

Диагностические тесты и рекомбинантные вакцины для профилактики вирусных инфекций, в том числе новой коронавирусной инфекции COVID-19 (SARS-CoV-2)

Смирнов Иван Витальевич,
д.х.н., профессор кафедры химии природных соединений
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
заместитель директора по науке Института биоорганической
химии РАН (ИБХ РАН)

Основные способы диагностики COVID-19:

1. ПЦР-тест

- точность теста
- + чувствительность
- + возможность определять вирус на ранних стадиях заражения

2. Иммуноферментный анализ:

- чувствительность
- + определение иммунного ответа, даже при бессимптомном протекании заболевания

2.1 Экспресс-тест полоски

2.2 Лабораторный ИФА анализ на «ранние» антитела IgM

2.3 Лабораторный ИФА анализ на «поздние» антитела IgG

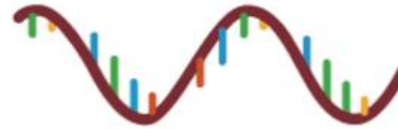
Основные способы диагностики COVID-19.

ПЦР-тест

Отбор образца



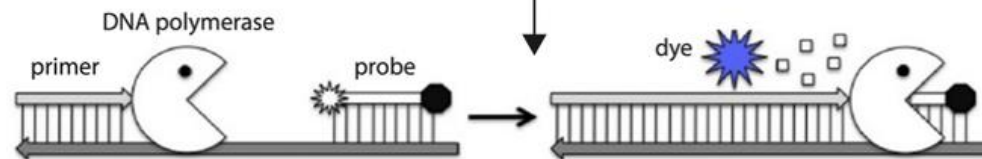
Выделение РНК



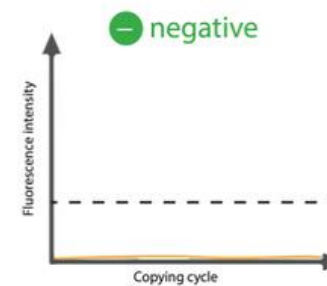
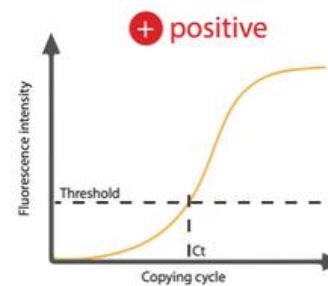
Проведение реакции
обратной транскрипции



ПЦР в реальном времени

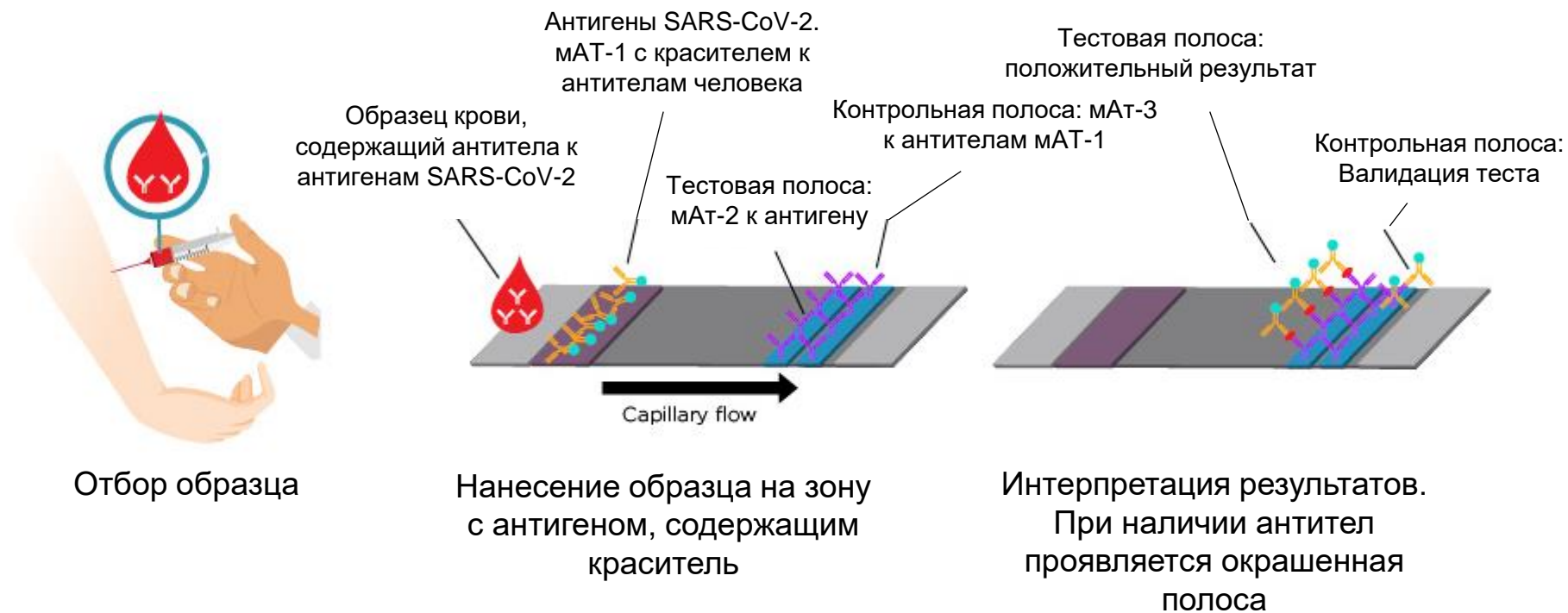


Интерпретация результатов



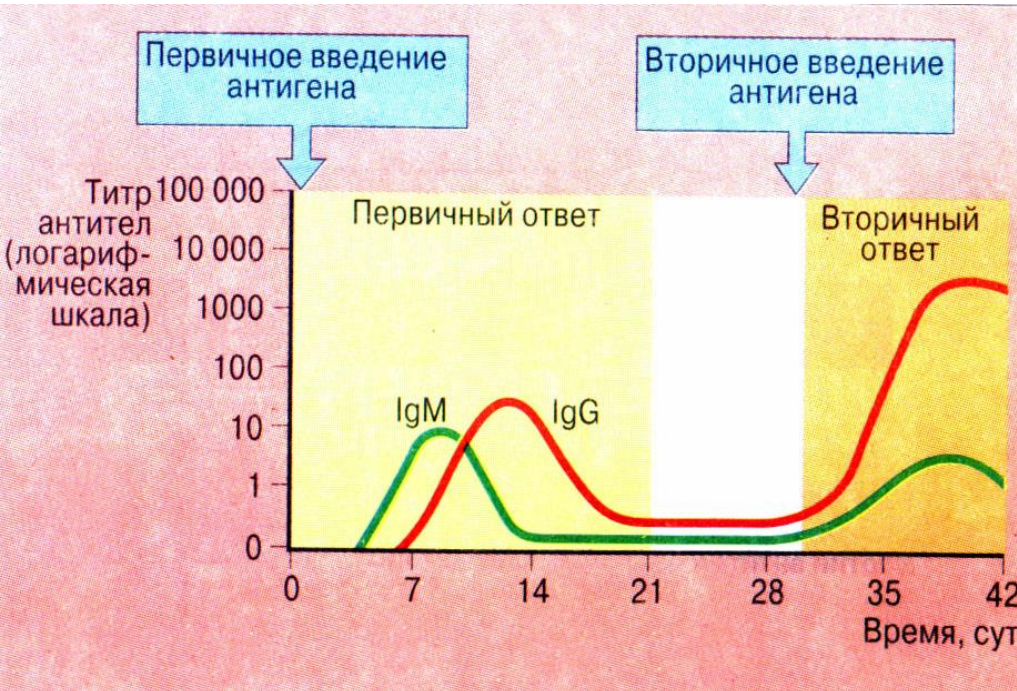
Основные способы диагностики COVID-19.

ИФА - экспресс-тест полоски



Основные способы диагностики COVID-19.

ИФА - на «ранние» антитела IgM и «поздние» антитела IgG



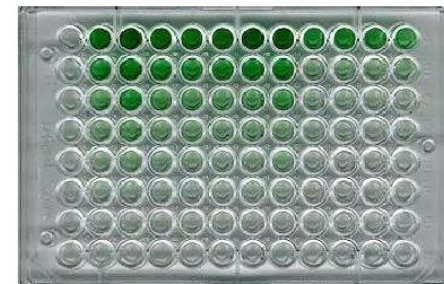
1. Нанесение вирусного антигена (S-белок, RBD, N-белок)



2. Нанесение образца сыворотки. Связывание специфичных к вирусу антител.

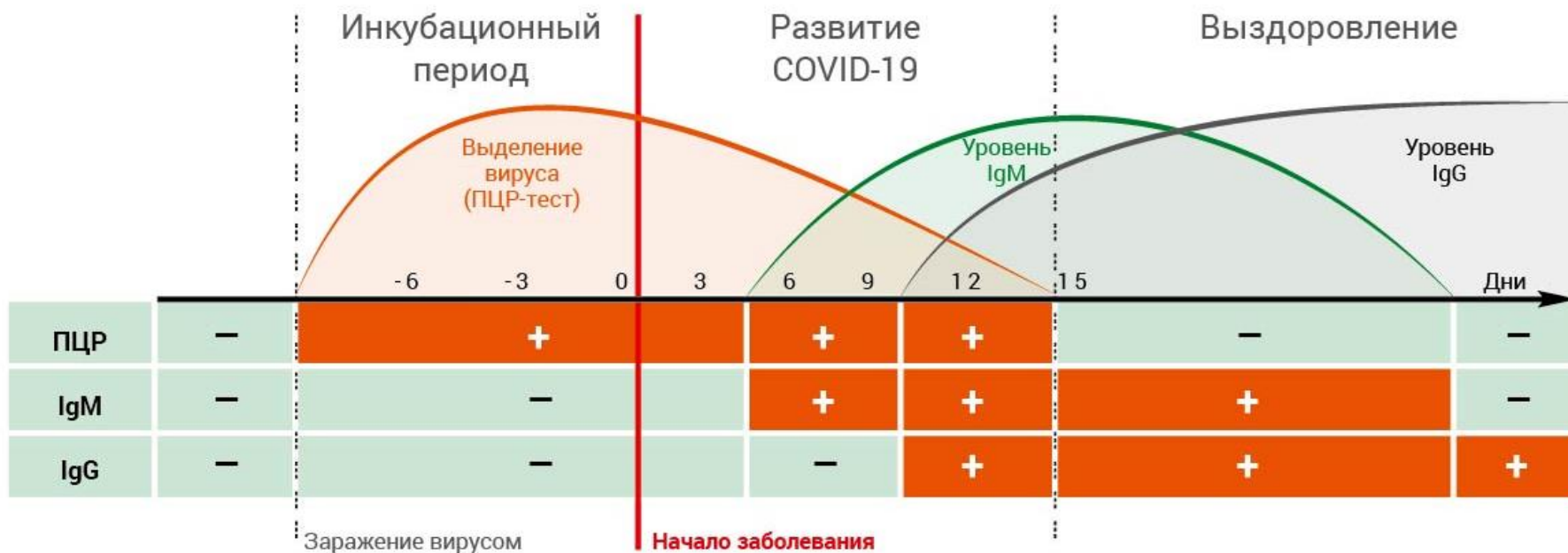


3. Детекция, связавшихся антител.



Три необходимых исследования для диагностики COVID-19

- Качественный ПЦР-тест на РНК вируса (мазок из зева)
- Полуколичественный ИФА-тест на антитела IgM (венозная кровь)
- Полуколичественный ИФА-тест на антитела IgG (венозная кровь)



Выделение вируса происходит даже при бессимптомном течении коронавирусной инфекции.

Аттенуированные:

чума,
сибирская язва,
полиомиелит и др.

Инактивированные:

коклюш,
холера,
клещевой энцефалит и др.

Иммуногены из
разрушенного
патогенного
организма: грипп

СУЩЕСТВУЮЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ВАКЦИНЫ

Субъединичные

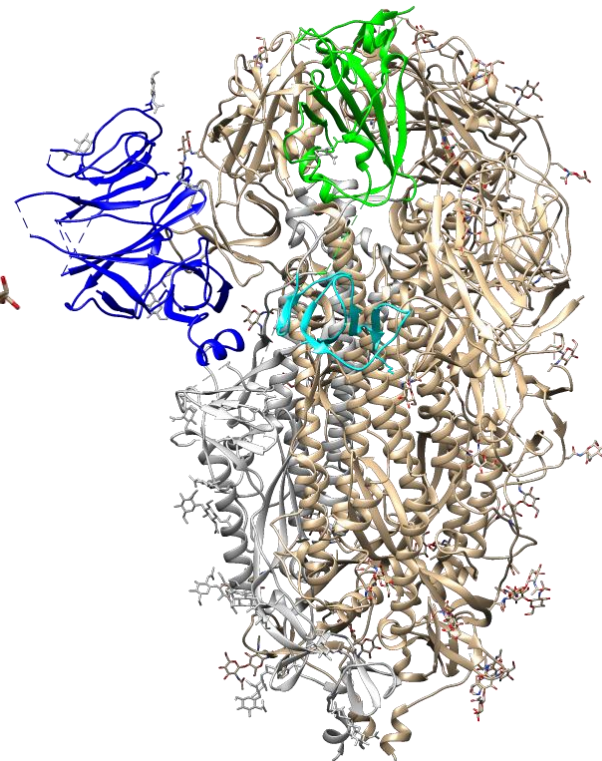
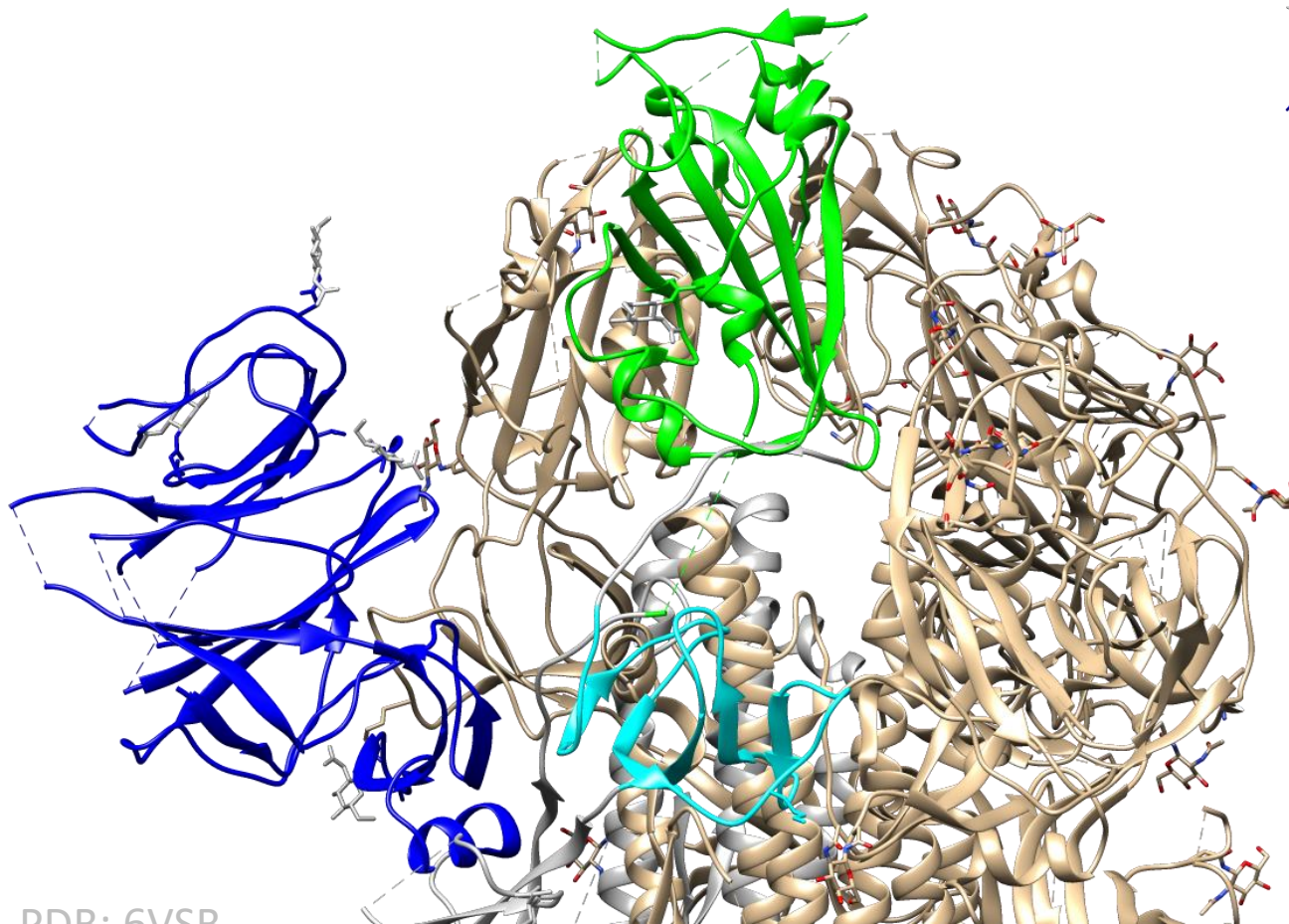
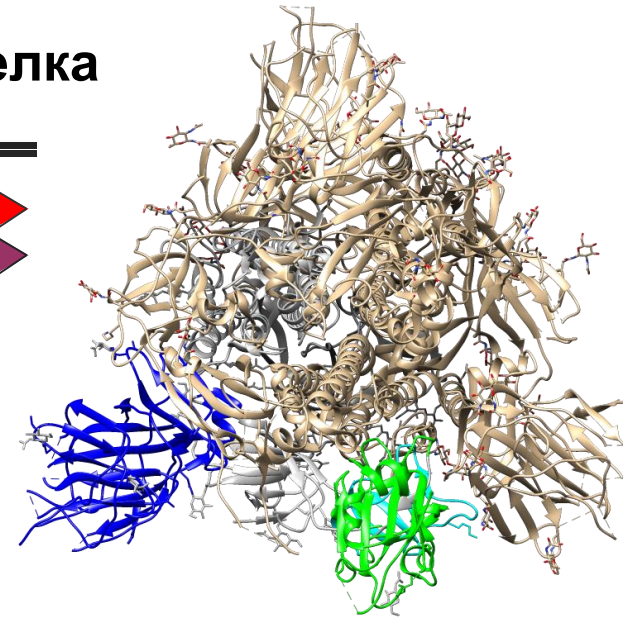
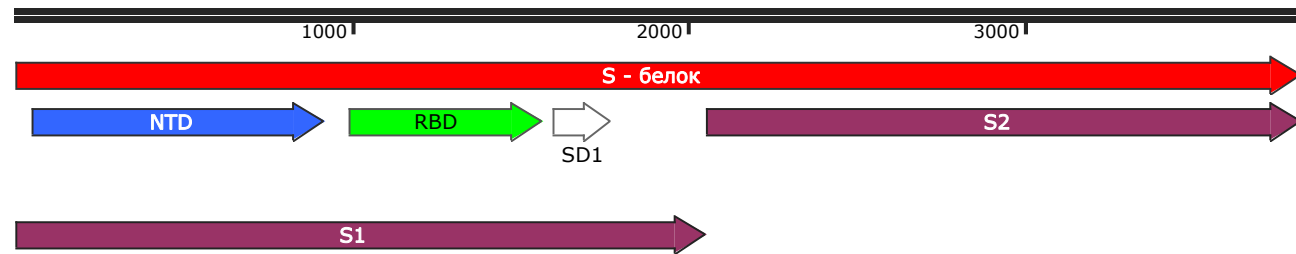
состоят из одного или нескольких
очищенных поверхностных
иммуногенных белков патогенного
организма

Рекомбинантные вакцины

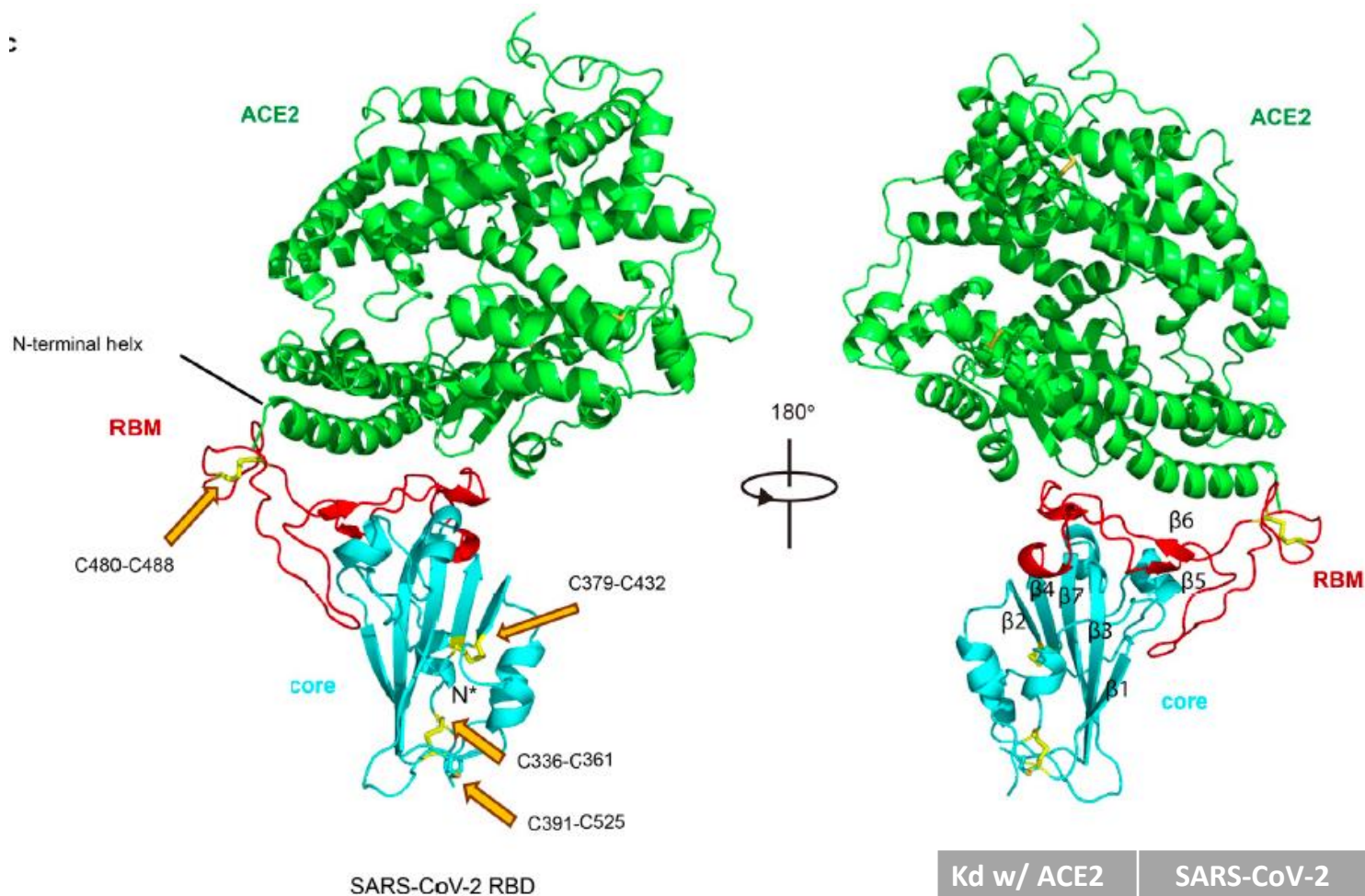
- Пептидные синтетические вакцины
- Комбинированные ДНК-вакцины (Zika)
- РНК-вакцины (в разработке (Moderna, и др.))
- Вакцины на основе вирусных векторов (Ervebo (EBOLA))
- Вакцины на основе вирусоподобных частиц (ВПЧ) (HPV, Gardasil, Crevix)

Иммуногены
синтезированы
методами генной
инженерии:
гепатит В

Доменная организация S-белка



Структура комплекса RBD S-белка – ACE2 человека



Kd w/ ACE2	SARS-CoV-2	SARS
[1]	~1 nM	~5 nM
[2]	~5 nM	~30 nM
[3]	~15 nM	~325 nM

Кандидатные рекомбинантные вакцины, тестируемые в настоящее время для SARS-CoV и MERS-CoV

Основа вакцины	Иммуноген	Стадия испытаний	Преимущества
Комбинированные ДНК-вакцины	Полноразмерный Spike или его фрагмент	Фаза I, II (NCT03721718)	Индукция как В-, так и Т-клеточного ответа
Вирусные вектора на основе аденовируса	Полноразмерный Spike или его фрагмент	Фаза I (NCT03399578, NCT03615911)	Сильный иммунный ответ
Субъединичные вакцины	Полноразмерный Spike или его фрагмент (RDB)+адъювант	Доклинические испытания	Индуктирует в основном гуморальный иммунный ответ
Вакцины на основе вирусоподобных частиц	Фрагменты Spike-белка, М и Е белков	Доклинические испытания	Структурированное, мультимерное природоподобное расположение антигена

Субъединичные вакцины

Иммуноген	Полноразмерный S-белок или его фрагменты (S1, NTD или RBD)
Обязательные дополнительные компоненты	адъюванты (компонент, стимулирующий иммунный ответ на антиген)
Способ введения в организм	инъекция (подкожная, внутримышечная)
Иммунный ответ	в основном гуморальный (В-клеточный), антитела против вирусной частицы

Адъюванты включают в себя (но не ограничиваются):

- минеральные соли (гидроксид алюминия, гель фосфата алюминия или кальция);
- масляные эмульсии и составы на основе сурфактантов;
- генетически модифицированные бактериальные токсины для обеспечения нетоксигенного адъювантного эффекта;
- эндогенные иммуномодуляторы человека (hGM-CSF, интерлейкин-12);
- **константный домен иммуноглобулина человека**

ДНК-вакцины

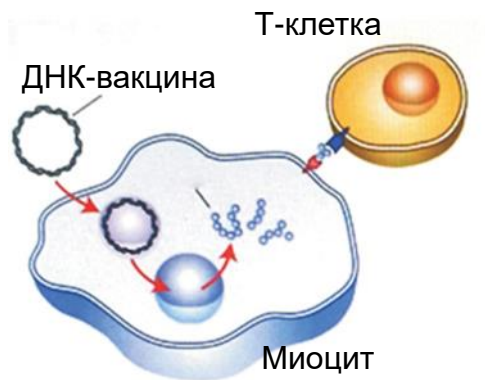
Иммуноген	Генетическая конструкция, содержащая гены, кодирующие S-белок или его фрагменты
Дополнительные компоненты	<ul style="list-style-type: none">• Вирусные частицы (аденовирусы, поксивирусы)• Липосомы• Полимерные носители (поликатионы)
Способ введения в организм	инъекция (подкожная, внутримышечная)
Иммунный ответ	Гуморальный и клеточный, антитела против вирусной частицы, цитотоксические лимфоциты против инфицированных клеток

ДНК-вакцины

Иммунный ответ

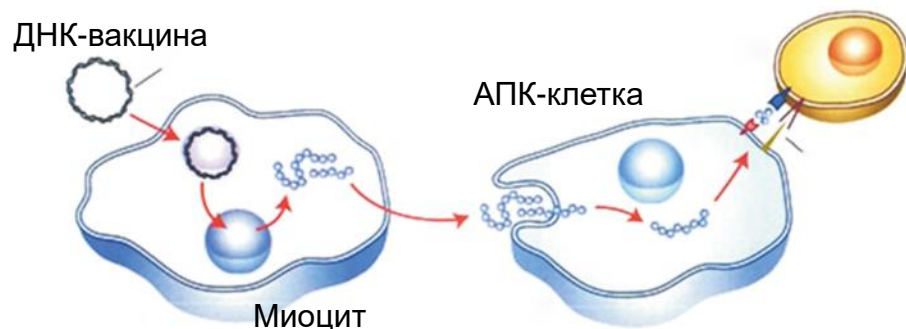
Синтезированный в клетке антиген расщепляется на иммуногенные пептиды и представляется на молекулах главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) иммунокомпетентным клеткам.

Путь 1



Путь 1. Эндогенные белки-антигены направляются на деградацию в протеасому, после чего представляются в комплексе с ГКГ-I на поверхности клетки. Здесь при встрече их распознают CD8+ Т-клетки (Т-киллеры), которые реализуют цитотоксический иммунный ответ.

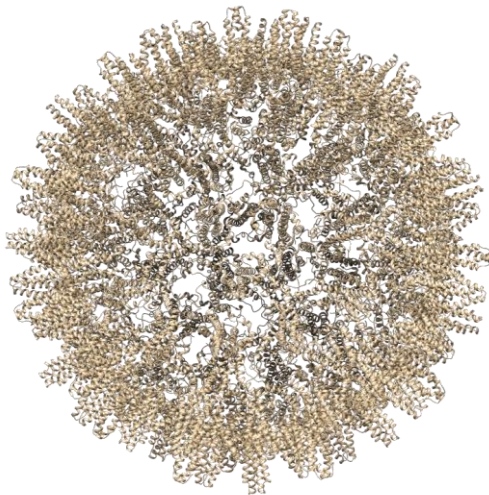
Путь 2



Путь 2. Экзогенные белки расщепляются лизосомными протеазами и, включаются в состав ГКГ-II и распознаются рецепторами CD4+ Т-клеток (Т-хелперов). Последние вызывают как клеточный, так и гуморальный ответ.

Вакцины на основе вирусоподобных частиц

Иммуноген	Полноразмерный S-белок или его фрагменты + генетическая конструкция, их кодирующая
Дополнительные компоненты	не требуются
Способ введения в организм	инъекция (подкожная, внутримышечная)
Иммунный ответ	Гуморальный и клеточный, антитела против вирусной частицы, цитотоксические лимфоциты против инфицированных клеток



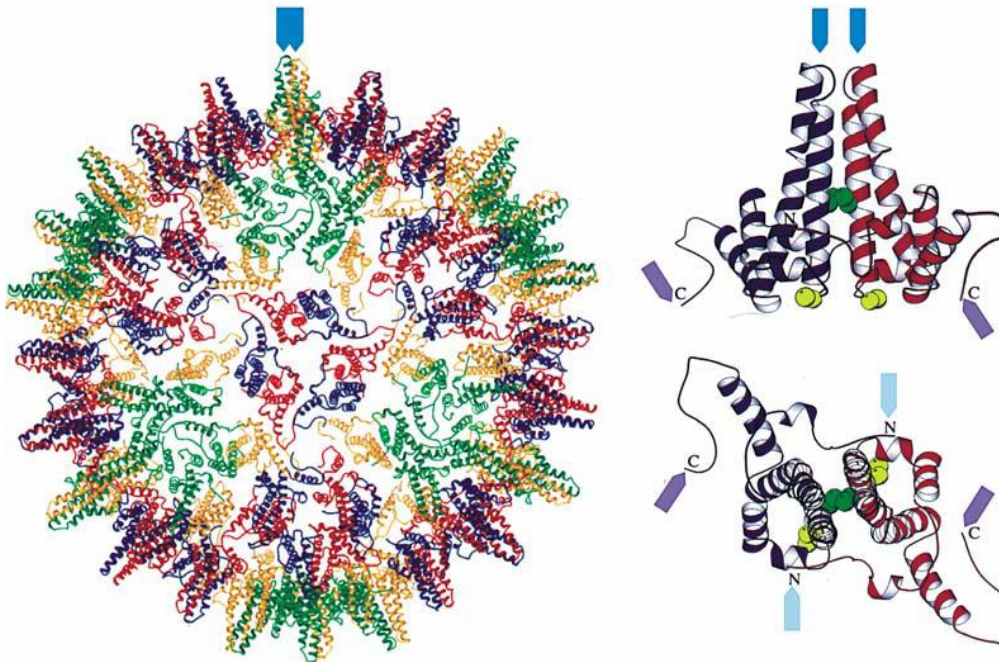
Достоинства:

- Безопасность
- Природоподобность
- Высокая иммуногенность (240-субъединиц, несущих антиген)
- Наличие пространственной структуры
 $D \sim 40$ нм (оптимальный размер антигена для АПК)

Недостатки:

- Сложность подбора оптимальных условий сборки частиц

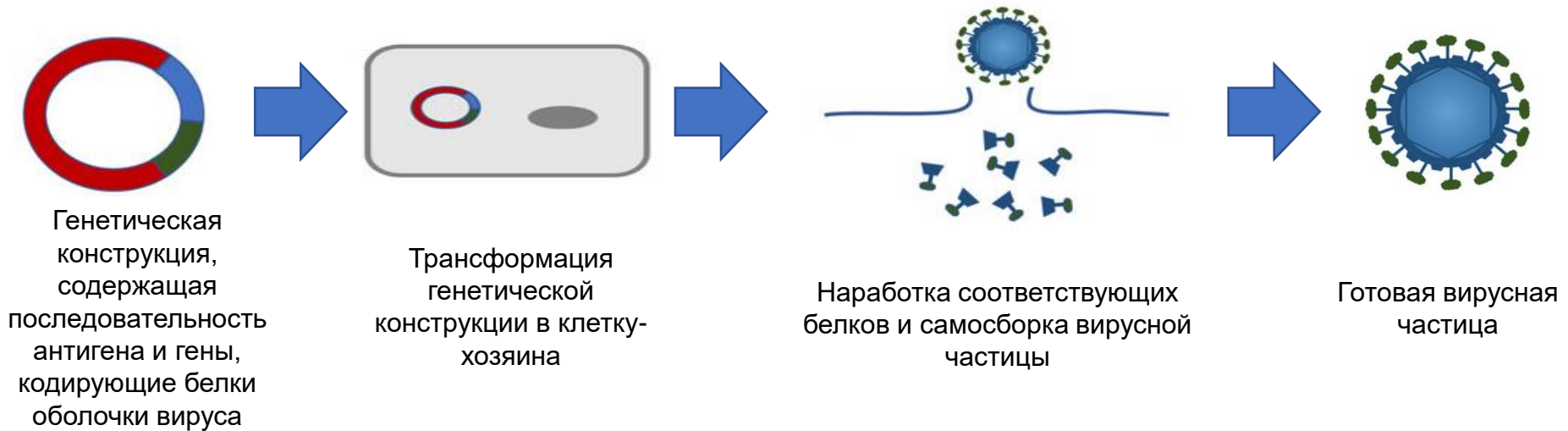
Вакцины на основе вирусоподобных частиц



Пример вирусоподобной частицы как носителя чужеродных эпитопов.

Собственные поверхностные антигенные детерминанты (помечены стрелкой) заменяются на необходимые последовательности (до 250 а.о.)

Вакцины на основе вирусоподобных частиц



Существующие вакцины на основе VLP:

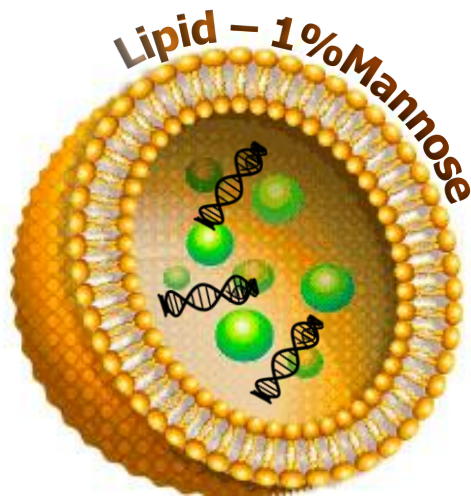
- Gardasil, Gardasil 9
- Cerverix

Использование этой технологии компаниями, разрабатывающими вакцину от COVID-19 в других странах:

США: 1
Китай: 2
Канада: 1
Дания: 1

Комбинированные ДНК-белковые вакцины

Иммуноген	Полноразмерный S-белок или его фрагменты + генетическая конструкция, их кодирующая
Дополнительные компоненты	Входят, как обязательная составляющая часть вакцины <ul style="list-style-type: none">• Липосомы• Полимерные носители (поликатионы)
Способ введения в организм	инъекция (подкожная, внутримышечная)
Иммунный ответ	Гуморальный и клеточный, антитела против вирусной частицы, цитотоксические лимфоциты против инфицированных клеток



Достоинства:

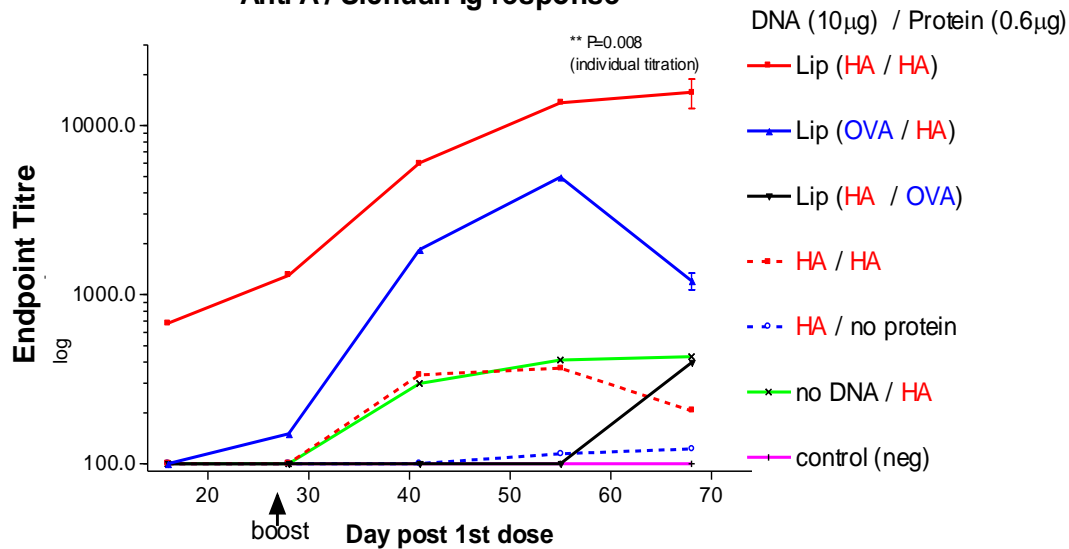
- SUV липосомы 50-90 нм мимикрируют вирусные частицы
- Взаимодействуют с АПК
- Индуцируют двойной В- и Т-клеточный иммунный ответ

Недостатки:

- требуют специальной подготовки перед инъекцией

Сравнение иммунного ответа при использовании различных типов ДНК-белковых вакцин (на примере вакцины против гриппа)

Anti A / Sichuan Ig response



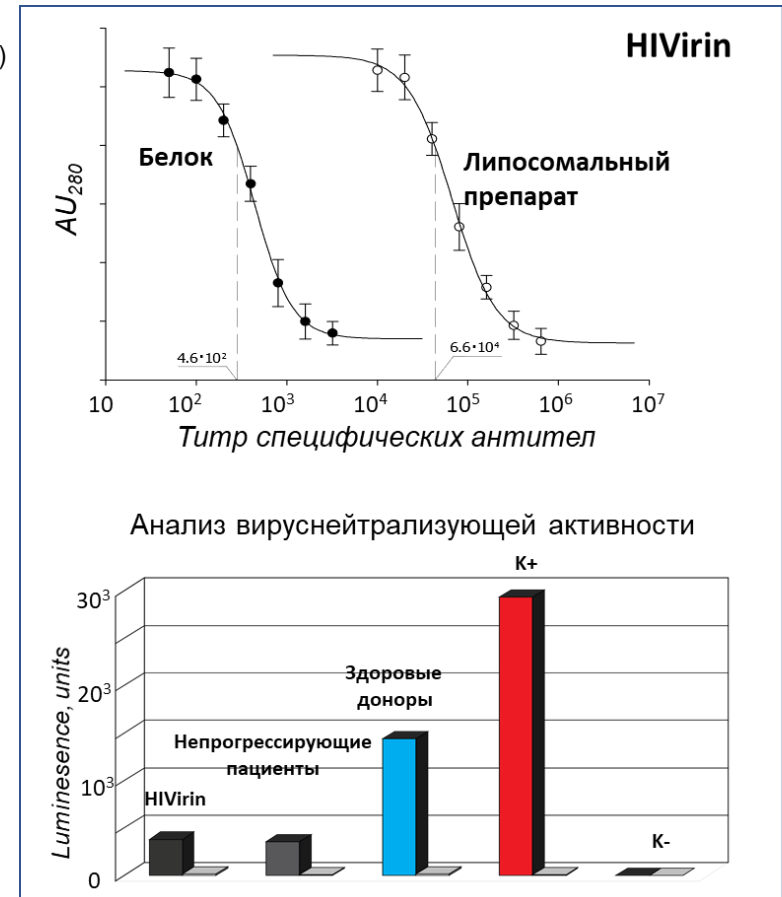
Использование комбинированного препарата, содержащего ДНК и белковую компоненты в составе липосом, дает наибольший титр специфических антител

В разработке от COVID-19 в мире:

США: 1

Индия: 1

Италия: 1



Смирнов И.В. и др. Патент RU 2600031

Durova OM, Vorobiev II, Smirnov IV, et. al. Mol Immunol. 2009