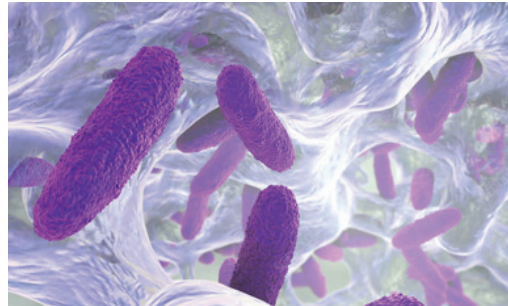


Современные технологические платформы для разработки вакцин против опасных бактериальных инфекций (часть II)*

Одной из целей федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья» является создание технологических платформ для быстрой разработки вакцинных препаратов против вновь возникающих и возвращающихся бактериальных инфекций.

Для ускорения процессов разработки предложена технология модульных вакцин (вакцинных платформ). Технология опирается на предварительно создаваемый «конструктор», включающий базовые носители (платформы) на основе прототипов уже известных патогенов и модульные антигены. Наличие таких заранее приготовленных «конструкторов», чьи базовые носители и модульные антигены успешно прошли фазу II клинических испытаний, может способствовать ускорению разветвления их производства.



Предлагаемый ФБУН ГНЦ ПМБ комплексный алгоритм ускоренной разработки и выпуска на коммерческий рынок бактериальных модульных вакцин против эмерджентных бактериальных инфекций с пандемическим потенциалом включает четыре взаимодополняющих технологических тренда (платформы):

- 1) вакцины на основе «бактериальных теней» или везикул наружной мембраны;
- 2) живые прецизионно аттенуированные вакцины для преимущественно первичной иммунизации на основе штаммов бактерий с геномами, отредактированными для снижения токсигенности и аллергенности, а также векторные рекомбинантные вакцины;
- 3) субъединичные полисахаридные вакцины;
- 4) субъединичные белковые, в том числе микрокапсулированные, вакцины.

Для ускоренного создания конечных продуктов, разрабатываемых в рамках проекта, а также продуктов, которые будут созданы для решения проблем биологической безопасности в конкретных эпидемиологических условиях, необходимо наличие пилотной линии, позволяющей в экспериментально-производственных условиях реализовать все четыре платформы разработки вакцинных препаратов. Это позволит в кратчайшие сроки оценить эффективность биотехнологических процессов получения вакцин, включая стабильность продуцентов, эффективность синтеза целевых продуктов, стабильность компонентов на стадии формирования готовой лекарственной формы.

Для ускоренного испытания разработанных прототипов вакцинных препаратов и их компонентов в условиях острых опытов с высококонтагиозными патогенами необходимы помещения с условиями высшей степени биологической защищенности (BSL-4) с испытательными стендами, позволяющими проводить исследования по вакцинации, заражению, лечению всех видов лабораторных животных (включая обезьян), в том числе в условиях использования аэрозолей. Наличие такого комплекса позволит в безопасных условиях оценить разработанные препараты, что особенно актуально при создании средств специфической профилактики против принципиально новых возбудителей и патогенных биологических агентов, отличающихся повышенной вирулентностью и контагиозностью.

*Часть I опубликована в журнале «Бактериология» 2022; 7(2): 5-7.

Обоснование платформы «Вакцины на основе «бактериальных теней» и/или везикул наружной мембраны»

«Бактериальные тени» (БТ) представляют собой неповрежденные клеточные стенки грам-отрицательных бактерий, не содержащие цитоплазмы и ее составляющих, сохраняющие трехмерную клеточную структуру исходного микроба и образующиеся под воздействием формирующего в клеточной стенке тоннели белка E бактериофага φX174 или других щадящих биологических или химических факторов, ведущих к истечению из клетки цитоплазматического содержимого. Разработанные как альтернативно инактивированные вакцины с повышенной безопасностью, БТ могут быть использованы и в качестве эффективных носителей, способных одновременно повышать иммуногенность нескольких интактных антигенов.

На сегодняшний день БТ успешно получены на моделях *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Helicobacter pylori*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Brucella*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pestis*.

Создание набора «литических» плазмид подразумевает конструирование способных реплицироваться в выбранном микроорганизме в небольшом количестве копий на клетку плазмидных векторов, несущих промоторы со строгим контролем индукции в данном микроорганизме и кассеты генов литических белков бактериофагов (гена белка E фага φX174, генов белков S, R и Rz фага λ и т.п.) Векторы, используемые для этих целей, должны быть построены модульным способом, чтобы обеспечить будущие адаптации.

Схема производства бактериальных теней состоит из ряда стадий:

- посев стартовой культуры,
- посев культуры в ферментер,
- выращивание культуры до экспоненциальной стадии роста,
- индукция лизиса культуры,
- индукция гена неспецифической нуклеазы для расщепления нуклеиновых кислот (дополнительная инактивация выживших клеток, удаление нуклеиновых кислот для предотвращения рекомбинации, снижение вязкости культуры),
- сбор и концентрирование лизированной культуры,
- инактивация следовых количеств жизнеспособных клеток обработкой антибиотиком или β-пропиолактоном,
- отмывка бактериальных теней от компонентов среды, цитоплазматического содержимого и инактивирующих агентов. Концентрирование препарата бактериальных теней.
- контроль отсутствия в препарате нуклеиновых кислот,
- добавление дополнительных компонентов (антигены, адъюванты, криопротекторы, стабилизаторы и т.п.),
- фасовка и лиофилизация готового вакцинного препарата,
- заключительный контроль на стерильность и способность к суспендированию.

Этапами непосредственной разработки кандидатной вакцины в рамках технологического тренда «везикулы внешней мембраны» являются:

- полногеномное секвенирование нового возбудителя;
- определение таксономической принадлежности нового возбудителя. Определение методами обратной вакцинологии предположительных протективных антигенов, факторов патогенности и аллергенов данного возбудителя;
- оптимизация везикулообразования на модели прототипа нового патогена методами редактирования генома;
- отработка условий культивирования, обеспечивающих максимальный выход везикул;
- отработка условий инактивации следовых количеств жизнеспособных клеток;
- отработка условий конъюгирования модульных протективных антигенов с носителем – везикулами аттенуированного прототипного патогена;
- отработка условий контроля стерильности готового препарата (лабораторный и опытно-промышленный регламент).

Обоснование выбора платформы «Живые прецизионно аттенуированные вакцины, а также векторные рекомбинантные вакцины»

Конструирование аттенуированных штаммов патогенных микроорганизмов, пригодных для использования в качестве живых вакцин, за четыре месяца не представляется возможным без предварительных фундаментальных/поисковых исследований патогенов.

Использование методов геной инженерии позволяет идентифицировать и делетировать гены, необходимые для патогенности микроорганизмов, позволяя аттенуировать исходные штаммы, не способные далее к реверсии к вирулентной форме.

Для доставки гетерологичных антигенов описано использование различных серотипов *S. enterica* (серовары Typhi и Typhimurium), *Listeria monocytogenes*, штаммов *Lactobacillus*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus gordonii*, холерного вибриона, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Y. enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Mycobacterium smegmatis*.

Алгоритм разработки кандидатной вакцины в рамках технологического тренда «живые вакцины на основе аттенуированных прототипов патогенов» состоит на предварительном этапе из:

- создания коллекции эпидемически значимых штаммов и их всестороннего исследования с полногеномным секвенированием;
- подбора питательных сред и условий культивирования эпидемически значимых штаммов;
- создания аттенуированных векторных бактериальных штаммов с использованием современных генно-инженерных подходов, включая методы аллельного обмена и геномного редактирования;
- проверки биологических свойств полученных штаммов с использованием широкого спектра лабораторных моделей.

При непосредственной разработке прототипа вакцины на основе клинического материала необходимы:

- экспресс-тестирование клинического материала и одновременное проведение микробиологических исследований с выделением чистой культуры возбудителя;
- серологические исследования, выбор экспериментальной модели животных, полногеномное секвенирование выделенных штаммов-возбудителей заболевания с биоинформационным анализом секвенированных геномов;
- выбор потенциальных протективных антигенов, перспективных для использования в составе бактериальных живых платформ с использованием методологии обратной вакцинологии;
- конструирование штаммов – продуцентов потенциально протективных антигенов эпидемически значимых штаммов;
- поиск и адаптация эффективных векторных плазмид и штаммов-реципиентов;
- аналитическая и препаративная наработка рекомбинантных белков в клетках штаммов продуцентов;
- иммуно-биохимические исследования рекомбинантных белков;
- получение поли- и моноклональных антител;
- исследование взаимодействия антител с целевыми бактериальными штаммами;
- конструирование бактериальных живых рекомбинантных вакцин на основе бактериальных векторных штаммов;
- оптимизация экспрессии гетерологичных генов, кодирующих протективные антигены в клетках бактериальных векторных штаммов;
- изучение иммунобиохимических и протективных свойств созданных рекомбинантных штаммов, определение их вирулентности, реактогенности, адьювантных свойств и протективности на экспериментальных моделях животных в зависимости от способов заражения;
- оптимизация технологии культивирования, концентрирования и сушки препаратов живых рекомбинантных вакцин на основе бактериальных живых платформ.

Обоснование выбора платформы «Субъединичные полисахаридные вакцины»

Липополисахариды (ЛПС) являются основными протективными антигенами грамотрицательных бактерий, но использование их в качестве компонентов вакцин ограничено в силу высокой эндотоксичности. Химическая модификация или редактирование генома позволяют получать апиrogenные низкоэндотоксичные липополисахариды (детоксицированные ЛПС) из грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* (O157, O104), *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*), обладающие высокой протективностью и безопасные для парентерального введения человеку, что создает основу для формирования технологического тренда по разработке полисахаридных вакцин против инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями (в том числе: *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., *Shigella* spp., *Bordetella* spp., *Haemophilus*

spp., *Neisseria* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Klebsiella* spp., *Chlamydia* spp., *Corynebacterium* spp.).

Алгоритм разработки кандидатной вакцины в рамках технологического тренда «субъединичные полисахаридные вакцины» состоит из:

- создания банка аттенуированных штаммов-продуцентов и детоксицированных (низкоэндоотоксичных) липополисахаридов;
- отработки технологии получения детоксицированных (низкоэндоотоксичных) липополисахаридов на аттенуированных продуцентах из различных таксономических групп (лабораторный и опытно-промышленный регламент);
- проведения доклинических и клинических испытаний (I–II фаза) готовых лиофилизированных препаратов детоксицированных (низкоэндоотоксичных) ЛПС.

Этапы непосредственной разработки включают:

- полногеномное секвенирование нового возбудителя; определение его таксономической принадлежности;
- исследования по аппаратурному и биопроцессному обеспечению выращивания в жидкой питательной среде культур штаммов грамотрицательных бактерий (подобранные питательные среды, отработанные режимы культивирования, режимы инактивации бактериальной массы);
- разработку технологии выделения и очистки детоксицированных (низкоэндоотоксичных) препаратов ЛПС из штаммов грамотрицательных бактерий (выделение из бакмассы нативных ЛПС по методу Westphal, обработка нативных препаратов ДНКазой и РНКазой, ультрацентрифугирование, анализ химической структуры, лиофилизация препаратов, мягкий щелочной гидролиз нативных ЛПС);
- подтверждение эффективности процессов очистки с помощью химических методов контроля препарата, верификации мЛПС по структуре;
- изучение безвредности, иммуногенности и протективности низкоэндоотоксичных препаратов ЛПС;
- проверку безвредности на кроликах и мышах, иммунизацию мышей, изучение сероконверсии в реакции иммуноферментного анализа (ИФА), изучение протективности на мышинных моделях – септической и колонизационной.

Обоснование выбора платформа «Субъединичные белковые вакцины»

Субъединичные вакцины конструируют на основе рекомбинатных и/или химически очищенных высокоиммуногенных протективных антигенов. В субъединичных вакцинах используются только специфические фрагменты (субъединицы) бактерий, которые иммунная система должна распознать. Они не содержат цельных микроорганизмов, за счет чего в них не содержатся балластные непротективные антигены, риск возникновения побочных эффектов при использовании незначителен. Типичными представителями этой группы иммунопрофилактических препаратов являются токсоидные вакцины. Поиск новых протективных антигенов в настоящее время проводят с помощью обратной вакцинологии, основная идея которой заключается в скрининге генома патогена с использованием биоинформатических подходов для поиска генов, кодирующих потенциально протективные антигены. Недостатком этого типа вакцин является то, что специфические антигены, используемые в субъединичной вакцине, могут не включать патоген-ассоциированных паттернов, распознаваемых иммунной системой хозяина. Кроме того, иммунный ответ на субъединичные вакцины может быть опосредован только антителами, без участия клеточного иммунитета, и, как следствие, быть слабее, чем у вакцин других типов. Для усиления иммунного ответа в состав субъединичных вакцин вводят адьюванты и/или проводят бустерные иммунизации.

Микрокапсулированные вакцины созданы на основе инкапсуляции антигенов, антигенных эпитопов и корпускулярных носителей антигенов – вирусных частиц, бактериальных клеток – в частицы, способные защитить их от деградации в тканях организма реципиента, доставить к иммунокомпетентным клеткам и создать депо антигена в организме. Для получения таких вакцин используются биodeградируемые носители (микрокапсулы, микро- и наносферы, микро- и наночастицы) с различной заданной скоростью распада под действием ферментативных систем органов и тканей. В зависимости от назначения микро(нано-)капсулированного вакцинного препарата и вида антигенов размер носителя может варьировать от десятков нанометров до десятков и сотен микрометров. Известны и активно используются носители из гидрофобных (полилактид, полилактид-когликолид, липиды и др.) и гидрофильных (полисахариды, белки, кремнеземы и др.) материалов. Их общим свойством является

нетоксичность для макроорганизма как самих этих веществ, так и продуктов их распада. Например, полилактид-когликолид распадается в организме на молочную и гликолевую кислоты, участвующие в нормальном метаболизме, а липиды из оболочек липосом способны включаться в мембраны клеток макроорганизма.

Важным свойством микрокапсулированных вакцинных препаратов является их адаптация под конкретный способ введения, который может быть любым (парентерально, орально, интраназально и пр.). Также препарат может быть нацелен на конкретный орган (кишечник, селезенка, лимфоузлы и т.п.).

В экспериментальных условиях испытано несколько десятков таких вакцин. С помощью микросфер можно проводить комплексную вакцинацию против нескольких инфекций одновременно: каждая капсула может содержать несколько антигенов, а для иммунизации можно брать смесь различных микрокапсул. Таким образом, микрокапсулирование позволяет значительно сократить количество инъекций при вакцинации. Кроме того, сами микрокапсулы обладают выраженным адъювантным действием по причине как их корпускулярной природы, имитирующей естественные патогены, так и специфического химического строения. Это позволяет уменьшить дозы вводимых антигенов.

При реализации алгоритма разработки кандидатной вакцины в рамках технологической платформы «Субъединичные белковые вакцины», предварительные этапы разработок связаны с:

- созданием коллекции штаммов-продуцентов и плазмид для клонирования и экспрессии генов рекомбинантных белков;
- отработкой технологии клонирования экспрессии, выделения и очистки рекомбинантных белков;
- выбором технологии микро(нано-)капсулирования для создания конкретного вакцинного препарата.

Этапы непосредственной разработки:

- полногеномное секвенирование нового возбудителя, поиск открытых рамок считывания, аннотация генома, определение таксономической принадлежности нового возбудителя;
- определение методами обратной вакцинологии предположительных протективных антигенов, факторов патогенности и аллергенов данного возбудителя;
- выбор перспективных кандидатов для клонирования;
- расчет и синтез праймеров для клонирования генов выбранных белков;
- клонирование генов выбранных белков в экспрессирующие векторы;
- наработка рекомбинантных белков;
- иммунизация мышей рекомбинантными белками;
- получение иммунных сывороток;
- оценка иммуногенности белков методами ИФА, Вестерн-блота, проточной цитофлуориметрии;
- исследования *in vitro* и *in vivo*;
- идентификация антигенов;
- наработка препаративных количеств антигенов;
- подбор адъювантов, криопротекторов, стабилизаторов.

В заключение следует отметить, что несмотря на бурное развитие молекулярно-биологических методов, генно-инженерных подходов, методов иммунохимического анализа, создание эффективных вакцин против бактериальных патогенов является сложной задачей, решение которой для каждой нозологической формы инфекционного заболевания связано с глубокими фундаментальными исследованиями процессов иммунопатогенеза при взаимодействии «патоген–хозяин» и оптимальным выбором технологической платформы для разработки средств специфической профилактики или сочетания различных платформ.

Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора, академик РАН
И.А.Дятлов