных игрунках (*Callithrix jacchus*). Животных иммунизировали комбинированной вакциной внутримышечно в дозе 10^{11} в.ч./животное, двукратно, последовательно компонентом 1 и компонентом 2 с интервалом в 21 день. Было показано, что через 12 мес после иммунизации у приматов сохраняются высокие титры гликопротеин-специфических IgG. У иммунизированных обезьян

Рис. 3. Выживаемость мышей при заражении БВРС-КоВ через 7 мес после иммунизации комбинированной векторной вакциной против БВРС

через 12 мес после вакцинации титр гликопротеин-специфических антител составил $1 : 3276800$, титр нейтрализующих антител к вирусу БВРС-КоВ – $1 : 2560$ – $1 : 5120$.

Иммунизация грызунов комбинированной векторной вакциной обеспечивает формирование длительного протективного иммунного ответа против летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ

Трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, иммунизировали вакциной в дозе 3×10^7 в.ч./животное внутримышечно, двукратно, последовательно компонентом 1 и 2 с интервалом в 21 день. Через 7 мес после иммунизации животных заражали БВРС-КоВ (MERS-CoV EMC/2012) в дозе 100 ЛД₅₀ на животное и анализировали выживаемость в течение 30 дней (рис. 3). Выживаемость в опытной группе животных, иммунизированных комбинированной векторной вакциной, составила 100 % (10/10). Выживаемость в контрольной группе неиммунизированных животных составила 0 % (0/10). Животные в контрольной группе погибли в течение 9 дней.

Обсуждение

Разработка вакцины против БВРС является актуальной задачей, учитывая постоянный контакт человека с верблюдами – естественными резервуарами БВРС-КоВ, возможность передачи вируса от человека к человеку, широкую географию распространения инфекции во время вспышек прошлых лет, высокую летальность и отсутствие специфических профилактических и терапевтических средств против БВРС. Исследования по разработке вакцин против этого заболевания ведутся в ряде стран (в США, Германии, Корее, Китае, Великобритании и др.). К настоящему времени завершены клинические исследования первой фазы вакцины на основе плазмидной ДНК GLS-5300, а также вакцины на основе вируса осповакцины MVA-MERS-S [14, 15]. Все вакцины, вышедшие в клинические исследования, основаны на использовании гликопротеина S вируса БВРС-КоВ, который взаимодействует с рецептором DPP4 на поверхности клетки и обеспечивает интернализацию вируса. Предотвращение такого взаимодействия позволяет ограничить проникновение вируса в клетки и его последующую репликацию.

Одной из ключевых характеристик вакцин является длительность поствакцинального иммунного ответа. Для подавляющего большинства вакцин развитие протективного иммунного ответа коррелирует с их способностью индуцировать синтез специфических вирус-нейтрализующих антител. Для разных патогенов пороговые значения концентраций (и, соответственно, титров) антител, обеспечивающих протективный иммунитет, различаются [16, 17]. Поэтому при исследовании иммуногенности вакцин длительность выраженного гуморального иммунного ответа является значимой характеристикой. Согласно профилю целевого продукта (TPP – target product profile) ВОЗ по разработке вакцин

против БВРС [18], для вакцин, применяемых у людей для формирования долгосрочного протективного иммунитета (например, для использования в эндемичных регионах в отсутствие вспышек эпидемии), предпочтительному профилю требований соответствует обеспечение протективного иммунитета на 5 лет, минимальному профилю требований – на 3 года после праймирующей вакцинации. Таким образом, важно контролировать соответствие вакцины необходимым требованиям по длительности иммунного ответа на различных этапах ее разработки.

Использование рекомбинантных вирусных векторов для доставки антигена при вакцинации позволяет индуцировать мощный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Для формирования длительного иммунного ответа важно использовать двукратную иммунизацию [9], однако при использовании рекомбинантных вирусных векторов необходимо учитывать, что эффективность бустерной иммунизации может быть снижена, поскольку после первичной иммунизации ответ развивается не только на целевой антиген, но и на компоненты вектора. В связи с этим перспективным подходом является использование схемы гетерологичной прайм-буст-вакцинации, когда для первичной и для вторичной иммунизации используют различные рекомбинантные вирусные векторы [10], который был реализован при разработке комбинированной векторной вакцины против БВРС.

В настоящее время долгосрочный (через несколько месяцев после иммунизации) иммунный ответ, индуцируемый вакцинами против БВРС-КоВ еще недостаточно исследован. W. Jia и соавт. исследовали иммуногенность и протективность вакцины на основе рекомбинантного вектора аденовируса шимпанзе 68 серотипа, экспрессирующего гликопротеин S БВРС-КоВ (rAdC68). В модели летальной инфекции БВРС-КоВ выживаемость иммунизированных мышей через 10 нед после иммунизации составила 100 %, в контрольной группе – 0 % [19].

Исходя из представленных данных видно, что разработанная нами вакцина на основе рекомбинантных векторов rAd26 и rAd5 индуцирует мощный длительный гуморальный иммунный ответ (специфические IgG и вирус-нейтрализующие антитела). По результатам исследования длительности поствакцинального иммунного ответа было показано, что иммунизация животных разработанной вакциной позволяет сформировать длительный выраженный гуморальный иммунный ответ, который сохраняется на протяжении не менее 18 мес после иммунизации. При исследовании разработанной комбинированной векторной вакцины у мышей обнаружено, что специфические антитела в сыворотке крови животных детектируются спустя 18 мес после иммунизации в высоких титрах. Исследование протективной эффективности вакцины на модели летальной инфекции, вызванной БВРС-КоВ, у трансгенных мышей, несущих ген рецептора DPP4 человека, продемонстрировало, что иммунизация животных по-

Рис. 4. Титры гликопротеин-специфических IgG-антител в сыворотках крови здоровых добровольцев, иммунизированных расчетной терапевтической дозой комбинированной векторной вакцины, через 28 и 90 дней после первичной вакцинации

По оси абсцисс – время после иммунизации; по оси ординат – реципрокные титры гликопротеин-специфических IgG относительно сывороток добровольцев, взятых до иммунизации. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % доверительный интервал ($n = 20$).

зволяет защитить их от летальной инфекции БВРС-КоВ (100 ЛД₅₀) через 7 мес после вакцинации. Исследование длительности гуморального иммунного ответа у приматов (обыкновенные игрунки) показало, что через 12 мес после вакцинации у обезьян в сыворотке крови детектируются гликопротеин-специфические антитела и вирус-нейтрализующие антитела к БВРС-КоВ в высоких титрах.

Также на настоящий момент завершена первая фаза клинических исследований безопасности и иммуногенности комбинированной векторной вакцины для профилактики БВРС – БВРС-ГамВак-Комби [11]. Согласно предварительным результатам, подтверждены хорошая переносимость и безопасность вакцины, а также ее высокая иммуногенность. Показано, что вакцина индуцирует развитие мощного гуморального иммунного ответа, который сохраняется на протяжении не менее 90 дней после иммунизации. Так, среднее геометрическое титров гликопротеин-специфических IgG в сыворотках крови здоровых добровольцев составило 1 : 15361 через 28 дней после первичной вакцинации и 1 : 2884 через 90 дней после первичной вакцинации (рис. 4).

Геометрическое среднее титров вирус-нейтрализующих антител в сыворотках крови здоровых добровольцев, иммунизированных расчетной терапевтической дозой вакцины, составило 1 : 143 через 28 дней после первичной вакцинации (рис. 5).

Заключение

Длительность поствакцинального иммунного ответа является одной из ключевых характеристик вакцин и требует контроля на различных этапах их разработки. В настоящий момент длительность поствакцинального

Рис. 5. Титры вирус-нейтрализующих антител в сыворотках крови здоровых добровольцев, иммунизированных расчетной терапевтической дозой вакцины, через 28 дней после первичной вакцинации. Также на рисунке отмечены геометрическое среднее титра и 95 % доверительный интервал ($n = 20$)

■ Литература

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drost C., Enjuanes L. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
2. Zaki A.M., van Boheemen., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [published correction appears in *N. Engl. J. Med.* 2013; 369 (4): 394]. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.
3. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (дата обращения: 19.03.20)
4. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (дата обращения: 19.03.20)
5. Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alsaifi A.J., Al Rabeeah A.A. et al. Human infection with MERS coronavirus after exposure to infected camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (6): 1012–5. DOI: 10.3201/eid2006.140402.
6. Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19 (23): 208–29. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.23.20829.
7. Cho H., Excler J.L., Kim J.H., Yoon I.K. Development of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus vaccines – advances and challenges. *Hum. Vaccines Immunother.* 2018; 14 (2): 304–13. DOI: 10.1080/21645515.2017.1389362.
8. World Health Organisation. WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint. 2017. URL: <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf>. (дата обращения: 19.03.20)
9. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21 (3): 346–51. DOI: 10.1016/j.coi.2009.05.016.

иммунного ответа у вакцин для профилактики БВРС недостаточно изучена. В настоящей работе была исследована длительность поствакцинального гуморального иммунитета у грызунов и приматов после иммунизации комбинированной векторной вакциной для профилактики БВРС на основе рекомбинантных аденовирусных векторов гAd26 и гAd5. Было показано, что:

- разработанная вакцина индуцирует у мышей и приматов формирование напряженного длительного гуморального иммунного ответа к гликопротеину S БВРС-КоВ (в том числе и вирус-нейтрализующих антител), который сохраняется на протяжении не менее 18 мес;
- разработанная вакцина обеспечивает формирование протективного иммунного ответа у мышей, который сохраняется на протяжении не менее 7 мес после вакцинации.

10. Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V. et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccines Immunother.* 2017; 13 (3): 613–20. DOI: 10.1080/21645515.2016.1238535.
11. Study of Safety and Immunogenicity of BVRs-GamVac-Combi ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04128059. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04128059>. (дата обращения: 19.03.20)
12. Унгуряну Т.Н., Гржибовский А.М. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях. *Экология человека.* 2011; (5): 55–60.
13. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика : учебное пособие : пер. с англ. ; под ред. В.П. Леонова. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015.
14. Phase I, Open Label Dose Ranging Safety Study of GLS-5300 in Healthy Volunteers ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02670187. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670187>. (дата обращения: 19.03.20)
15. Safety, Tolerability and Immunogenicity of Vaccine Candidate MVA-MERS-S. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03615911. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615911>. (дата обращения: 19.03.20)
16. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17 (7): 1055–65. DOI: 10.1128/CVI.00131-10.
17. Медунин Н.В. Проблемы коррекции иммунитета при вакцинации. *Иммунология.* 2017; 38 (3): 148–54. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-148-154.
18. World Health Organisation. WHO Target Product Profiles for MERS-CoV Vaccines. May 2017. URL: https://www.who.int/blueprint/what/research-development/MERS_CoV_TPP_15052017.pdf?ua=1. (дата обращения: 19.03.20)
19. Jia W., Channappanavar R., Zhang C., Li M., Zhou H., Zhang S. et al. Single intranasal immunization with chimpanzee adenovirus-based vaccine induces sustained and protective immunity against MERS-CoV infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8 (1): 760–72. DOI: 10.1080/22221751.2019.1620083.

■ References

1. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drost C., Enjuanes L., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87 (14): 7790–2. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.
2. Zaki A.M., van Boheemen., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia [published correction appears in *N. Engl.*

J. Med. 2013; 369 (4): 394]. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367 (19): 1814–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1211721.

3. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (date of access March 19, 20)

4. World Health Organisation. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2020. URL: <http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>. (date of access March 19, 20)
5. Memish Z.A., Cotten M., Meyer B., Watson S.J., Alsaifi A.J., Al Rabeeah A.A., et al. Human infection with MERS coronavirus after exposure to infected camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20 (6): 1012–5. DOI: 10.3201/eid2006.140402.
6. Reusken C.B., Farag E.A., Jonges M., Godeke G.J., El-Sayed A.M., Pas S.D., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19 (23): 208–29. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.23.20829.
7. Cho H., Excler J.L., Kim J.H., Yoon I.K. Development of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus vaccines – advances and challenges. *Hum. Vaccines Immunother.* 2018; 14 (2): 304–13. DOI: 10.1080/21645515.2017.1389362.
8. World Health Organisation. WHO Research and Development Blueprint: 2017 Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint. 2017. URL: <http://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf>. (date of access March 19, 20)
9. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21 (3): 346–51. DOI: 10.1016/j.coi.2009.05.016.
10. Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tikhvatulin A.I., Dzharulayeva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum. Vaccines Immunother.* 2017; 13 (3): 613–20. DOI: 10.1080/21645515.2016.1238535.
11. Study of Safety and Immunogenicity of BVRS-GamVac-Combi ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04128059. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04128059>. (date of access March 19, 20)
12. Unguryanu T.N., Grzhibovskiy A.M. Brief recommendations on the description, statistical analysis and presentation of data in scientific publications. *Ekologiya cheloveka.* 2011; (5): 55–60. (in Russian)
13. Petri A., Sabin K. Visual medical statistics. Tutorial. Transl. from Engl.; Leonova V.P. (ed.). Moscow: GEOTAR-Media, 2015. (in Russian)
14. Phase I., Open Label Dose Ranging Safety Study of GLS-5300 in Healthy Volunteers ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02670187. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02670187>. (date of access March 19, 20)
15. Safety, Tolerability and Immunogenicity of Vaccine Candidate MVA-MERS-S. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03615911. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03615911>. (date of access March 19, 20)
16. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17 (7): 1055–65. DOI: 10.1128/CVI.00131-10.
17. Medunitsyn N.V. The problem of correction of immunity in vaccination center of expertise of medical application. *Immunologiya.* 2017; 38 (3): 148–54. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-148-154. (in Russian)
18. World Health Organisation. WHO Target Product Profiles for MERS-CoV Vaccines. May 2017. URL: https://www.who.int/blueprint/what/research-development/MERS_CoV_TPP_15052017.pdf?ua=1. (date of access March 19, 20)
19. Jia W., Channappanavar R., Zhang C., Li M., Zhou H., Zhang S., et al. Single intranasal immunization with chimpanzee adenovirus-based vaccine induces sustained and protective immunity against MERS-CoV infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8 (1): 760–72. DOI: 10.1080/22221751.2019.1620083.