

А.Б. Рыжиков¹, Е.А. Рыжиков², М.П. Богрянцева¹,
 Е.Д. Даниленко¹, И.Р. Иматдинов¹, Е.А. Нечаева¹,
 О.В. Пьянков¹, О.Г. Пьянкова¹, И.М. Сулопаров¹,
 О.С. Таранов¹, А.С. Гудымо¹, Н.В. Данильченко¹, Е.С. Слепцова²,
 С.А. Боднев¹, Г.С. Онхонова¹, В.Н. Петров¹, А.А. Моисеева¹, П.Ю. Торжкова¹,
 С.А. Пьянков¹, Т.В. Трегубчак¹, Д.В. Антонец¹, Е.В. Гаврилова¹, Р.А. Максютлов¹



¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
 Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
 р.п. Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

² ООО «ЭпиВак», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Российская Федерация

Иммуногенные и протективные свойства пептидной вакцины против SARS-CoV-2

Обоснование. В 2020 г. пандемия, вызванная новой коронавирусной инфекцией, стала одним из самых серьезных испытаний для глобального здравоохранения за последнее столетие. Отсутствие вакцины как наиболее действенного способа борьбы против новой инфекции обусловило разработку научным сообществом большого количества профилактических препаратов. Нами была разработана кандидатная вакцина (ЭпиВакКорона) против новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 на основе химически синтезированных пептидов, конъюгированных на белок-носитель и адсорбированных на гидроксид алюминия, и изучена ее специфическая активность. **Цель исследования** — изучение иммуногенных и протективных свойств кандидатной пептидной вакцины ЭпиВакКорона. **Методы.** Работа была выполнена при помощи стандартных молекулярно-биологических, вирусологических и гистологических методов. **Результаты.** Показано, что ЭпиВакКорона при двукратном введении с интервалом в 14 дней хомякам, хорькам и низшим приматам (африканским зеленым мартишкам, макакам-резусам) в дозе 260 мкг, равной одной прививочной дозе для человека, вызывает индукцию вирусспецифических антител у 100% животных. В опытах на хомяках показано, что вакцинный препарат обладает дозозависимой иммуногенностью, вакцина индуцирует ускорение элиминации вируса из верхних дыхательных путей у хорьков и предотвращает развитие пневмонии у хомяков и низших приматов после респираторного заражения новым коронавирусом. **Заключение.** Результаты доклинического исследования специфической активности свидетельствуют о перспективности использования ЭпиВакКорона для вакцинации людей.

Ключевые слова: коронавирус, пептидная вакцина, доклинические исследования

Для цитирования: Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д., Иматдинов И.Р., Нечаева Е.А., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Сулопаров И.М., Таранов О.С., Гудымо А.С., Данильченко Н.В., Слепцова Е.С., Боднев С.А., Онхонова Г.С., Петров В.Н., Моисеева А.А., Торжкова П.Ю., Пьянков С.А., Трегубчак Т.В., Антонец Д.В., Гаврилова Е.В., Максютлов Р.А. Иммуногенные и протективные свойства пептидной вакцины против SARS-CoV-2. *Вестник РАМН.* 2021;76(1):5–19. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1528>

Обоснование

Коронавирусы семейства *Coronaviridae*, циркулирующие в человеческой популяции и являющиеся причиной острых респираторных инфекций, периодически вызывают вспышки тяжелых инфекций, в частности тяжелого острого респираторного синдрома (возбудитель — SARS-CoV) или ближневосточного респираторного синдрома (возбудитель — MERS-CoV). Новый коронавирус SARS-CoV-2, представитель рода Betacoronavirus, по сравнению с его близкими родственниками SARS-CoV и MERS-CoV способен очень быстро передаваться от человека к человеку, а летальность этого вируса превосходит смертность от вируса гриппа в 30–40 раз [1]. Пандемия, вызванная в 2019–2020 гг. вирусом SARS-CoV-2, поставила перед общественным здравоохранением всех стран мира актуальную задачу — создать эффективные терапевтические и профилактические препараты. В настоящее время разрабатывается более 180 различных вакцин против новой коронавирусной инфекции, которые представляют собой субъединичные, векторные реплицирующиеся, векторные нереплицирующиеся, инактивированные, живые аттенуированные вакцины, вакцины на основе нуклеиновых кислот и вирусоподобных частиц [2]. Разработка различного типа вакцин позволит применять эти препараты или их

комбинации для создания защитного иммунитета у различных целевых групп населения.

Поверхностный вирусный белок S является основой большинства вакцин, разрабатываемых против нового коронавируса. Белок S вируса SARS-CoV-2 состоит из двух субъединиц. Субъединица S1 обеспечивает связывание вируса с рецептором ACE2, находящимся на мембране клеток-мишеней, а субъединица S2 — слияние оболочки вириона и мембраны клетки-мишени. Блокирование функций рецепторного связывания и слияния с мембраной клетки может обеспечить защиту от вирусной инфекции. Однако существует вероятность того, что использование полноразмерного S-белка SARS-CoV-2 может вызывать ряд побочных реакций, и наиболее серьезной из них может быть антителозависимое усиление инфекции, как это было ранее показано группой китайских ученых для S-белка SARS-CoV-1 [3].

Поэтому мы рассмотрели альтернативный подход к иммунизации против коронавируса, который обеспечивает формирование протективного иммунитета и исключает возможность развития антителозависимого усиления инфекции. Мы использовали технологию синтетических пептидных вакцин, которая включает этапы *in silico* конструирования нескольких иммуноактивных пептидных фрагментов вирусных белков, представляющих родственный вирусный антиген, этап химического синтеза

пептидных антигенов и их конъюгирование на высокомолекулярный белок-носитель. Наиболее эффективные конструкции были отобраны для включения в композицию кандидатной пептидной вакцины после изучения их иммуногенности, антигенной специфичности и протективности на животных моделях (данные не приведены). Выбор пептидов был основан на опубликованных пространственных структурах гомологичного S-белка SARS-CoV-1 и данных о генетических последовательностях нового коронавируса SARS-CoV-2 [4, 5]. Эпитопы, расположенные рядом с жизненно важными для вируса участками, были сконструированы с использованием методов компьютерного моделирования. При проектировании исключены эпитопы, способные привести к антителиозависимому усилению инфекции (включая пептид S597-603) или имеющие антигенное сходство с белками человека [3, 6–8]. С целью обеспечения устойчивости вакцины к возможным мутациям вируса, которые повлекут изменение антигенных свойств, выбирались эпитопы из наиболее консервативных участков белка S [7, 8]. Синтезированные пептиды были конъюгированы с белком-носителем, в качестве которого был выбран N-белок нового коронавируса, поскольку он консервативен и содержит вирус-специфические Т-клеточные эпитопы и, таким образом, также способствует формированию Т-клеток памяти. Нами была разработана синтетическая пептидная вакцина против нового коронавируса на основе химически синтезированных пептидов. Вакцина (ЭпиВакКорона) представляет собой суспензию для внутримышечного введения, содержащую композицию химически синтезированных пептидных иммуногенов S-белка коронавируса SARS-CoV-2, конъюгированных с белком-носителем и адсорбированных на гидроксиде алюминия.

Ожидаемыми преимуществами такой субъединичной вакцины относительно других вакцинных платформ являются:

- эффективность вакцины против антигенно изменяющихся штаммов, поскольку вакцина содержит консервативные эпитопы SARS-CoV-2;
- безопасность вакцины. В отличие от большинства субъединичных, пептидная вакцина содержит лишь короткие участки вирусного белка, что дополнительно увеличивает ее безопасность и позволяет использовать для лиц с ослабленным иммунитетом, при иммунодепрессивных и иммуносупрессивных состояниях;
- простота производства, стабильность компонентов дают возможность масштабировать выпуск сотен миллионов доз вакцины с использованием современных технологий твердофазного синтеза пептидов на автоматических синтезаторах;
- режим хранения и транспортировки от 2 до 8 °С позволяет использовать существующие логистические процессы.

Цель исследования — изучение специфических иммуногенных и протективных свойств кандидатной пептидной вакцины против SARS-CoV-2.

Методы

Животные

В работе были использованы лабораторные животные, чувствительные к коронавирусной инфекции, такие как низшие приматы, сирийские хомяки и хорьки. Низшие приматы двух видов (*Chlorocebus aethiops*, 8 самцов с исходной массой тела 4,8–6,3 кг в возрасте

A.B. Ryzhikov¹, E.A. Ryzhikov², M.P. Bogryantseva¹, E.D. Danilenko¹, I.R. Imatdinov¹, E.A. Nechaeva¹, O.V. Pyankov¹, O.G. Pyankova¹, I.M. Susloparov¹, O.S. Taranov¹, A.S. Gudymo¹, N.V. Danilchenko¹, E.S. Sleptsova², S.A. Bodnev¹, G.S. Onkhonova¹, V.N. Petrov¹, A.A. Moiseeva¹, P.Yu. Torzhkova¹, S.A. Pyankov¹, T.V. Tregubchak¹, D.V. Antonets¹, E.V. Gavrilova¹, R.A. Maksyutov¹

¹Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

²Limited Liability Company “EpiVac”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Immunogenicity and Protectivity of the Peptide Vaccine against SARS-CoV-2

Background. In 2020, the pandemic caused by novel coronavirus infection has become one of the most critical global health challenges during the past century. The lack of a vaccine, as the most effective way to control the novel infection, has prompted the development of a large number of preventive products by the scientific community. We have developed a candidate vaccine (EpiVacCorona) against novel coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 that is based on chemically synthesized peptides conjugated to a carrier protein and adsorbed on aluminum hydroxide and studied the specific activity of the developed vaccine. **Aims** — study of the immunogenicity and protectivity of the peptide candidate vaccine EpiVacCorona. **Methods.** The work was performed using standard molecular biological, virological and histological methods. **Results.** It was demonstrated that EpiVacCorona, when administered twice, spaced 14 days apart, to hamsters, ferrets, and non-human primates (african green monkeys, rhesus macaques) at a dose of 260 µg, which is equal to one inoculation dose for humans, induces virus-specific antibodies in 100% of the animals. Experiments in hamsters showed this vaccine to be associated with the dose-dependent immunogenicity. The vaccine was shown to accelerate the elimination of the virus from the upper respiratory tract in ferrets and prevent the development of pneumonia in hamsters and non-human primates following a respiratory challenge with novel coronavirus. **Conclusions.** The results of a preclinical specific activity study indicate that the use of EpiVacCorona has the potential for human vaccination.

Keywords: coronavirus, peptide vaccine, preclinical studies

For citation: Ryzhikov AB, Ryzhikov EA, Bogryantseva MP, Danilenko ED, Imatdinov IR, Nechaeva EA, Pyankov OV, Pyankova OG, Susloparov IM, Taranov OS, Gudymo AS, Danilchenko NV, Sleptsova ES, Bodnev SA, Onkhonova GS, Petrov VN, Moiseeva AA, TorzhkovaPYu, Pyankov SA, Tregubchak TV, Antonets DV, Gavrilova EV, Maksyutov RA. Immunogenicity and Protectivity of the Peptide Vaccine against SARS-CoV-2. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2021;76(1):5–19. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1528>

5–16 лет, и *Macaca mulatta*, 8 самцов с массой тела 3,9–4,8 кг в возрасте 2,9–3 года) получены из питомника НИИ медицинской приматологии, г. Сочи, Россия. Сирийские хомяки, самцы и самки массой тела 0,09–0,12 кг, — из питомника ООО «КролИнфо», Россия; хорьки, самцы и самки массой тела 0,7–1,3 кг, — из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

Продолжительность исследования

Май–сентябрь 2020 г.

Изучение иммуногенных свойств вакцины

ЭпиВакКорона

В исследовании использованы интактные, не содержащие антитела к вирусу SARS-CoV-2 хомяки, хорьки и низшие приматы. Хомяки очень чувствительны к SARS-CoV-2 и представляют собой хорошую модель для изучения данной инфекции. После интраназального заражения вирус реплицируется в верхних (ВДП) и нижних дыхательных путях и поражает легкие. Эта модель может использоваться для оценки протективных свойств вакцины, в патоморфологических и патогистологических исследованиях, в частности, может быть полезна для экспериментов по определению дозы и режима, обеспечивающих защиту от пневмонии. Две группы хомяков по 10 голов в каждой иммунизировали двукратно внутримышечно с интервалом в 14 сут двумя разными дозами вакцины ЭпиВакКорона, содержащими соответственно 86 и 260 мкг действующего вещества (0,3 и 1 вакцинирующая доза для человека соответственно). В работе использовались одноразовые трехкомпонентные шприцы объемом 1 мл с иглой 29G (ЦСКБ «Прогресс»). Третья группа получала плацебо — физиологический раствор 0,9% хлорида натрия.

Хорьки менее чувствительны к SARS-CoV-2, и для развития заболевания им требуются большие дозы вируса по сравнению с хомяками. У хорьков SARS-CoV-2 реплицируется в основном в ВДП, и обычно инфекция протекает без видимых клинических проявлений. Этот факт позволяет использовать хорьков для оценки протективных свойств вакцины при интраназальном способе заражения с оценкой вирусной нагрузки в смывах из носовой полости животных в разные моменты времени после заражения. В частности, такая модель может быть использована для исследования различий в протективных свойствах различных серий вакцины. Три группы хорьков по 6 голов в каждой иммунизировали двукратно внутримышечно тремя сериями вакцины ЭпиВакКорона в дозе 260 мкг действующего вещества (1 вакцинирующая доза для человека) с интервалом 14 сут. Использовались одноразовые трехкомпонентные шприцы объемом 1 мл с иглой 29G (ЦСКБ «Прогресс»). Четвертая группа животных получала плацебо — физиологический раствор 0,9% хлорида натрия.

Низшие приматы — самая близкая к человеку модель животных. Наиболее распространенными приматами, используемыми в исследованиях, являются африканские зеленые мартышки *Chlorocebus aethiops* и макаки-резусы *Macaca mulatta*. Однако известно, что эти два вида различаются как по своим иммунным реакциям, так и по устойчивости к инфекциям. Поэтому нас интересовало не только изучение иммуногенных и протективных свойств вакцины ЭпиВакКорона у приматов, но и сравнение иммунных ответов и восприимчивости к коронавирусной инфекции этих двух видов [9]. Низшие приматы,

по 5 голов каждого вида, иммунизировались двукратно внутримышечно вакциной ЭпиВакКорона в дозе 260 мкг действующего вещества (1 вакцинирующая доза для человека) с интервалом 14 сут. Использовались одноразовые трехкомпонентные шприцы объемом 1 мл с иглой 29G (ЦСКБ «Прогресс»). По 3 примата каждого вида получали плацебо — физиологический раствор 0,9% хлорида натрия.

Через 14 и 28 дней после первой иммунизации у животных всех групп проводили забор крови и измеряли уровень антител в сыворотке против антигенов вируса SARS-CoV-2 в реакциях ИФА и вирусной нейтрализации.

Изучение протективных свойств вакцины

ЭпиВакКорона

Все исследования по оценке протективных свойств вакцины проведены в максимально изолированной лаборатории ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора при соблюдении требований безопасной работы с микроорганизмами I–II групп патогенности. В работе использовали вирус SARS-CoV-2, штамм nCoV/Victoria/1/2020, наработанный на культуре клеток Vero E6 до титра вируса 10^7 фокусобразующих единиц на миллилитр (ФОЕ/мл). Хомяков и хорьков заражали интраназально дозой 10^2 и 10^3 ФОЕ соответственно через 28–30 дней после первого введения вакцины ЭпиВакКорона. За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения, регистрируя появление клинических признаков заболевания и определяя вирусную нагрузку в смывах из носа. Приматов заражали интраназально дозой 10^6 ТЦД50 вируса SARS-CoV-2, штамм nCov/Victoria/1/2020, через 30 дней после первого введения вакцины. За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения, регистрируя появление клинических признаков заболевания и определяя вирусную нагрузку в мазках из носа.

Определение вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в биологических образцах на культуре клеток

Смывы из носовой полости лабораторных животных использовали для приготовления 10-кратных разведений с последующим их посевом на монослой культуры клеток Vero E6 в 96-луночных планшетах. Из лунок плоскостонного планшета с монослоем клеток удаляли ростовую среду, монослой промывали 2 раза поддерживающей питательной средой (DMEM, 100 ед./мл бензилпенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 300 мкг/мл L-глутамин, 2% сыворотки крови плодов коровы). Вносили разведения исследуемых образцов, инкубировали 1 ч при температуре 37 °C в условиях 5% CO₂, после чего среду из лунок удаляли и планшет 1 раз промывали поддерживающей средой. Во все лунки планшета вносили по 150 мкл поддерживающей среды. После 18–20 ч инкубации при температуре 37 °C в условиях 5% CO₂ среду из лунок удаляли, добавляли по 100 мкл 80% ацетона (охлажденного до –20 °C), инкубировали в течение 10–15 мин, удаляли ацетон и планшет промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР). Далее в каждую лунку добавляли по 100 мкл разведения моноклональных антител человека к вирусу SARS-CoV-2 (Anti-N protein SARS-CoV-2 mAb_IgG “Sanyou Biopharmaceuticals”, соотношение антител к ФСБР 1:2000). Планшет инкубировали при температуре 37 °C в течение 1 ч, после чего лунки промывали ФСБР 4 раза и вносили вторичные антитела кролика к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam), в разведении

1:1000. Через 30 мин инкубации лунки промывали 4 раза ФСБР и вносили раствор субстрата АЕС (3-amino-9-ethylcarbazole, Sigma). Через 30 мин инкубации раствор удаляли, планшет промывали 1 раз ФСБР, инфицированные клетки, окрашенные в красно-коричневый цвет, подсчитывали в инвертированном микроскопе, определяли титр вирусу в количестве фокусобразующих единиц на 1 мл смыва (ФОЕ/мл).

Определение вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в биологических образцах методом RT-PCR

Выделение РНК из смывов из носовой полости проводили с использованием набора реагентов «Рибо-сорб» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК из выделенной РНК проводили с использованием набора реагентов для реакции обратной транскрипции «Реверта-Л» (ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию фрагментов кДНК вируса SARS-CoV-2, предварительно синтезированных на матрице РНК вируса SARS-CoV-2 в реакции обратной транскрипции, проводили с использованием набора реагентов «Вектор-ПЦРПВ-COVID-19-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) согласно инструкции производителя. Результаты исследования интерпретировали в соответствии с инструкцией к набору.

Определение вирусспецифических антител при помощи ИФА

Специфические антитела были идентифицированы с использованием инактивированного вируса SARS-CoV-2, штамм nCoV/Victoria/1/2020, наработанного на культуре клеток Vero E6. Иммуносорбент представляет собой 96-луночный полистирольный планшет с высокой сорбционной способностью, содержащий иммобилизованный инактивированный природный антиген SARS-CoV-2. Инактивацию природного антигена вируса проводили с использованием бета-пропиолактона путем его внесения в очищенный осадением антиген в конечной концентрации 0,5%. Инкубацию проводили в течение 2 ч при температуре 4 °С при перемешивании, после чего прогревали в течение 2 ч при температуре 37 °С. Для титрования готовили двукратные разведения сывороток крови животных, иммунизированных вакциной, и животных контрольной группы (неиммунизированных) в интервале 1:40–1:2560. После инкубации в течение 30 мин при температуре 37 °С производили 5-кратную отмывку лунок планшета PBST с Tween-20. После завершения процедуры отмывки в лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата протеина А золотистого стафилококка с пероксидазой хрена в конечной концентрации 1,26 мкг/мл («Биосан», Новосибирск). После 30-минутной инкубации при температуре 37 °С лунки промывали и вносили 0,05% раствор тетраметилбензидина. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 450 нм. Титром антител считается максимальное разведение исследуемой сыворотки, при котором оптическая плотность раствора превышает среднее значение оптической плотности отрицательного контроля.

Определение вируснейтрализующих антител на культуре клеток Vero

Исследуемые сыворотки перед постановкой реакции нейтрализации вируса подвергали термоинактивации при 56 °С в течение 30 мин. В стерильном круглодонном планшете готовили серийные двукратные разведе-

ния исследуемых сывороток на поддерживающей питательной среде (ДМЕМ, 100 ед./мл бензилпенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 300 мкг/мл L-глутамин, 2% сыворотки крови плодов коровы (Invitrogen)). В каждую лунку планшета, кроме контроля клеток, вносили вирусную суспензию, содержащую 200 ФОЕ вируса SARS-CoV-2, и инкубировали 1 ч при температуре 37 °С. Далее использовали плоскостонный 96-луночный планшет с монослоем клеток Vero E6 более 90% конfluентности. Из лунок плоскостонного планшета с монослоем клеток Vero удаляли ростовую среду, монослой промывали 2 раза поддерживающей средой. После окончания 60-минутной инкубации из круглодонного планшета с разведениями сывороток переносили по 100 мкл в соответствующие лунки планшета с монослоем клеток. Инкубировали 1 ч при температуре 37 °С в условиях 5% CO₂, после чего среду из лунок удаляли и планшет 1 раз промывали поддерживающей средой. Во все лунки планшета вносили по 150 мкл поддерживающей среды. Далее проводили процедуру окрашивания ФОЕ. После 18–20 ч инкубации при температуре 37 °С в условиях 5% CO₂ среду из лунок удаляли, добавляли по 100 мкл 80% ацетона (охлажденного до –20 °С), инкубировали в течение 10–15 мин, удаляли ацетон и планшет промывали ФСБР. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл разведения моноклональных антител человека к вирусу SARS-CoV-2 (Anti-N protein SARS-CoV-2 mAb_IgG “Sanyou Biopharmaceuticals”, соотношение антител к ФСБР 1:2000). Белок N экспрессируется в гораздо больших количествах, чем S-белок, что позволяет визуализировать зараженные клетки с высокой чувствительностью антител к белку N. Планшет инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего лунки промывали ФСБР 4 раза и вносили вторичные кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam), в разведении 1:1000. Через 30 мин инкубации лунки промывали 4 раза ФСБР и вносили раствор субстрата АЕС (3-amino-9-ethylcarbazole, Sigma). Через 30 мин инкубации раствор удаляли, планшет промывали 1 раз ФСБР, инфицированные клетки, окрашенные в красно-коричневый цвет, подсчитывали в инвертированном микроскопе, определяли титр вируса в количестве фокусобразующих единиц на 1 мл смыва (ФОЕ/мл).

Титром нейтрализующих антител сыворотки считается разведение, при котором количество ФОЕ уменьшается на 50% по сравнению со средним значением ФОЕ в контрольных лунках.

Гистологические исследования

Гистологическое исследование проводили для образцов из легких хомяков и приматов через 6–7 сут после интраназального заражения коронавирусом SARS-CoV-2, штамм nCoV/Victoria/1/2020. Образцы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина для гистологических исследований («БиоВитрум», Россия) в течение 48 ч. Обработку материала проводили по общепринятой методике: последовательное обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксил-л-парафин и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы HM-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофото съемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия) с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 (Zeiss, Германия).

Рентгенологические исследования

Рентгеновские снимки органов грудной полости животных получали на рентгеновском аппарате GIERTH HFX90V (Германия/Япония) с цифровой рентгенографической системой SCOPE 801CW Ultraleicht с беспроводным плоскопанельным детектором (27,4 × 35 см) CDXI-801CW и управляющим программным обеспечением CANON NE. Рентгенограммы были получены при мощности облучения 52 кВ и экспозиции 0,06 мАс/с. Рентгенографию выполняли на приматах, которым вводили внутримышечно золетил 100 (Virbac) и Хула (Голландия) в дозах 10 мг/кг и 10 мг/животное соответственно.

Этическая экспертиза

Все процедуры с животными, запланированные в клиническом исследовании, были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (заявка ГНЦ ВБ «Вектор»/02-05.2020).

Статистический анализ

Анализ динамики изученных показателей внутри исследуемых групп проводился с использованием метода Фридмана и апостериорного теста Неменьи. Статистический анализ парных выборок осуществлялся с помощью теста Уилкоксона, анализ непарных выборок — с помощью теста Краскела–Уоллиса и апостериорного теста Данна. Попарные сравнения несвязанных выборок также проводились с помощью теста Манна–Уитни. Поправка на множественное тестирование во всех случаях проводилась методом Бонферрони. Частотный анализ осуществлялся с помощью точного теста Фишера (при сравнении двух групп) или с помощью теста Фишера–Фримана–Гальтона (при сравнении трех групп и более). Статистический анализ и построение графиков выполнялись с помощью специализированной программной среды для вычислений и статистического анализа R [10–12].

Результаты

Дизайн вакцины

Пептидная вакцина, содержащая короткие иммуногенные пептиды, конъюгированные с белком-носителем, вызывает сильные и целенаправленные иммунные ответы только на несколько В-клеточных эпитопов, которые расположены в функционально важных сайтах вирусных белков. Для создания вакцины были использованы данные рентгеноструктурного анализа белков коронавируса и информация о генетических последовательностях, кодирующих белки нового коронавируса, полученная из базы данных GISAID [4, 5]. Линейные эпитопы В-клеток в S-белке, расположенные рядом с жизненно важными для вируса сайтами, были разработаны с использованием методов компьютерного моделирования. При разработке мы исключили эпитопы, которые могут привести к антителизависимому усилению инфекции или имеют антигенное сходство с белками человека и могут вызывать иммунопатологическую реакцию [6–8]. Чтобы обеспечить устойчивость вакцины к возможным мутациям вируса, которые могли бы привести к изменению антигенных свойств, эпитопы были выбраны из наиболее консервативных областей S-белка [7, 8]. В общей сложности семь пептидов длиной 20–31 аминокислотный остаток, несущих линейные В-клеточные эпитопы S-белка, были сконструированы и химически

синтезированы, а затем конъюгированы с химерным рекомбинантным белком-носителем [14]. Такие пептиды-иммуногены несут минимально необходимые антигенные детерминанты для формирования специфического иммунного ответа и содержат антигенные участки белка S нового коронавируса SARS-CoV-2, являющиеся иммуногенными для модельных животных и человека и индуцирующие протективный иммунитет против заражения коронавирусом SARS-CoV-2. Для усиления иммуногенности пептидов последние конъюгировали с белком-носителем, содержащим нуклеопротеин NP вируса SARS-CoV-2. Белок NP консервативен, не индуцирует вируснейтрализующие антитела, но содержит вирусспецифические Т-клеточные эпитопы и участвует в формировании Т-клеток памяти. NP-специфические Т-клетки детектировались у большего числа пациентов, чем для других вирусных белков, а количество NP-специфических Т-клеток, секретирующих IFN- γ , было намного выше, чем для S-RBD [13]. Эти семь активных веществ вакцин-кандидатов адсорбировали на гидроксиде алюминия. Такая синтетическая пептидная вакцина вместо многих десятков и сотен эпитопов, присутствие которых типично для обычных вакцин, содержит только несколько эпитопов, нацеленных на индукцию сфокусированного защитного иммунного ответа.

Семь групп хорьков были дважды внутримышечно иммунизированы семью вакцинными кандидатами для оценки иммуногенности и защитной способности каждой конструкции против нового коронавируса (каждой группе животных вводился свой прототип вакцины). Были отобраны три наиболее иммуногенных и протективных пептидных иммуногена: RLFKSNLKPFRDISTEIQAGS, KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE и KNLNESLIDLQELGKYEYQIK. Пептид RLFKSNLKPFRDISTEIQAGS соответствует участку рецептор-связывающего мотива S-белка вируса SARS-CoV-2, а два других соответствуют участку вблизи трансмембранного домена «ножки» S-белка, блокирование этого участка затрудняет слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны. Три пептидных конъюгата, смешанные в соотношении 1:1:1 и адсорбированные на гидроксиде алюминия, представляют собой действующее начало пептидной вакцины ЭпиВакКорона (рис. 1).

Иммуногенность вакцины ЭпиВакКорона

На первом этапе работы изучались иммуногенные свойства вакцины ЭпиВакКорона на лабораторных животных (хомяках, хорьках, низших приматах). Всем животным препарат вводился двукратно с интервалом 14 сут между инъекциями, способ введения — внутримышечный.

На рис. 2 приведены результаты исследования иммуногенности вакцины ЭпиВакКорона на хомяках и хорьках.

На 14-е сут после второй иммунизации хомяков двумя разными дозами — 260 и 86 мкг — вакцина индуцирует иммунный ответ у 100% хомяков на антигены вакцины. Трехкратное уменьшение дозы вакцины приводит к дозозависимому уменьшению среднегеометрического титра (СГТ) на антигены вакцины. На 14-е сут после второй вакцинации СГТ в группе хомяков, получивших полную дозу вакцины, составляет 1:11943, в группе, получившей 1/3 дозы, — 1:6400 по отношению к антигену вакцины. При использовании цельновирионного антигена коронавируса SARS-CoV-2 СГТ составляет 1:4525 и 1:1600 для доз вакцины 260 и 86 мкг соответственно.

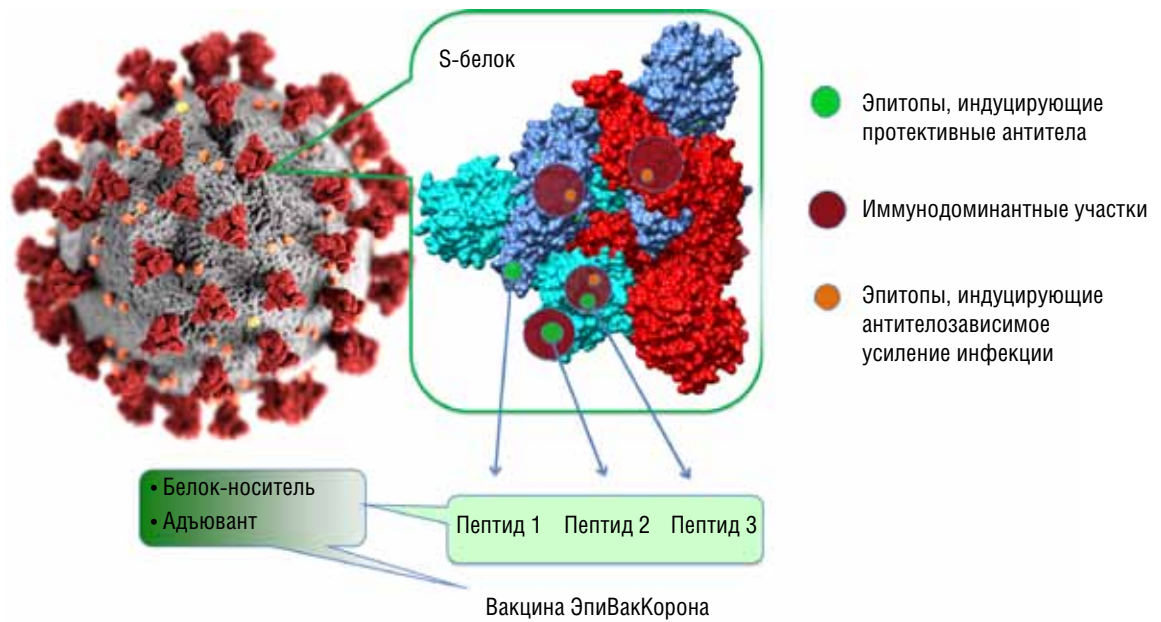


Рис. 1. Схематическое изображение расположения эпитопов S-белка

Источники: Использованы материалы [10], ProteinDataBase 6ACJ.pdb и CDCImageLibraryPHILID #23312.

10

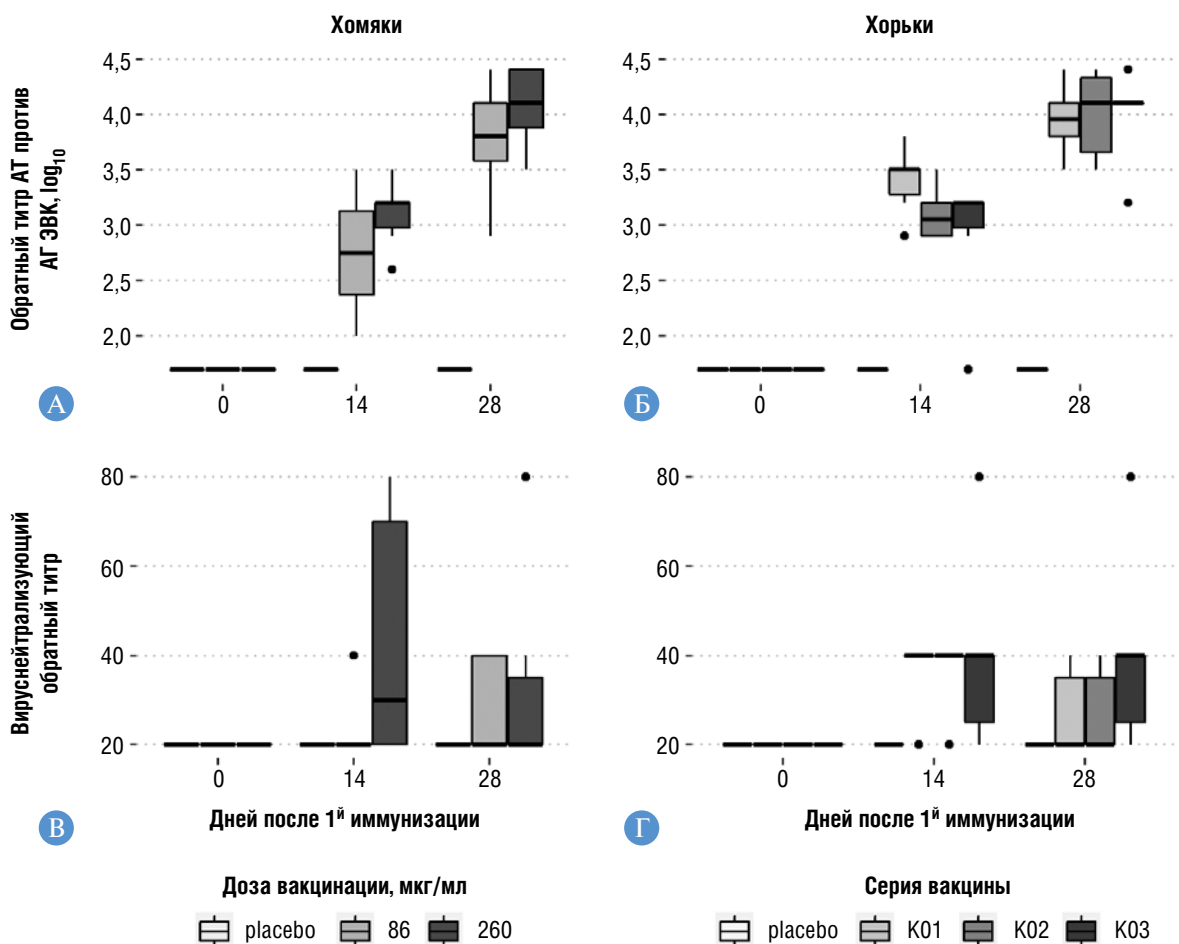


Рис. 2. Результаты исследования иммуногенности вакцины ЭпиВакКорона в экспериментах на хомяках и хорьках. Всем животным препарат вводился двукратно с интервалом 14 сут между инъекциями, способ введения — внутримышечный. А, Б — титры антител в сыворотке крови перед введением вакцины ЭпиВакКорона, через 14 и 28 сут после первой иммунизации: А — хомяков, Б — хорьков; В, Г — титры вируснейтрализующих антител в сыворотке крови перед введением вакцины ЭпиВакКорона, через 14 и 28 сут после первой иммунизации: В — хомяков (проводили исследование двух доз вакцин — 260 и 86 мкг), Г — хорьков (проводили исследование трех серий вакцины в дозе 260 мкг)

После иммунизации хорьков тремя сериями вакцины ЭпиВакКорона в дозе 260 мкг у 17 из 18 (94%) животных наблюдается появление специфических антител с титром от 1:800 до 1:6400 на 14-е сут после первой вакцинации. Через 14 сут после второй вакцинации у 100% хорьков формируется высокий уровень специфических антител и СГТ в трех группах хорьков, иммунизированных тремя сериями вакцины ЭпиВакКорона, и составляет 1:9051–1:10159 (см. рис. 2).

Показано, что вакцина ЭпиВакКорона индуцирует антитела в высоких титрах у 100% приматов к антигенам вакцины и цельновирионному антигену коронавируса SARS-CoV-2 на 14-е сут после второй вакцинации (рис. 3).

У зеленых мартышек СГТ составляет 1:11143 к антигену вакцины и 1:10159 — к цельновирионному антигену коронавируса SARS-CoV-2, тогда как у макак-резусов в эти сроки СГТ к антигену вакцины составляет 1:12800, а к цельновирионному антигену коронавируса SARS-CoV-2 — 1:7352. У 100% зеленых мартышек обнаружены нейтрализующие антитела в титре 1:40 на 14-е сут после первой вакцинации.

Протективность вакцины ЭпиВакКорона

На 14-е сут после второй вакцинации всех иммунизированных животных интраназально заражали новым коронавирусом SARS-CoV-2 в дозе 10² ФОЕ для хомяков, 10³ ФОЕ — для хорьков и 10⁶ ТЦД50 — для приматов. Хомяков на 6-е и 14-е сут после заражения подвергали эвтаназии, измеряли индекс массы легкие/тело и проводили гистологическое исследование легких. На 6-е сут после заражения индекс массы легкие/тело в группе плацебо (0,0108 ± 0,0004 — средняя величина и стандартная ошибка) статистически значимо отличается от индекса в группах вакцинированных ЭпиВакКорона (для дозы 260 мкг — 0,0080 ± 0,0023, для дозы 86 мкг — 0,0086 ± 0,0008) (рис. 4).

При гистологическом исследовании срезов легких тяжелые патологические изменения наблюдались в группе плацебо хомяков, где обнаруживались полная потеря эпителиальной выстилки мелких бронхов и бронхиол, очаги некротизации, плазматическое пропитывание стенок сосудов, значительные по площади зоны ателектаза. У животных, вакцинированных максимальной дозой 260 мкг вакцины ЭпиВакКорона, наблюдались только

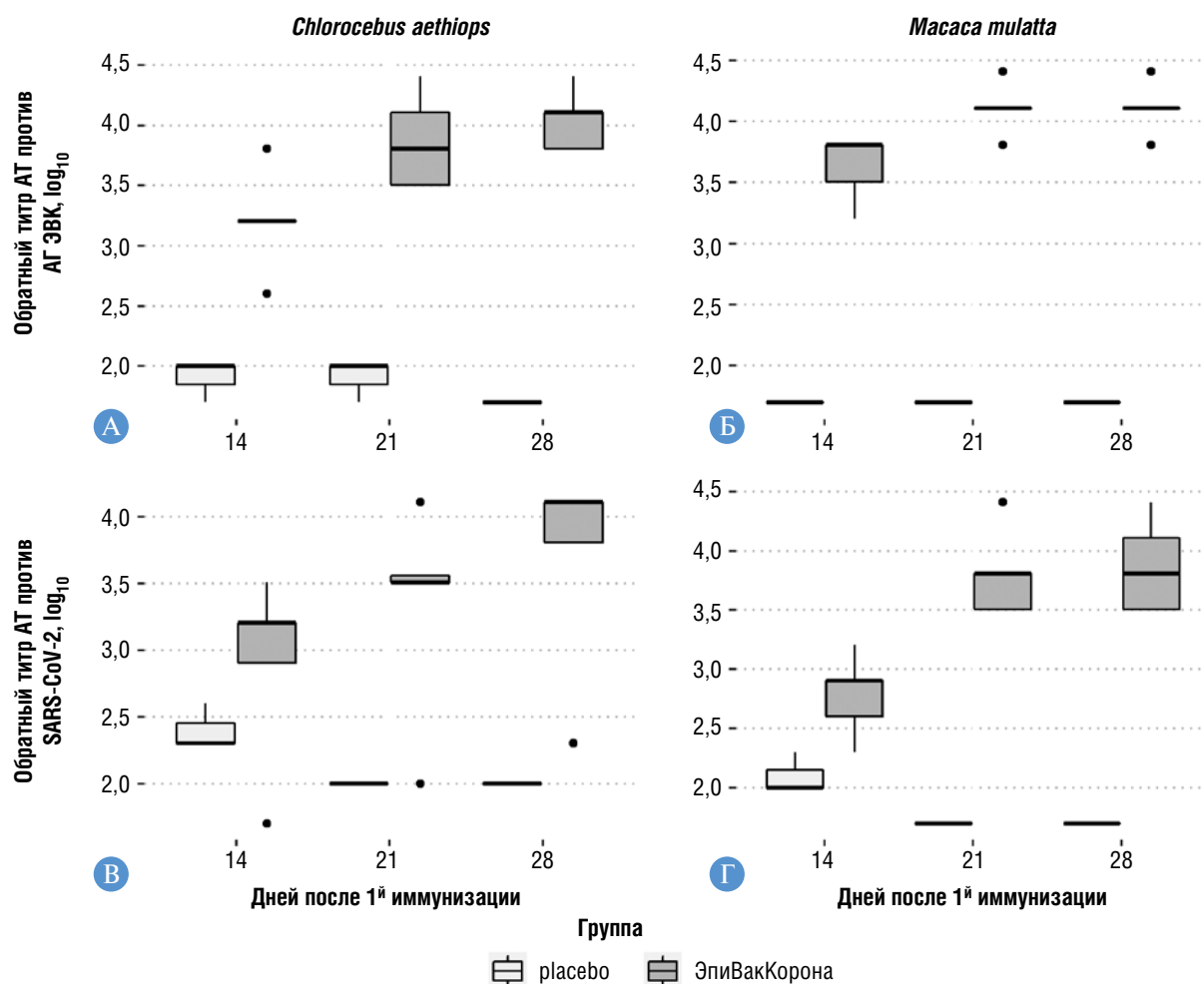
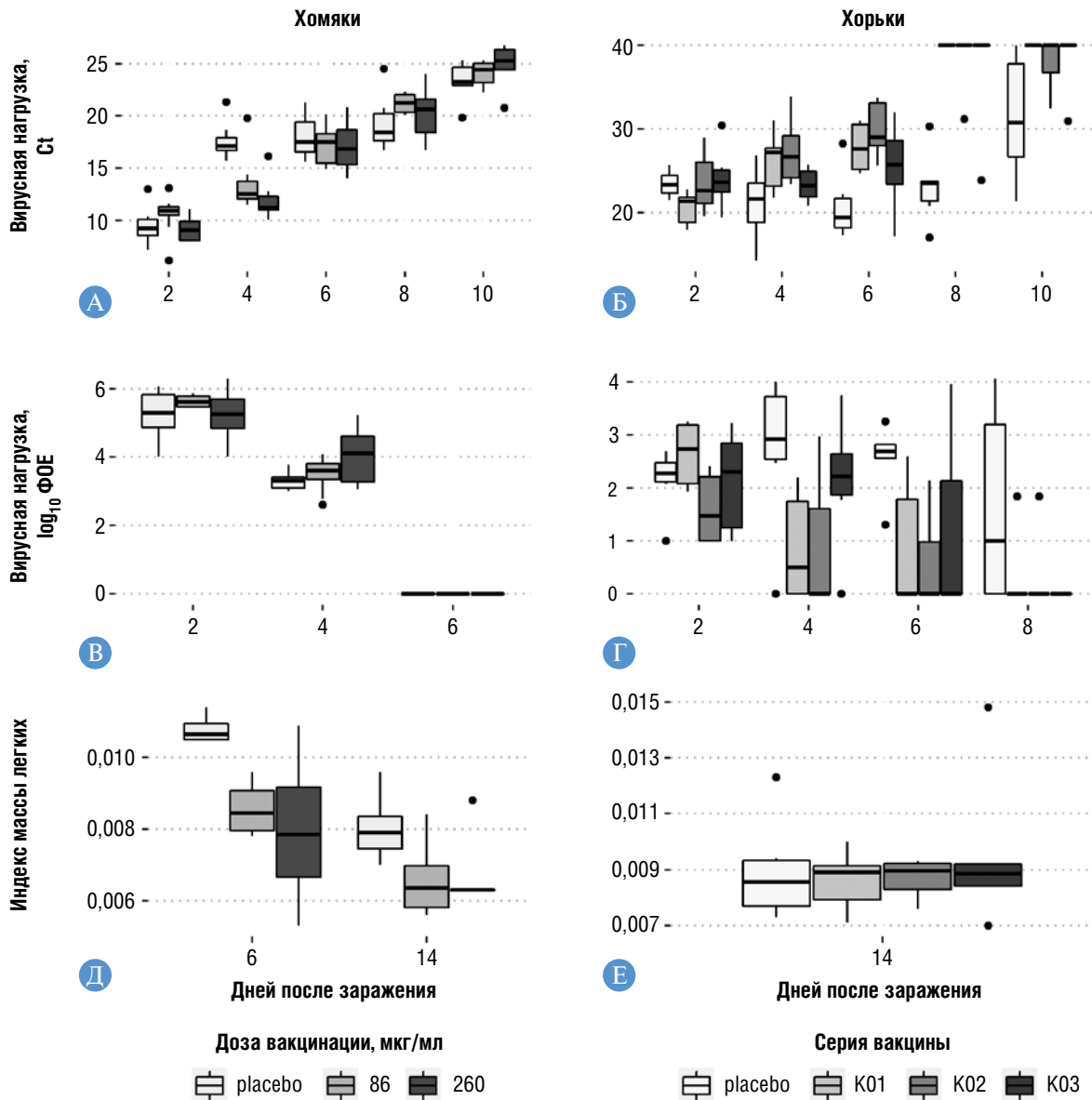


Рис. 3. Гуморальный иммунный ответ на антигены коронавируса у вакцинированных ЭпиВакКорона зеленых мартышек и макак-резусов. Всем животным группы ЭпиВакКорона препарат вводился двукратно внутримышечно в дозе 260 мкг с интервалом 14 сут между инъекциями. А, Б — титры антител в сыворотке крови приматов к антигену вакцины ЭпиВакКорона через 14, 21 и 28 дней после первой иммунизации: А — *Chlorocebus aethiops*, Б — *Macaca mulatta*; В, Г — титры антител в сыворотке крови приматов к антигенам инактивированного коронавируса SARS-CoV-2 через 14, 21 и 28 дней после первой иммунизации: В — *Chlorocebus aethiops*, Г — *Macaca mulatta*



12

Рис. 4. Протективность вакцины ЭпиВакКорона на хомяках и хорьках после заражения коронавирусом. Всем животным препарат вводился двукратно внутримышечно с интервалом 14 сут между инъекциями. А, Б — вирусная нагрузка, измеренная по значению порогового цикла Ct, в носовом смыве на 2-, 4-, 6-, 8- и 10-й дни после интраназального заражения коронавирусом: А — хомяков (проводили исследование двух доз вакцины — 260 и 86 мкг), Б — хорьков (проводили исследование трех серий вакцины в дозе 260 мкг); В, Г — вирусная нагрузка, измеренная по количеству инфекционных центров ФОЕ, в носовом смыве на 2-, 4-, 6-, 8- и 10-й дни после интраназального заражения коронавирусом: В — хомяков (проводили исследование двух доз вакцины — 260 и 86 мкг), Г — хорьков (проводили исследование трех серий вакцины в дозе 260 мкг); Д, Е — индекс отношения массы легкое/тело, измеренный на 6-е и 14-е сут после интраназального заражения коронавирусом: Д — хомяков (проводили исследование двух доз вакцины — 260 и 86 мкг), Е — хорьков (проводили исследование трех серий вакцины в дозе 260 мкг)

локальные явления отека и воспалительно-клеточной инфильтрации, на малых участках легочной паренхимы отмечались дистрофические изменения эпителия мелких бронхов и кровеносных сосудов микроциркуляторного русла (рис. 5).

Для хорьков показано, что на 6-е сут после заражения более чем в 100 раз снижается нагрузка по вирусной РНК в группах вакцинированных животных по сравнению с группой плацебо. Коронавирус из носовых смывов детектируется у 6 (33%) из 18 вакцинированных хорьков и у 100% животных в группе плацебо. На 8-е сут после заражения вирусная РНК выделяется в носовом смыве у 11% вакцинированных хорьков и 67% животных в группе плацебо, при этом на культуре клеток вирус высевается

у 50% животных из группы плацебо и 11% вакцинированных животных. Время элиминации вируса из ВДП вакцинированных хорьков сокращается более чем на 6 сут в сравнении с группой плацебо (см. рис. 4).

Для приматов показано, что на 2-, 4-, 6-, 8-, 10- и 12-е сут после заражения статистически значимых отличий в вирусной нагрузке в мазках из носа для вакцинированных и групп плацебо внутри каждого из двух видов не зарегистрировано. Скорость элиминации коронавируса с поверхности слизистой носа у зеленых мартышек была больше, чем у макак-резусов, как для вакцинированных, так и в группах плацебо. Масса тела приматов после заражения вакцинированных и групп плацебо значимо не изменялась. Однако у приматов каждого вида,

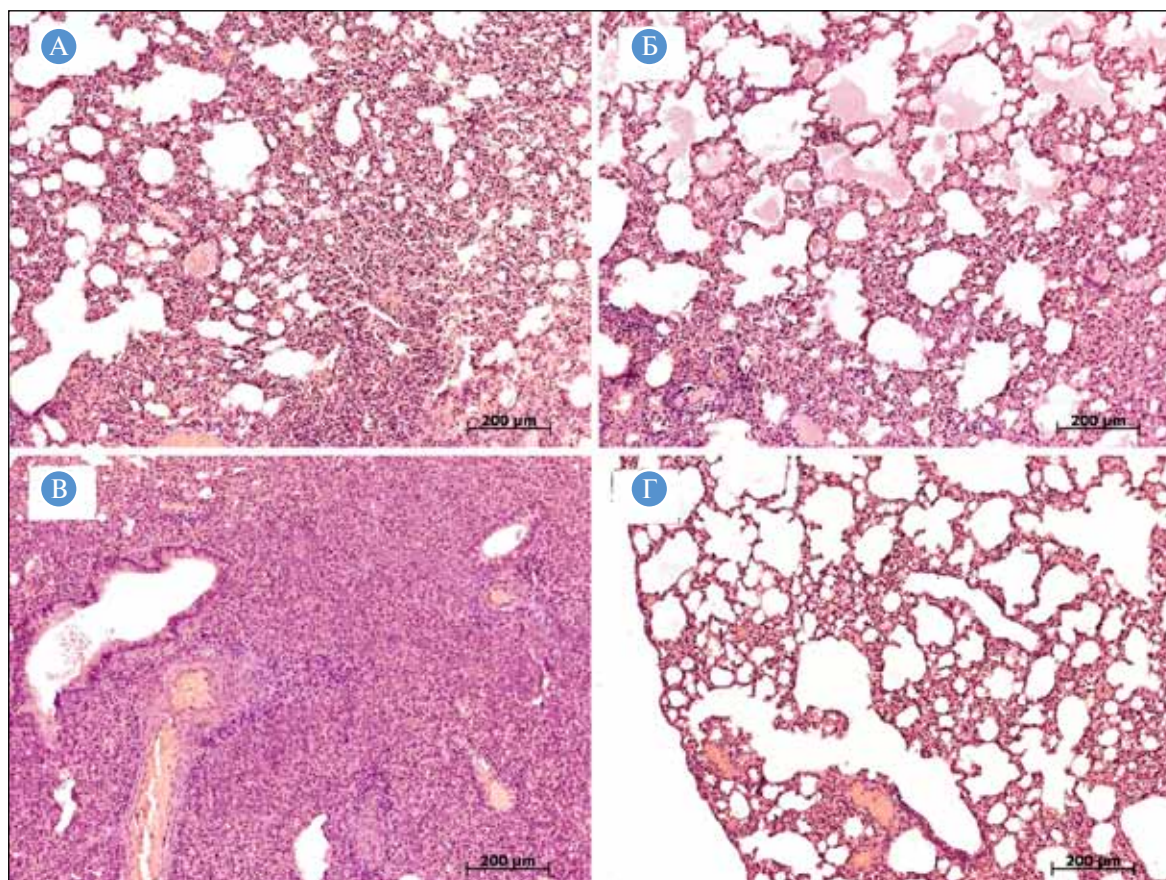


Рис. 5. Гистологическое исследование легких хомяков, зараженных SARS-CoV-2. А, Б — легкие хомяков, иммунизированных вакциной ЭпиВакКорона, через 6 сут после заражения коронавирусом: А — доза 260 мкг (наблюдаются ателектаз, плазморрагии, локальная выраженная воспалительно-клеточная инфильтрация лимфоидными клетками и нейтрофильными гранулоцитами, мелкие бронхи без эпителия, но диапедез либо слабый (лимфоциты), либо вообще малозаметный), Б — доза 86 мкг (выраженные ателектаз, распространенная инфильтрация нейтрофилами, васкулит и деструкции отдельных мелких бронхов, мелкие локусы некротизации, полости альвеол заполнены плазмой и эритроцитами); В — легкие невакцинированных хомяков через 6 сут после заражения коронавирусом (паренхима практически безвоздушна за счет альвеолярно-геморрагического синдрома и выраженной инфильтрации мононуклеарами, микроангиопатия, плазматическое пропитывание стенок сосудов, межальвеолярные перегородки резко утолщены, встречаются бронхиолиты и гиалиновые мембраны); Г — легкие невакцинированных хомяков до заражения коронавирусом

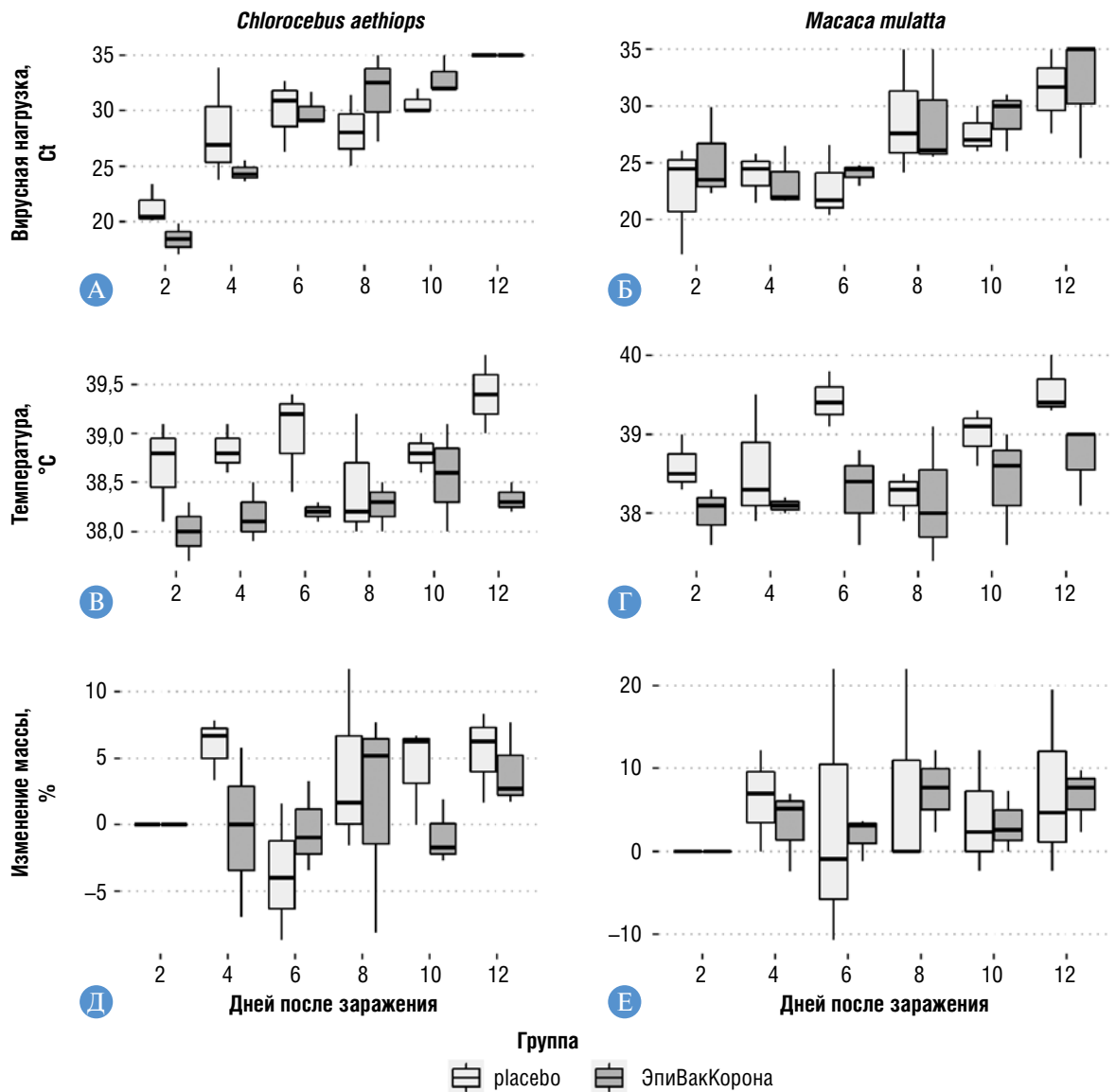
Chlorocebus aethiops и *Macaca mulatta*, в контрольных группах после заражения температура тела регистрировалась на 1 °С выше, чем у вакцинированных животных (рис. 6).

На 14-е сут после заражения приматов животным делали рентгенограмму с целью контроля появления признаков пневмонии. Все вакцинированные животные были защищены от развития очагово-инфильтративных изменений легких, характерных для вирусных пневмоний. В то же время в группе плацебо после заражения коронавирусом SARS-CoV-2 у 67% приматов каждого вида, *Chlorocebus aethiops* и *Macaca mulatta*, были зарегистрированы рентгенологические признаки вирусной пневмонии (рис. 7).

Есть два основных гистологических признака поражения легких при коронавирусной инфекции — диффузное альвеолярное повреждение и альвеолярно-геморрагический синдром. Оба эти признака присутствуют у животных в настоящем эксперименте, однако в контрольной группе проявляются в гораздо большей степени, чем в группах вакцинированных приматов. Мишени первичного повреждения — альвеолярные пневмоциты 1-го и 2-го типов и эндотелий капилляров (мишень не для вируса). Геморрагический синдром обусловлен тотальным повреждением капилляров альвеолярных перегородок, вследствие

этого развиваются тяжелый отек легких (отек высокой проницаемости), артериальная гипоксия и дыхательная недостаточность. Диффузное альвеолярное повреждение предполагает стадийность процесса. Повреждение аэрогематического барьера приводит к внутриальвеолярному отеку, экссудации фибрина с последующим образованием гиалиновых мембран, препятствующих газообмену (экссудативная фаза). В дальнейшем происходят внутриальвеолярный фиброз, организация (склерозирование) пораженной ткани (пролиферативная фаза). У всех вакцинированных животных патологические находки соответствовали начальной стадии фазы пролиферации. В то же время у животных контрольных групп изменения в легких, характерные для пролиферативной фазы, обнаруживались наряду с признаками, характерными для ранней (экссудативной) фазы, что может указывать на продолжающееся патологическое воздействие (рис. 8).

Полученные нами результаты показывают, что у зеленых мартышек площадь тяжелого поражения меньше (около 25%), чем у макак-резусов (40–45%). В то же время у зеленых мартышек очень ярко проявлялся альвеолярно-геморрагический синдром, особенно у животных контрольной группы. Следует отметить, что массивные периваскулярные, внутрибронхиолярные и интраальвео-



14

Рис. 6. Защитное действие вакцинации ЭпиВакКорона на зеленых мартышках и макаках-резусах по вирусной нагрузке в верхних дыхательных путях, температуре тела и уменьшению массы тела после заражения коронавирусом. Всем животным группы ЭпиВакКорона препарат вводился двукратно внутримышечно в дозе 260 мкг с интервалом 14 сут между инъекциями. А, Б — вирусная нагрузка, измеренная по значению порогового цикла Ct, в носовом смыве приматов на 2-, 4-, 6-, 8-, 10- и 12-й дни после интраназального заражения коронавирусом: А — *Chlorocebus aethiops*, Б — *Macaca mulatta*; В, Г — температура тела у приматов на 2-, 4-, 6-, 8-, 10- и 12-й дни после интраназального заражения коронавирусом: В — *Chlorocebus aethiops*, Г — *Macaca mulatta*; Д, Е — изменение массы тела у приматов на 2-, 4-, 6-, 8-, 10- и 12-й дни после интраназального заражения коронавирусом: Д — *Chlorocebus aethiops*, Е — *Macaca mulatta*

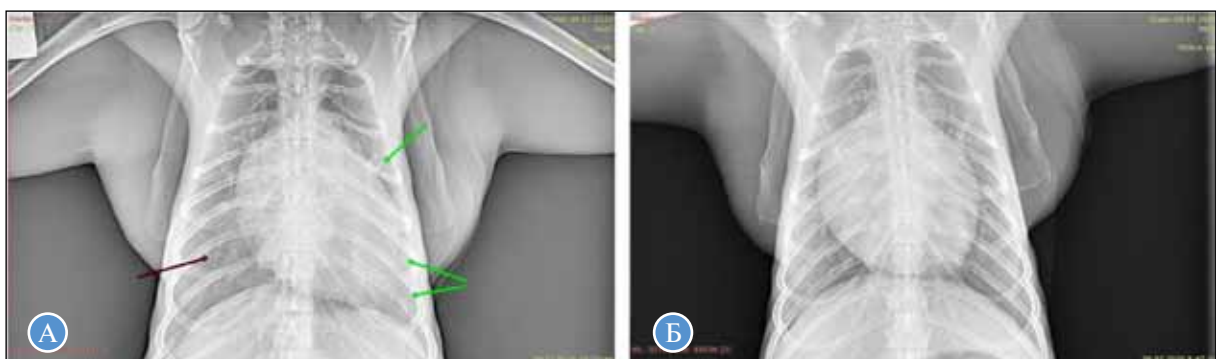


Рис. 7. Рентгенограмма органов грудной полости африканской зеленой мартышки в передней проекции через 14 сут после заражения вирусом. А — невакцинированное животное (стрелками указаны уплотнение легочной ткани неравномерной интенсивности в нижних и средних отделах слева, усиленный легочный рисунок в нижних отделах справа); Б — вакцинированное животное (признаки пневмонии не регистрируются)

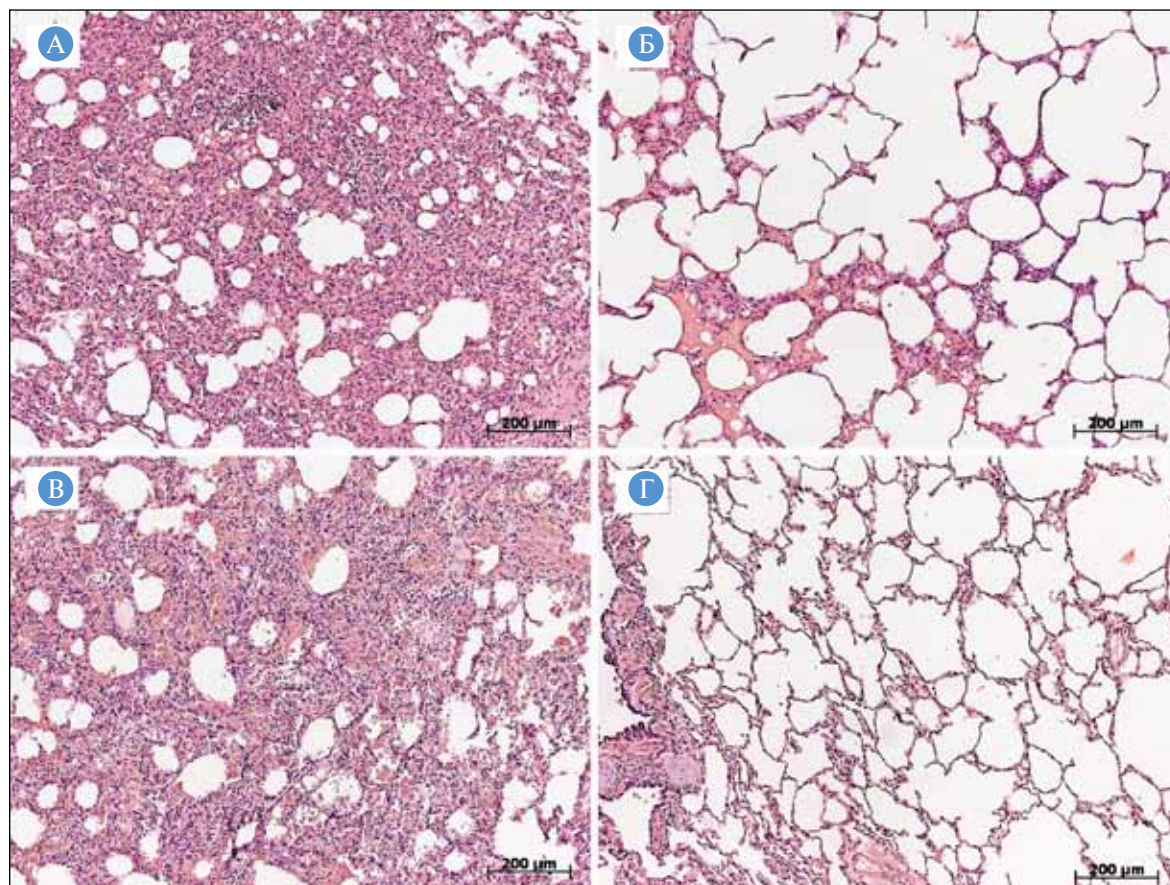


Рис. 8. Гистологическое исследование легких приматов, зараженных SARS-CoV-2. А, В — группа плацебо: А — примат *Clorocebus aethiops* № 9618. Плотный ателектаз, выраженный отек и воспалительная инфильтрация лимфоидными клетками и нейтрофилами, потеря воздушности сопровождается спазмом сосудов и мелких бронхов, стаз эритроцитов в сосудах микроциркуляторного русла, единичные васкулиты и бронхолиты, окраска гематоксилином и эозином. Бар указан на снимке; В — примат *Clorocebus aethiops* № 9628. Гиперемия сосудов, кровоизлияния и плазморрагии в полости альвеол, тромбоз мелких сосудов артериального типа, плазматическое пропитывание стенок кровеносных сосудов, отдельные мелкие очаги фибриноидного некроза, окраска гематоксилином и эозином. Бар указан на снимке. Б, Г — группа ЭпиВакКорона: Б — примат *Macaca mulatta* № 9643. Небольшой очаг плазмо- и геморрагии в полости альвеол, умеренная лимфоцитарная инфильтрация и отек межальвеолярных перегородок, перифокальная компенсаторная эмфизема, окраска гематоксилином и эозином. Бар указан на снимке; Г — примат *Clorocebus aethiops* № 9616. Перибронхиально наблюдаются небольшие скопления лимфоцитов, умеренно выраженные эмфизематозные изменения легочной ткани, окраска гематоксилином и эозином. Бар указан на снимке

лярные кровоизлияния, формирование геморрагических инфарктов — признаки ранней фазы патологического процесса. Это очень существенное различие двух моделей приматов, причем отмечалось оно как макроскопически, так и при гистологическом исследовании.

Обсуждение

Вакцина обладает потенциалом для создания коллективного иммунитета, что позволит снизить заболеваемость, предотвратить распространение вируса и уменьшить социальное и экономическое бремя, опосредованное COVID-19. Хотя разрабатываемая вакцина на основе любой технологической платформы должна удовлетворять требованиям безопасности, у каждого вида препарата могут возникнуть свои ограничения в применении для определенной группы населения (дети, беременные женщины, люди с иммуносупрессивными состояниями). Среди всех разрабатываемых типов вакцин (живые аттенуированные, на основе вирусных векторов, субъединичные и др.) вакцины на основе пептидных антигенов являются одними из самых безопас-

ных. Это обусловлено тем, что на этапе дизайна вакцины исключаются эпитопы, вызывающие антителзависимое усиление инфекции, а также сводятся к минимуму реактогенные или аллергенные эффекты. Недостатком вакцины такого типа может быть ее низкая иммуногенность, однако данная проблема решается применением адъювантов [15].

Разработанная нами вакцина ЭпиВакКорона при двукратном введении с интервалом в 14 дней хомякам, хорькам и низшим приматам (африканским зеленым мартишкам и макакам-резусам) в дозе, равной одной прививочной дозе для человека, вызывает индукцию антител у 100% животных. В опытах на хомяках показано, что вакцинный препарат обладает иммуногенностью. Показано, что вакцина индуцирует ускорение элиминации вируса из верхних дыхательных путей (хорьки) и предотвращает развитие пневмонии у лабораторных животных (хомяки, приматы) после респираторного заражения новым коронавирусом. Рентгенологические исследования легких хомяков и приматов после заражения коронавирусом подтвердили полное отсутствие признаков пневмонии у вакцинированных животных обоих видов. Гистологические исследования ткани лег-

ких у хомяков и приматов также показали существенное снижение степени поражения легких вакцинированных животных после интраназального заражения новым коронавирусом.

Вакцина ЭпиВакКорона индуцирует высокие уровни иммунного ответа на антигены пептидной вакцины. Так, значения СГТ антител к антигену вакцины в сыворотке крови хомяков, привитых дозой 260 мкг, через 2 нед после второй прививки составили 1:11943. К этому же сроку у 100% вакцинированных хорьков формируется высокий уровень специфических антител, и СГТ в трех группах хорьков, иммунизированных тремя сериями вакцины ЭпиВакКорона, варьирует в диапазоне 1:9051–1:10159. У приматов вакцина индуцирует антитела в высоких титрах у 100% животных к антигенам вакцины и к цельновирионному антигену коронавируса через 2–3 нед после первой вакцинации. Через 4 нед после первой вакцинации СГТ к антигену вакцины у макак-резусов достигает значения 1:12800, а у зеленых мартышек — 1:11143. 100% животных из экспериментальной группы имели титр антител, специфичных к антигену вакцины, в диапазоне 1:6400–1:25600. При этом после экспериментального заражения вакцинированных животных ни у одного из приматов или хомяков не обнаружено очагово-инфильтративных изменений легких, характерных для вирусных пневмоний, тогда как у испытуемых животных группы плацебо наблюдалась обширная степень поражения легочной ткани и признаки вирусной пневмонии (плеврит, кардиомегалия).

Ускоренная элиминация вируса из ВДП наблюдалась только у вакцинированных хорьков. Возможно, инфицирующие дозы коронавируса, применяемые для привитых приматов и хомяков и равные 10^6 и 10^2 инфекционных единиц соответственно, оказались достаточно высокими, чтобы развитие инфекции клеток слизистой ВДП было остановлено системным иммунитетом, индуцированным в результате инъекции пептидной вакцины.

У вакцинированных животных нейтрализующие антитела регистрировались в низких титрах. Однако у 100% зеленых мартышек через 2 нед после вакцинации обнаружены нейтрализующие антитела, титр которых уменьшается через 4 нед после вакцинации. Титры вируснейтрализующих антител (1:40 или более) были обнаружены у большинства иммунизированных хорьков (16 из 18), и у большинства животных наблюдалась сероконверсия на 14-й день после вакцинации. Нейтрализация вируса наблюдалась для сывороток 60% хомяков, иммунизированных 260 мкг ЭпиВакКорона, и для сывороток 50% животных, иммунизированных 86 мкг вакцины. Однако у вакцинированных хомяков регистрировалась 100%-я защита от пневмонии, что также было показано и для обезьян. В экспериментальной модели на хорьках продемонстрирована ускоренная элиминация вируса из ВДП вакцинированных животных. По-видимому, существуют и другие связанные с наличием вирусспецифических антител факторы противовирусной защиты, наблюдаемые у всех вакцинированных животных при высоких титрах. Нейтрализующие вирусспецифические антитела также способствуют защите посредством опсонизации вирусных частиц и инфицированных клеток и антителозависимой цитотоксичности, включая классический путь активации комплемента и клеточно-опосредованную цитотоксичность.

Вопрос о значимости клеточного и гуморального иммунного ответа и их роли в предотвращении повторно-

го заражения коронавирусом активно изучается. Одним из предположений является то, что для элиминации коронавируса в первую очередь необходим Т-клеточный иммунный ответ. Показано, что SARS-CoV-1-специфические Т-клетки памяти сохраняются в периферической крови пациентов до 6–11 лет после инфицирования при отсутствии В-клеток памяти [16, 17]. Было показано, что N-белок SARS-CoV-2, используемый в качестве белка-носителя в вакцине ЭпиВакКорона, содержит большое количество В- и Т-клеточных эпитопов [18–21], а недавно он также был предложен в качестве ценного антигена для вакцин против SARS-CoV-2, разработанных несколькими исследовательскими группами [22, 23]. Таким образом, N-белок, используемый в ЭпиВакКорона, может не только способствовать защите как источник Т-хелперных эпитопов, но и вызывать антигенспецифические CD8⁺ Т-клеточные ответы, что требует дальнейшего изучения. Однако гидроксид алюминия, используемый в качестве адъюванта, и способ иммунизации неоптимальны для стимуляции клеточного иммунного ответа.

Очень важно отметить тот факт, что вакцинированные приматы демонстрировали пониженные, но относительно высокие титры антител (до 1:3200), специфичных к антигену вакцины, через 4 мес после первой иммунизации вакциной ЭпиВакКорона, независимо от того, высокий (1:25600) или минимальные (1:6400) уровни вакциносспецифических антител были достигнуты в первые недели после вакцинации, что указывает на способность пептидной вакцины индуцировать специфические антитела в течение достаточно длительного периода.

Заключение

Проектирование синтетической пептидной вакцины ЭпиВакКорона против нового коронавируса SARS-CoV-2 проводилось на основании информации о первичной структуре белков этого вируса и о структурно-функциональной организации оболочечных белков родственных коронавирусов (SARS, MERS). На этапе проектирования и предварительных скрининговых исследований иммуногенности и протективной активности исследовались пептиды, содержащие функционально значимые и наиболее консервативные участки вирусных белков, которые способны обеспечить устойчивость вакцины к появлению новых антигенно измененных вариантов коронавируса. Часть пептидов была исключена из состава вакцины в связи с потенциально возможным или обнаруженным их иммунопатологическим действием. Для создания полноценного иммунного ответа использовалась схема двойной внутримышечной вакцинации, а гидроксид алюминия применялся в качестве адъюванта. Простота конструкции, содержащей консервативные элементы белков, отсутствие элементов вирусного генома или нативных вирусных белков обеспечивают высокую степень безвредности препарата, формирование иммунного ответа, не чувствительного к антигенному дрейфу коронавируса, а также возможность многократной ревакцинации препаратом ЭпиВакКорона для поддержания защитного уровня противовирусного иммунитета при естественном его ослаблении.

Проведенные исследования показали, что вакцина ЭпиВакКорона обладает выраженной специфической активностью и обеспечивает защиту от заболевания, вы-

зываемого SARS-CoV-2, хомяков, хорьков и нечеловекообразных приматов. Полученные результаты позволяют рассматривать вакцину ЭпиВакКорона как перспективный препарат, способный контролировать распространение нового коронавируса, и можно рекомендовать эту вакцину для проведения клинических исследований.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование финансировалось Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

Конфликт интересов. А.Б. Рыжиков, М.П. Богрянцева, Е.Д. Даниленко, И.Р.Иматдинов, Е.А. Нечаева, О.В. Пьянков, О.Г. Пьянкова, И.М. Сулопаров, Е.А. Рыжиков, Е.В. Гаврилова, Р.А. Максютлов являются авторами патента RU2738081 на пептидные иммуногены и состав вакцины. Е.С. Слепцова, Е.А.Рыжиков заявляют о трудоустройстве в ООО «ЭпиВак». Все остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Все авторы подтверждают, что они соответствуют критериям авторства ИСМЖЕ. Рыжиков А.Б. — руководитель работ, разработчик вакцины, написание статьи; Рыжиков Е.А. — разработчик вакцины, дизайн, синтез и технология получения; Богрянцева М.П. — выпуск и аттестация серии вакцины ЭпиВакКорона для ДКИ; Даниленко Е.Д. — выпуск

и аттестация серии вакцины ЭпиВакКорона для ДКИ; Иматдинов И.Р. — дизайн белка-носителя и продуцент; Нечаева Е.А. — выпуск и аттестация серии вакцины ЭпиВакКорона для ДКИ. Пьянков О.В. — вирусологические исследования на культуре клеток, на лабораторных животных; Пьянкова О.Г. — вирусологические исследования; Сулопаров И.М. — технология наработки и очистки белка-носителя; Таранов О.С. — гистологические исследования на лабораторных животных; Данильченко Н.В. — вирусологические исследования на лабораторных животных; Слепцова Е.С. — технология получения вакцины, иммунологические исследования; Боднев С.А. — молекулярно-биологические исследования; Онхонова Г.С. — технология наработки и очистки белка-носителя; Петров В.Н. — поисково-аналитическая работа, редактирование статьи; Моисеева А.А. — вирусологические исследования; Торжкова П.Ю. — технология наработки и очистки белка-носителя; Пьянков С.А. — иммунологические исследования; Трегубчак Т.В. — молекулярно-биологические исследования, редактирование статьи; Антоненко Д.В. — анализ данных экспериментов, статистический анализ, редактирование статьи; Гаврилова Е.В. — дизайн, координация, регулирование исследования; Максютлов Р.А. — курирование всех работ по проведению ДКИ.

Англоязычная версия. Англоязычная версия данной статьи доступна по адресу <https://vestnikramn.spr-journal.ru/jour/article/view/1528>

17

ЛИТЕРАТУРА

1. Q&A: Influenza and COVID-19 — similarities and differences. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza>
2. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. World Health Organization. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
3. Wang QD, Zhang LF, Kuwahara K, et al. Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates. *ACS Infect Dis*. 2016;2(5):361–376. doi: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00006>
4. Song WF, Gui M, Wang XQ, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathogens*. 2018;14(8):e1007236. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007236>
5. GISAID Database. Available from: <https://www.gisaid.org/>
6. Maksyutov AZ, Bachinskii AG, Bazhan SI, Ryzhikov EA. Design of safe AIDS vaccines based on search for local similarities between HIV-1 and human proteins. *AIDS vaccines and related topics*. Bourinbaier AS, ed. Research Signpost, Kerala, India; 2004. P.47–62.
7. Goncharova E, Ryzhikov E, Poryvaev V, et al. Intranasal immunization with inactivated tick-borne encephalitis virus and the antigenic peptide 89–119 protects mice against intraperitoneal challenge. *Int J Med Microbiol*. 2006;296(Suppl 40):195–201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.002>
8. Maksyutov AZ, Ryzhikov AB, Kolobov AA, Maksyutov ZA. Antigenic peptides. Patent WO 2004/031212;2004.
9. Bjornson-Hooper ZB, Fragiadakis GK, Spitzer MH, et al. A comprehensive atlas of immunological differences between humans, mice and non-human primates. *bioRxiv*. 2019:574160. doi: <https://doi.org/10.1101/574160>
10. Zaks L. Statistical estimation. (Theory and methods). Moscow: Statistika; 1976.
11. Ashmarin IP, Vorob'yov AA. Statistical Methods in Microbiological Research. Leningrad: Medgiz; 1962.
12. R v.4.0.2; R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <https://www.R-project.org>
13. Ni L, Ye F, Cheng M-L, et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*. 2020;52(6):971–977.e3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
14. Ryzhikov AB, Ryzhikov EA, Bogryantseva MP, Gavrilova EV, Danilenko ED, Imatdinov IR, Maksyutov RA, Nechaeva EA, Popova AYU, Pyankov OV, Pyankova OG, Suloparov IM. Peptide immunogens and vaccine composition against COVID-19 coronavirus infection using peptide immunogens. Patent RU 2738081. 2020.
15. Azmi F, Ahmad Fuaad AA, Skwarczynski M, Toth I. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(3):778–796. doi: <https://doi.org/10.4161/hv.27332>
16. Tang F, Quan Y, Xin ZT, et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunol*. 2011;186(12):7264–7268. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903490>
17. Ng OW, Chia A, Tan AT, et al. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine*. 2016;34(17):2008–2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.063>
18. Musicò A, Frigerio R, Mussida A, et al. SARS-CoV-2 Epitope Mapping on Microarrays Highlights Strong Immune Response to N Protein Region. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(1):35. doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines9010035>
19. Shrock E, Fujimura E, Kula T, et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and corre-

- lates of severity. *Science*. 2020;370(6520):eabd4250. doi: <https://doi.org/10.1126/science.abd4250>
20. Wang H, Wu X, Zhang X, et al. SARS-CoV-2 Proteome Microarray for Mapping COVID-19 Antibody Interactions at Amino Acid Resolution. *ACS Cent Sci*. 2020;6(12):2238–2249. doi: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00742>
21. Ferretti AP, Kula T, Wang Y, et al. Unbiased Screens Show CD8+ T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein. *Immunity*. 2020;53(5):1095–1107.e3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.006>
22. He J, Huang JR, Zhang YL, Zhang J. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein intranasal inoculation induces local and systemic T cell responses in mice. *J Med Virol*. 2021;93:1923–1925. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.26769>
23. Ahlén G, Frelin L, Nikouyan N, et al. The SARS-CoV-2 N Protein Is a Good Component in a Vaccine. *J Virol*. 2020;94(18):e01279–20. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01279-20>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Рыжиков Александр Борисович, к.б.н., заведующий отделом [*Aleksandr B. Ryzhikov*, Cand. Sc. (Biology), Department Head]; адрес: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово [address: 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia]; e-mail: ryzhik@vector.nsc.ru, SPIN-код: 9282-2863, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>

Рыжиков Евгений Александрович, директор ООО [*Evgenii A. Ryzhikov*, Director]; e-mail: e.a.ryzhikov@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4233-7870>

Богрянцева Марина Поликарповна, к.б.н., заведующая отделом [*Marina P. Bogryantseva*, Cand. Sc. (Biology), Department Head]; e-mail: bogryantseva@vector.nsc.ru, SPIN-код: 5017-6279, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0467-5024>

Даниленко Елена Дмитриевна, к.б.н., директор [*Elena D. Danilenko*, Cand. Sc. (Biology), Director]; e-mail: danilenko_ed@vector.nsc.ru, SPIN-код: 1388-4127, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Иматдинов Ильназ Рамисович, к.б.н., ведущий научный сотрудник [*Ilnaz R. Imatdinov*, Cand. Sc. (Biology), Leading Researcher]; e-mail: imatdinov_ir@vector.nsc.ru, SPIN-код: 8174-1635, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6927-7580>

Нечаева Елена Августовна, к.м.н., заместитель генерального директора [*Elena A. Nechaeva*, Cand. Sc. (Medicine), Deputy Director General]; e-mail: nechaeva@vector.nsc.ru, SPIN-код: 9270-8888, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6901-7738>

Пьянков Олег Викторович, к.б.н., заведующий отделом [*Oleg V. Pyankov*, Cand. Sc. (Biology), Department Head]; e-mail: pyankov@vector.nsc.ru, SPIN-код: 8622-9293, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Пьянкова Ольга Григорьевна, ведущий научный сотрудник [*Olga G. Pyankova*, Leading Researcher]; e-mail: pyankova_og@vector.nsc.ru; SPIN-код: 5872-2078

Суслопаров Иван Михайлович, к.б.н., старший научный сотрудник [*Ivan M. Susloparov*, Cand. Sc. (Biology), Senior Researcher]; e-mail: imsous@vector.nsc.ru, SPIN-код: 8371-4785, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9718-7339>

Таранов Олег Святославович, заведующий отделом [*Oleg S. Taranov*, Department Head]; e-mail: taranov@vector.nsc.ru, SPIN-код: 5894-6518, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Гудымо Андрей Сергеевич, младший научный сотрудник [*Andrei S. Gudymo*, Junior Researcher]; e-mail: gudymo_as@vector.nsc.ru, SPIN-код: 5274-0265, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>

Данильченко Наталья Викторовна, младший научный сотрудник [*Natalya V. Danilchenko*, Junior Researcher]; e-mail: danilchenko_nv@vector.nsc.ru, SPIN-код: 3041-1686, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>

Слепцова Екатерина Сергеевна, начальник отдела контроля качества [*Ekaterina S. Sleptsova*, Head of the Quality Control Department]; e-mail: katyuss@yandex.ru

Боднев Сергей Александрович, к.м.н., ведущий научный сотрудник [*Sergei A. Bodnev*, Cand. Sc. (Medicine), Leading Researcher]; e-mail: bodnev@vector.nsc.ru, SPIN-код: 2219-2723, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0599-3817>

Онхонова Галина Сергеевна, младший научный сотрудник [*Galina S. Onkhonova*, Junior Researcher]; e-mail: onhonova_gs@vector.nsc.ru, SPIN-код: 2017-8031, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1547-1708>

Петров Владимир Николаевич, заведующий отделом [*Vladimir N. Petrov*, Department Head]; e-mail: vnpetrov@vector.nsc.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3270-8412>

Моисеева Анастасия Алексеевна, младший научный сотрудник [*Anastasiya A. Moiseeva*, Junior Researcher]; e-mail: chalaya_aa@vector.nsc.ru, SPIN-код: 9361-8776, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7048-2357>

Торжкова Полина Юрьевна, стажер-исследователь [*Polina Yu. Torzhkova*, Research Intern]; e-mail: torzhkova_pyu@vector.nsc.ru, SPIN-код: 8720-8129, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0387-1907>

Пьянков Степан Александрович, ведущий научный сотрудник [*Stepan A. Pyankov*, Leading Researcher];
e-mail: pyankov_sa@vector.nsc.ru, **SPIN-код:** 1344-4854, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>

Трегубчак Татьяна Владимировна, ведущий научный сотрудник [*Tatyana V. Tregubchak*, Leading Researcher];
e-mail: tregubchak_tv@vector.nsc.ru, **SPIN-код:** 1028-1981, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9608-2044>

Антонец Денис Викторович, к.б.н., старший научный сотрудник [*Denis V. Antonets*, Cand. Sc. (Biology), Senior Researcher]; **e-mail:** antonets@yandex.ru, **SPIN-код:** 6825-8804, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1823-9701>

Гаврилова Елена Васильевна, к.б.н., заместитель генерального директора [*Elena V. Gavrilova*, Cand. Sc. (Biology), Deputy Director]; **e-mail:** gavrilova_ev@vector.nsc.ru, **SPIN-код:** 4523-9695,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7118-5749>

Максютов Ринат Амирович, д.б.н., генеральный директор [*Rinat A. Maksyutov*, D.Sc. (Biology), General Director];
e-mail: maksyutov_ra@vector.nsc.ru, **SPIN-код:** 7332-2123, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>