

АННОТАЦИЯ
диссертационной работы
Орынбасар Мадияна Болатжанқызы
на тему «Субъединичная вакцина против COVID-19 для домашних
кошек: получение и изучение иммунобиологических свойств»
представленной на соискание степени доктора философии (PhD)
образовательной программе 8D09101 – «Ветеринарная медицина»

Актуальность темы исследования. В условиях пандемии COVID-19 трансмиссия вируса SARS-CoV-2 от человека к животному, от животного к животному и обратная передача находится в центре внимания научного сообщества. Особое эпидемиологическое значение имеют домашние кошки, поскольку они находятся в тесном контакте с человеком и проявляют высокую восприимчивость к вирусной инфекции. Вирус SARS-CoV-2 впервые был идентифицирован в конце 2019 года и в короткие сроки приобрёл статус глобальной пандемии. Первоначально предполагалось, что вирус циркулирует исключительно среди людей, однако последующие исследования доказали его зоонозную природу и подтвердили возможность передачи от человека животным. Среди домашних животных кошки являются одними из наиболее восприимчивых к SARS-CoV-2. Они не только заражаются вирусом, но и способны передавать его другим кошкам. Инфекция у кошек в большинстве случаев протекает бессимптомно или в лёгкой форме; в редких случаях наблюдаются респираторные нарушения, снижение аппетита и слабость. Однако бессимптомное носительство представляет собой особую эпидемиологическую опасность, поскольку способствует скрытому распространению инфекции. Согласно международным данным, репродуктивное число (R_0) у кошек превышает 3, а способность длительно выделять вирус может превращать их в естественный резервуар возбудителя. На территориях Азии, Европы и Америки официально зарегистрированы случаи естественного заражения SARS-CoV-2 представителей семейства кошачьих. В этой связи в рамках концепции «Единое здоровье» (One Health) вакцинация домашних кошек рассматривается как неотъемлемая часть комплексных мер противодействия пандемии. Значимость данного подхода подтверждается крупными эпидемиологическими исследованиями международного уровня. Так, в Чили в 2020–2024 годах при анализе сыворотки крови 1377 кошек было установлено, что иммунный ответ у них сохраняется до 15 месяцев. Исследование, проведённое в китайском городе Ухань, убедительно доказало возможность передачи SARS-CoV-2 от человека домашним кошкам. В ходе исследования были протестированы сыворотки крови 102 кошек. В результате у 15 животных (14,7%) были обнаружены антитела к SARS-CoV-2, причём у 11 из них подтверждено наличие вируснейтрализующих антител. Данные показатели свидетельствуют о том, что кошки действительно контактировали с вирусом, а их иммунная система сформировала соответствующий ответ.

Таким образом, разработка безопасной и эффективной вакцины для защиты домашних кошек от SARS-CoV-2 является актуальной задачей ветеринарной медицины и общественного здравоохранения. В решении данной задачи особое место занимают субъединичные вакцины. Субъединичные вакцины представляют собой тип вакцин, основанный на введении отдельных белков вируса (как правило, S-белка), полученных с помощью рекомбинантной технологии, в сочетании с адъювантом. По сравнению с другими типами вакцин они обладают рядом преимуществ: высокой безопасностью, безопасностью для животных с ослабленной иммунной системой, возможностью повторного введения, простыми условиями хранения и транспортировки. Однако иммуногенность субъединичных вакцин может быть низкой, что обусловлено слабой стимуляцией иммунной системы очищенными белками. Поэтому в повышении иммуногенности вакцины важную роль играют адъюванты.

Цель диссертационного исследования. Разработка и исследование иммунобиологических свойств субъединичной вакцины против COVID-19 для домашних кошек, характеризующейся безопасностью, иммуногенностью и эффективностью.

Задачи исследования:

1. Разработка дизайна вакцины и лабораторный контроль качества пилотной серии;
2. Сравнительная оценка иммуногенной и протективной эффективности различных формуляций вакцины у кошек и определение оптимального состава;
3. Оценка напряжённости и длительности поствакцинального иммунитета у кошек.

Методы исследования. Экспериментальные исследования проводились на базе лабораторий BSL-3 и ABSL-3 Национального научного центра особо опасных инфекций имени М.Айкимбаева и в Международном центре вакцинологии при КазНАИУ. Имеется разрешение Институционального комитета по содержанию и использованию лабораторных животных на проведение исследований по предложенному проекту (протокол № 4 от 22.09.2020 г.).

В работе был применён комплекс методов определения уровня анти-Spike IgG методом ELISA. Среди всех аналитических методов особое место занимает иммунологический анализ, основанный на использовании ферментов в качестве метки для выявления антигена или антитела. Возможность применения ферментов в качестве метки в иммунном анализе обусловлена высокой каталитической активностью ферментов; с помощью соответствующей субстратной системы это позволяет определять концентрацию фермента в растворе на уровне 10^{-15} М.

Все полученные количественные данные были обработаны в программе GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Титры антител рассчитывались как геометрические средние значения (GMT).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Обоснование риска распространения SARS-CoV-2 среди домашних кошек и формирования вирусного резервуара, что подтверждает необходимость вакцинации кошек как неотъемлемого компонента стратегии «Единое здоровье» в условиях пандемии COVID-19;

2. Разработка дизайна субъединичной вакцины против COVID-19 для домашних кошек и лабораторный контроль качества пилотной серии, обеспечивающие безопасность, иммуногенность и протективную эффективность препарата;

3. Результаты сравнительного исследования иммуногенной и протективной эффективности различных формуляций вакцины на кошках, проведённого впервые для субъединичной вакцины, предназначенной для домашних кошек.

Описание основных результатов исследования. В ходе проведённой исследовательской работы были комплексно изучены иммунобиологические свойства субъединичной вакцины против COVID-19 для домашних кошек и получены следующие основные результаты:

1. Разработана технология получения рекомбинантного антигена на основе внеклеточного домена S-белка вируса SARS-CoV-2. Внеклеточный домен S-белка был получен с использованием клеток *Trichoplusia ni* в бакуловирусной экспрессионной системе и очищен методом аффинной хроматографии. Соответствие полученного рекомбинантного белка было подтверждено методами электрофореза, вестерн-блота и масс-спектрометрического анализа. Степень чистоты белка превысила 90%. Сохранение способности рекомбинантного антигена связываться с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 подтвердило его биологическую активность.

2. Разработаны экспериментальные формуляции субъединичной вакцины против инфекции SARS-CoV-2, предназначенной для домашних кошек, и определены их основные показатели качества. В состав вакцинных образцов были включены 5 мкг внеклеточного домена рекомбинантного S-белка и эмульсионный адъювант типа «масло-в-воде» ESSAI O/W 1849102 либо адъювант на основе алюминия гидроксида Alhydrogel® 2%. Стерильность готовых вакцинных образцов была подтверждена. Содержание эндотоксина составило менее 2 эндотоксиновых единиц/мл, а содержание остаточной ДНК — менее 50 нг/мл.

3. Иммуногенная активность вакцины. Было установлено выраженное влияние адъювантов на иммуногенную активность вакцины и выбрана оптимальная формуляция. После двукратного внутримышечного введения вакцины с интервалом 14 дней в формуляции с адъювантом ESSAI O/W 1849102 геометрический средний титр антител класса иммуноглобулина G против S-белка составил 97 420. Данный показатель оказался приблизительно в 2 раза выше по сравнению с формуляцией с адъювантом Alhydrogel® 2%, и приблизительно в 7 раз выше по сравнению с группой антигена без адъюванта. Геометрический средний титр нейтрализующих антител против варианта

D614G составил 945 в формуляции ESSAI O/W 1849102, 450 — в группе Alhydrogel® 2%, и 220 — в группе антигена без адъюванта. Против варианта Delta у всех кошек, получивших вакцину с адъювантом ESSAI O/W 1849102, были выявлены нейтрализующие антитела, геометрический средний титр которых составил 315. В группе Alhydrogel® 2% данный показатель составил 150, а в группе антигена без адъюванта — 106. На основании полученных результатов в качестве оптимальной экспериментальной формуляции вакцины NARUVAX-C19 (pets) по иммуногенным показателям была выбрана композиция на основе 5 мкг внеклеточного домена S-белка и эмульсионного адъюванта типа «масло-в-воде» ESSAI O/W 1849102.

4. Протективная эффективность. В эксперименте с контролируемым заражением была установлена протективная эффективность адъювантных субъединичных вакцин, а также их безопасность для домашних кошек. После интраназального заражения вирусом SARS-CoV-2 из лёгочной и сердечной тканей вакцинных групп с адъювантами ESSAI O/W 1849102 и Alhydrogel® 2% инфекционный вирус выделен не был. В формуляции с адъювантом ESSAI O/W 1849102 был выявлен наиболее низкий уровень вирусной нагрузки в исследованных тканях. Данная формуляция характеризовалась эффективным ограничением репликации вируса в тканях нижних дыхательных путей и сердца. После вакцинации клинически значимых нежелательных реакций не наблюдалось.

5. В результате проведённых исследований была сформирована научно-практическая основа для разработки формуляции рекомбинантной субъединичной вакцины, предназначенной для специфической профилактики инфекции SARS-CoV-2 у домашних кошек. Результаты исследования продемонстрировали высокие иммуногенные свойства кандидатной вакцины NARUVAX-C19 (pets), созданной на основе 5 мкг внеклеточного домена S-белка и эмульсионного адъюванта типа «масло-в-воде» ESSAI O/W 1849102, её способность формировать нейтрализующий иммунный ответ против исходного и Delta вариантов вируса SARS-CoV-2, а также протективное действие в экспериментальных условиях. Полученные результаты служат основой для дальнейшего изучения продолжительности иммунной защиты вакцины, долгосрочной безопасности, влияния на передачу вируса и возможности получения в промышленных масштабах. Способ получения вакцины защищён патентом Республики Казахстан №35485.

Обоснование новизны и важности полученных результатов.

Впервые разработана субъединичная вакцина против COVID-19 для домашних кошек. Создана технология получения субъединичной вакцины против SARS-CoV-2, предназначенной для домашних кошек. Впервые получены данные об иммуногенности и протективной эффективности различных формуляций вакцины на кошках. Проведена сравнительная оценка иммуногенности и протективной эффективности различных адъювантных формуляций субъединичной вакцины у домашних кошек. В результате исследования определён оптимальный тип адъюванта для кошек и охарактеризованы механизмы усиления иммунного ответа.

Получен патент на изобретение № 35485, 04.02.2022. «Способ получения субъединичной адъювантной вакцины для специфической профилактики SARS-CoV-2-инфекции у плотоядных и других восприимчивых животных». РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» Министерства юстиции Республики Казахстан.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам. Диссертационная работа выполнена в рамках научного проекта «Новая платформа интраназальной вакцины против SARS-CoV-2 на основе наночастиц: разработка и испытание на лабораторных моделях животных». "Профинансировано Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP09259609)."

Связь между целью проекта и содержанием диссертации заключается в следующем: в рамках проекта разрабатывалась платформа интраназальной вакцины на основе наночастиц, тогда как в диссертации изучались иммунобиологические свойства субъединичной вакцины – таким образом, оба направления взаимодополняют друг друга, что позволило провести комплексное исследование вакцинного иммунитета. Исследования в рамках проекта проводились на базе лабораторий BSL-3 и ABSL-3 Национального научного центра особо опасных инфекций имени М. Айкимбаева МРК, с соблюдением требований высокого уровня биологической безопасности. Результаты проекта послужили основой для оценки протективной эффективности вакцины в диссертационной работе.

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации.

Докторант принимал непосредственное участие на всех этапах диссертационного исследования, включая формирование научной концепции, планирование и проведение лабораторных экспериментов, сбор и анализ данных, статистическую обработку результатов, интерпретацию полученных данных, а также подготовку и оформление научных публикаций. Докторант освоил инструкции по технике безопасности при работе в лабораториях BSL-3 и ABSL-3 и получил соответствующие сертификаты. В ходе исследования докторант провёл всесторонний обзор международной научной литературы и составил библиографический список, состоящий из 114 наименований.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

- 1 статья в международном журнале *Frontiers in Veterinary Science* (Q1), индексируемом в базах данных Scopus и Web of Science;
- получен патент на изобретение № 35485 «Способ получения субъединичной адъювантной вакцины для специфической профилактики SARS-CoV-2-инфекции у плотоядных и других восприимчивых животных».

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из 109 страницы и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключение, список использованной литературы и 5 приложений. В работе представлены 14 таблиц и 10 рисунков. Список использованной литературы содержит 114 наименований.