



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

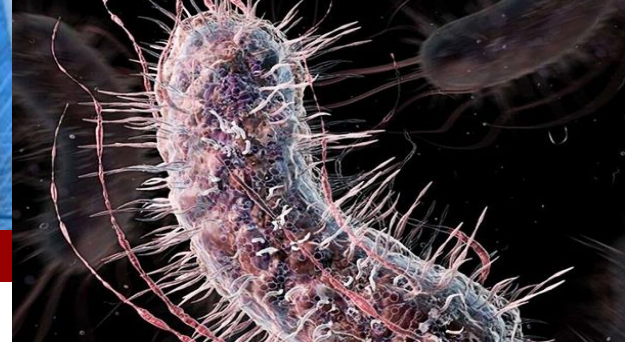
СОСТОЯНИЕ РАЗРАБОТКИ И ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОПАСНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ



И.А.Дятлов

Эпидситуация по ООИ бактериальной этиологии

Передовые технологии – защита Вашего здоровья



- ❖ **Чума** – 2014, 2015, 2016 годы по одному случаю заболеваний человека в Горном Алтае, всего в России 11 природных очагов включая трансграничные со странами Средней Азии, Монголией и Китаем, в 2017 г. – массовая вспышка на Мадагаскаре
- ❖ **Сибирская язва** от 10 до 25 случаев в год, массовый падеж оленей в Ямало-Ненецком АО и заболевания людей
- ❖ **Туляремия** – природные очаги, 2013 год вспышка в Ханты-Мансийске – более 2500 заболевших
- ❖ **Бруцеллез** – более 400 случаев выявления заболеваний у людей в южных регионах европейской и азиатской части России в год.
- ❖ **Эшерихиозы** – вспышки со смертельными исходами штамм E.coli O104:H4 Грузия 2009, Германия 2011, ГУС – дети из Грузии 2018. Постоянное проявление штаммов O157:H7 и других серовариантов.

Возбудители данных болезней являются потенциальными элементами бактериологического оружия или инструментами биотерроризма

Используемые в России живые вакцины для ООИ по эпидпоказаниям

Передовые технологии – защита Вашего здоровья

Для данных особо опасных инфекционных заболеваний в качестве средств специфической профилактики применяются традиционные живые вакцины.

- ❖ Живая сухая чумная вакцина (штамм EV) – Минобороны, Ставропольский НИПЧИ
- ❖ Живая сибирязвенная вакцина (штамм СТИ-1) - Минобороны
- ❖ Живая туляремиальная вакцина (штамм НИИЭГ-15) - Микроген
- ❖ Живая бруцеллезная вакцина (штамм 19ВА) - Микроген

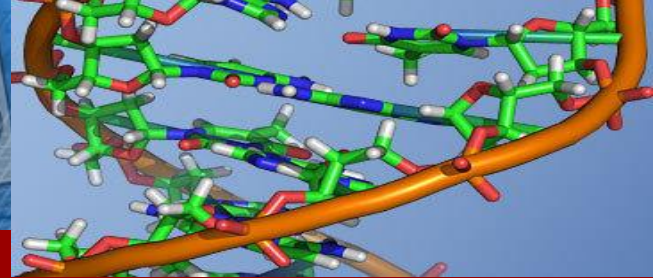


Разработки данных вакцин и технологий производства относятся к 50-м - 60-м годам прошлого века **Ни одна из этих вакцин не производится в условиях требований GMP**

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КИШЕЧНЫХ ООИ

- ХИМИЧЕСКАЯ ХОЛЕРНАЯ ВАКЦИНА (холероген-анатоксин+О антиген) выпускается по современным требованиям (Микроб), но нуждается в совершенствовании по линии внедрения рекомбинантных антигенов и снижения стоимости дозы
- Разработан прототип рекомбинантной вакцины против ШИГАТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ЭШЕРИХИОЗОВ на основе белков системы секреции третьего типа и анатоксина

Чумная вакцина



Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ Вакцина чумная живая сухая (*Vaccinum pestosum vivum siccum*) – на основе штамма чумного микроба EV линии НИИЭГ (Россия)
- ❖ В США выпускалась вакцина **USP** из вирулентного штамма 195/P убитого формальдигидом, против аэрогенного заражения не защищала.
- ❖ В военной лаборатории Defence Science and Technology Laboratory (**Портон Даун, Англия**) проведены две первые фазы клинических испытаний субъединичной вакцины из рекомбинантных антигенов *Y. pestis* – F1 и LcrV.
- ❖ US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (**Форт Детрик, США**) проводят испытания слитного белка F1-LcrV (F1-LcrV fusion protein)
- ❖ Российские субъединичные вакцины на основе: **F1** и **OCA**, **F1** и антигена **Б**
- ❖ Разработана химическая инкапсулированная вакцина на основе **F1** и **LcrV**, зарегистрирована и создано производство (ГНЦ ПМБ для нужд Минобороны)
- ❖ Индия из лаборатория D.N. Rao создан целый ряд химерных белков, содержащие только протективные B- и T-клеточные эпитопы F1 и LcrV.
- ❖ Попытки создать живые на основе: *Salmonella spp.*, *Lactococcus spp.*, аденовирусов, вирусов стоматита или оспы енота, *Y. Pseudotuberculosis* на основе прецизионной аттенуации по целому ряду генов - *relA* и *spoT*, *dam*, *yopH*, *smpB-ssrA*, *guaBA*

Вакцина ЧУМНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ МИКРОИНКАПСУЛИРОВАННАЯ

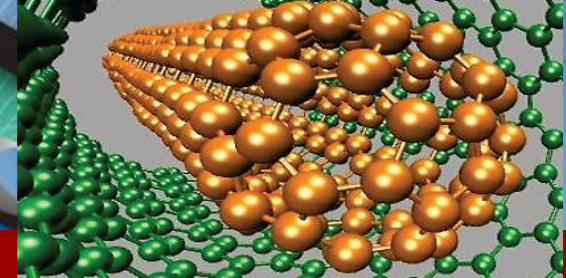
комплектация



Рекомбинантный F1 антиген,
уникальный рекомбинантный V-антиген
с измененным аминокислотным
составом и повышенной
иммуногенностью



Структура и свойства ВЧММ



Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ В одном флаконе содержит очищенные рекомбинантные антигены в количестве: F1-антиген 75-90 мкг и V-антиген 75-90 мкг.
- ❖ Предохраняет от гибели не менее 70 % белых мышей и морских свинок при заражении штаммом *Y. pestis* 231 дозой 10 - 30 LD₅₀.
- ❖ **Продуцент капсульного антигена** - Штамм *Yersinia pseudotuberculosis* EV11M/pFSK3/9 получен в ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск), активно продуцирует в среду F1.
- ❖ **Продуцент V-антигена** - Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pETV-I-3455 получен в ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) путем трансформации плазмидой pETV-I-3455.
- ❖ Клиническими исследованиями показана безопасность и хорошая общая переносимость вакцины,
- ❖ Продолжительность иммунитета у добровольцев - не менее 90 дней (срок наблюдения) у лабораторных животных до 180 суток после иммунизации.
- ❖ Отвечает всем требованиям ВОЗ к чумным вакцинам и после дополнительной проверки, может быть направлена на регистрацию и предквалификацию и станет доступным для закупок мировыми агентствами.

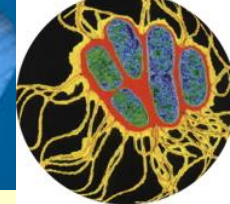
Туляреимийная вакцина



Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ Живые туляреимийные вакцины созданы на основе штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ – в России и *F. tularensis* LVS – за рубежом
- ❖ Один из ключевых белков системы рекомбинации у *F. tularensis* является белок RecA, делеция его приводит к подавлению гомологичной рекомбинации с сохранением ростовых свойств бактерий и их способности к размножению в макрофагах
- ❖ Полученные ГНЦ ПМБ, данные, позволили создать на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ новый кандидатный штамм, лишенный гена *recA*, одной копии гена *iglC* (позволяет проникать из фагосом в цитозоль макрофагов) и содержащего модифицированный ген *sodB* с пониженной трансляционной активностью
- ❖ В США и Швеции созданы также прототипы вакцинных штаммов на основе штаммов подвида *tularensis* в результате целенаправленного удаления ряда генов.
- ❖ В РосНИПЧИ «Микроб» получен поверхностный антигенный комплекс (8 белков+ О-антиген) один из белков – Bfr (бактериоферритин). Комплекс защищает от гибели 91,7% б/м от заражения штаммом 503. $ED_{50} = 2,5$ мкг.

Сибиряззенная вакцина



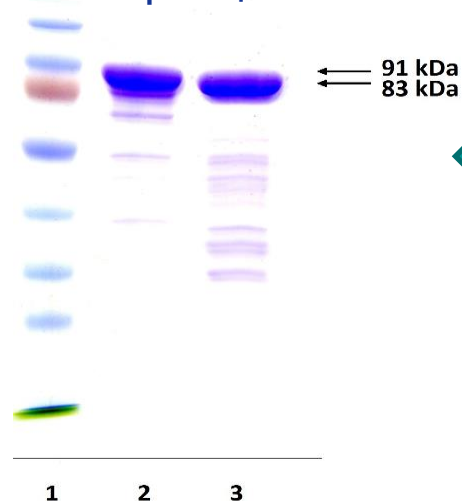
- ❖ В России используется вакцина СТИ-1, а также зарегистрирована вакцина СТИ-1 с добавлением протективного антигена.
- ❖ За рубежом живые вакцины не применяются из-за опасений остаточной вирулентности, а используют вакцину **AVP** (Anthrax Vaccine Precipitated -AVP) - преципитированный с соединениями алюминия бесклеточный фильтрат супернатанта бескапсульного штамма ***B. anthracis* (Sterne)** и сходную с ней вакцину **AVA** (Anthrax Vaccine Adsorbed), также известную как **Biothrax™**.
- ❖ В России разработаны прототипы вакцины на основе - рекомбинантного протективного антигена (**рПА**) и белка **EA1** из аспорогенного рекомбинантного продуцента (*B. anthracis* 55ΔТПА-1Spor⁻) и очищенные с использованием двухэтапной хроматографии (РосНИПЧИ «Микроб»).
- ❖ В период с 2001 по 2010 гг. объем вакцинации, по сравнению с 1991-2000 гг. сократился в 5,5 раз, ревакцинации – в 4,3 раза. В 2015 г. план иммунизации выполнен на 30 %, ревакцинации – на 42 %; только в 8 субъектах РФ - на 100 %. В некоторых регионах страны (ЯНАО) прививки людей против были отменены, там произошла в 2016 году массовая вспышка сибирской язвы у оленей и затем, у людей.
- ❖ **Сибиряззенный иммуноглобулин – проблемы применения – антитела к 3-му домену ПА усиливают действие летального токсина, нужны человеческие моноклоны**

Человеческие моноклональные антитела против летального токсина возбудителя сибирской язвы



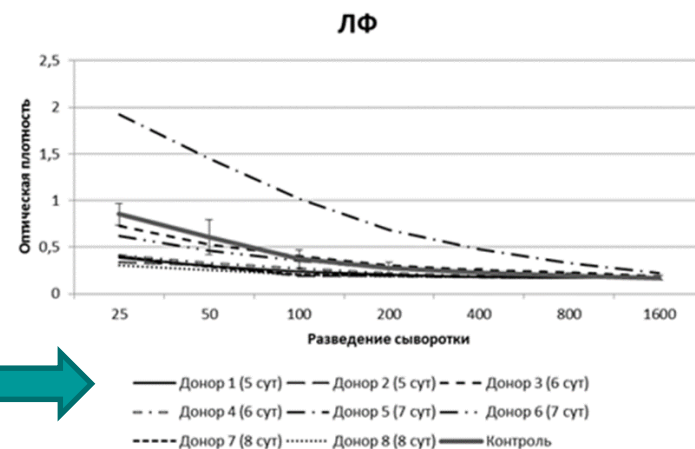
Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ Разработана технология селекции единичных **В-клеток памяти** против инфекционных агентов на примере *Bacillus anthracis*:
- ❖ Выбрана панель моноклональных антител для фенотипирования **специфических плазмобластов** в крови доноров после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной: CD19+CD20lo-CD38hiCD27hiPA+PAIVd+
- ❖ Отработана методология стерильного сортигнга плазмобластов в щадящем для клеток режиме
- ❖ Отобрано 11 специфических к ПА IVd плазмобластов
- ❖ Разработан протокол селекции специфических плазмобластов против инфекционных агентов на примере *Bacillus anthracis*



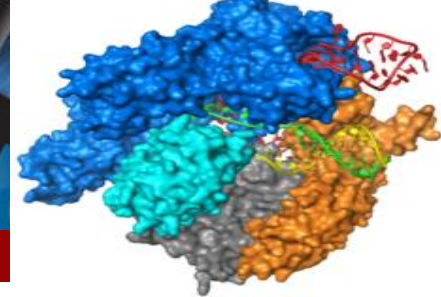
Получены
рекомбинантные
ПА и ЛФ

Изучены титры антител у
доноров к ПА и ЛФ и
токснейтрализующая
активность сывороток



Человеческие МКА к протективному антигену сибирской язвы

перспективы получения лекарственного средства



Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ Компетентные плазмобласты отобраны проточной цитометрией и стортингом по фенотипу из крови вакцинированных.
- ❖ Из единичных плазмобластов поднимается κДНК, кодирующая переменные части тяжелой и легкой цепи IgG встраивается в плазмиду.
- ❖ Плазмиду трансформируют в клетки E.coli для скрининга и выбора переменной части IgG, специфичной к протективному антигену.
- ❖ На основе сиквенса встраивается ДНК, кодирующая переменные части тяжелой и легкой цепи, в плазмиды, содержащие последовательности ДНК, кодирующие константные домены иммуноглобулина.
- ❖ Полученную плазмиду трансфицировали в клетки CHO для получения полноразмерной IgG, специфического к ПА.

Полученные рекомбинантные IgG проанализированы на аффинность и способность нейтрализовать летальный токсин в моделях *in vitro* и *in vivo*.

- ❖ Далее решение задачи вопросы стабильности и продуктивности полученных клеток, синтезирующих человеческие МКА.

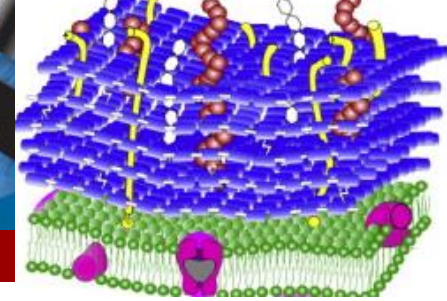
Бруцеллезная вакцина



Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ Для профилактики бруцеллеза в РФ используется живая бруцеллезная вакцина на основе штамма **B. abortus 19BA** производства ФГУП «Микроген».
- ❖ Специфическая иммунопрофилактика бруцеллеза у людей применяется для индивидуальной защиты людей от заражения бруцеллами козье-овечьего вида (*Brucella melitensis*).
- ❖ Риск высокой сенсибилизации - более года после прививки; бруцеллезоподобные клинические симптомы – «вакцинальной патергии»; иммуносупрессия клеточного иммунитета – снижение неспецифических факторов защиты (комплемент, лизоцим, неспецифический фагоцитоз) иммуносупрессия; орхиты у мужчин. **Т.Е. высокая реактогенность**
- ❖ Разработки новых препаратов бруцеллезных вакцин, лишенных указанных недостатков в России не ведутся, за рубежом, только на уровне феноменологии.
- ❖ Клонировано большое количество иммунодоминантных антигенов возбудителя, которые могут быть использованы как компоненты новых субъединичных химических вакцин в сочетании с новыми адъювантам.

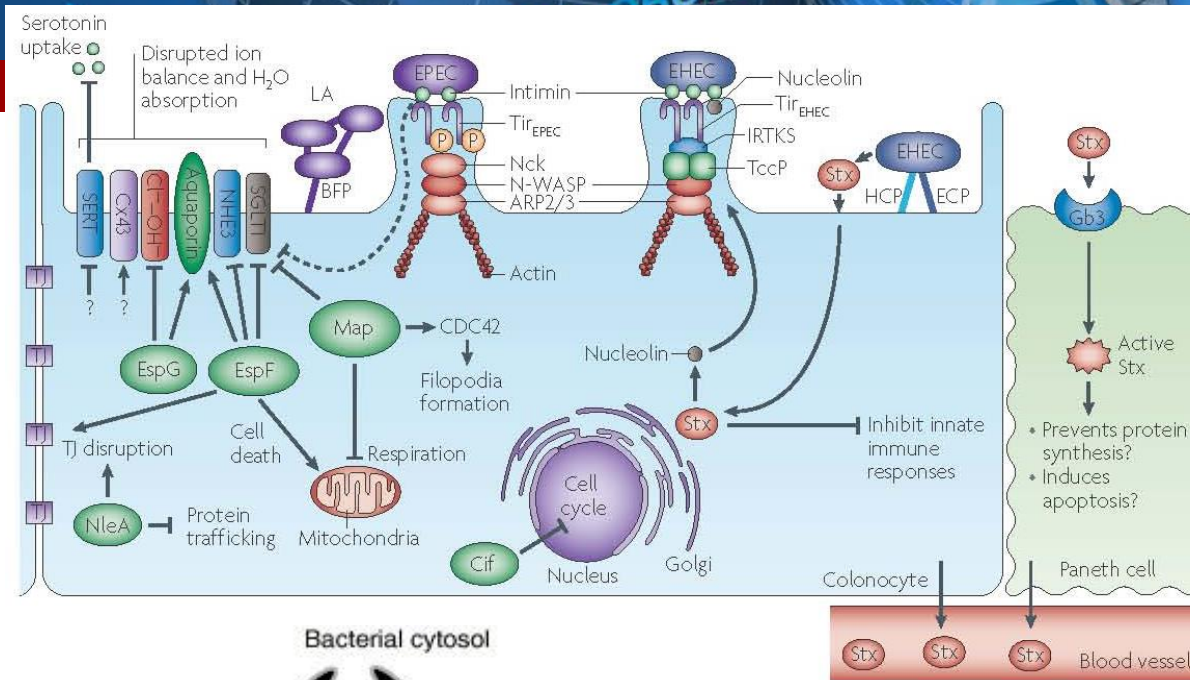
Бруцеллезные вакцины – разработки



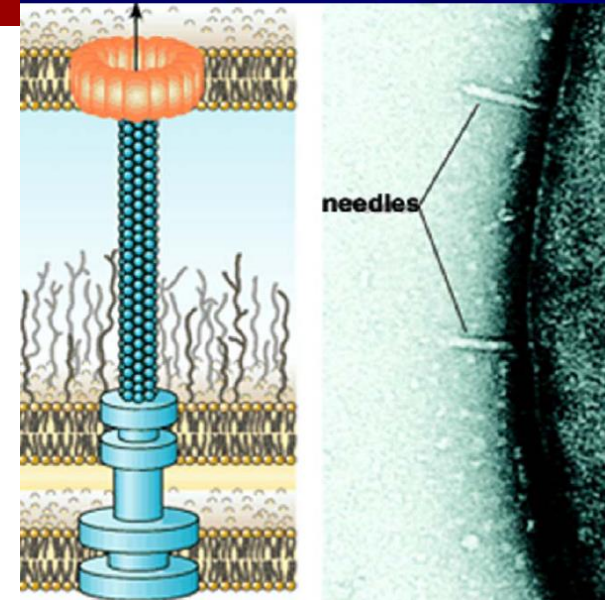
Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ Для новых вакцин используются наиболее иммуногенные белки **Omp31** и **Omp22**, играющие также роль в вирулентности и их предшественники, регуляторный железосодержащий белок FrpB.
- ❖ Создан полимерный антиген BLSOmp31, на основе которого разработана кандидатная вакцина BLSOMP31-AX – адсорбирован на $Al(OH)_3$
- ❖ Живые вакцины – ***B. melitensis* M5-90 manB мутант** (M5-90 Δ manB) во многом устраняет отрицательные эффекты существующих вакцин (Китай). Также разрабатывается вакцина на основе *B. abortus* 2308 Δ NodV Δ NodW с нокаутными генами на основе вирулентного штамма *B. abortus* 2308 (S2308).
- ❖ ДНК-вакцины. Рекомбинантная ДНК вакцина (pVGntR) основанный на транскрипционном регуляторе GntR *B. abortus*. pVGntR дает более выраженную защиту, чем обычная вакцина RB51. Спроектирована химерная вакцина на основе ДНК плазмиды несущей мультиантигенные детерминанты **21-го** антигена.
- ❖ Исследована иммуногенность и защитная эффективность вакцины на основе мембранного белка **2b (Omp2b)** на мышах BALB/c, с использованием Белок/Белок, ДНК/ДНК и стратегии вакцины ДНК-белок с хорошей эффективностью.

Эшерихиозные вакцины

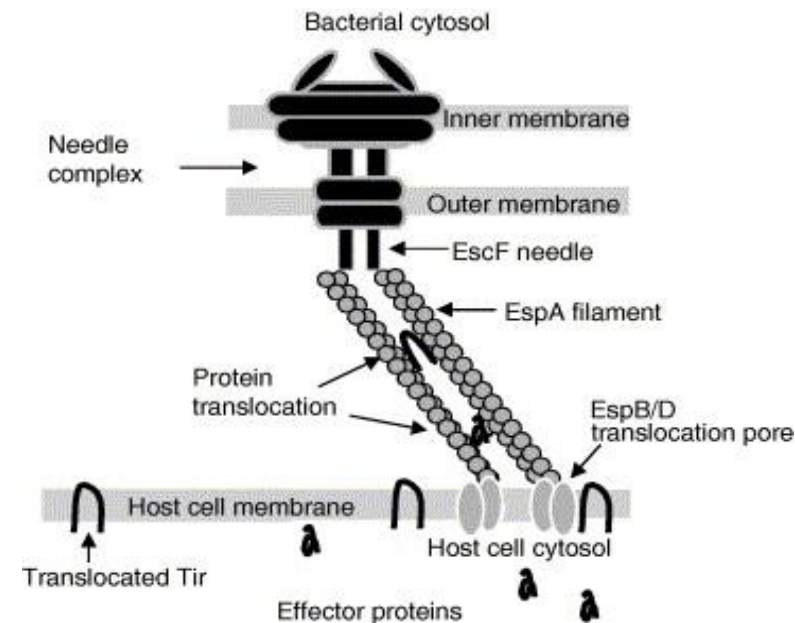


Molecular syringe

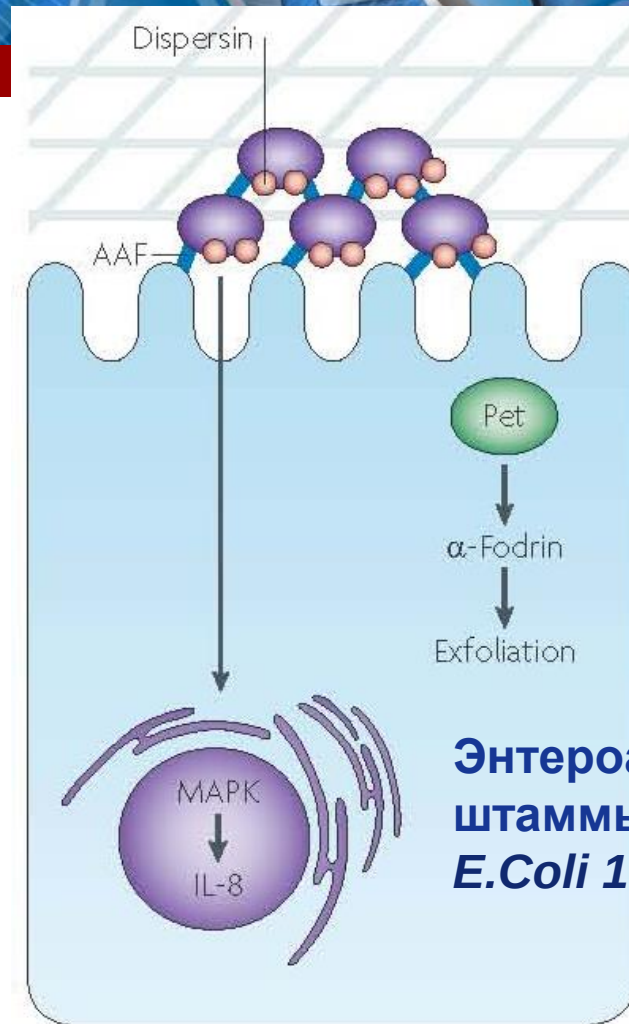
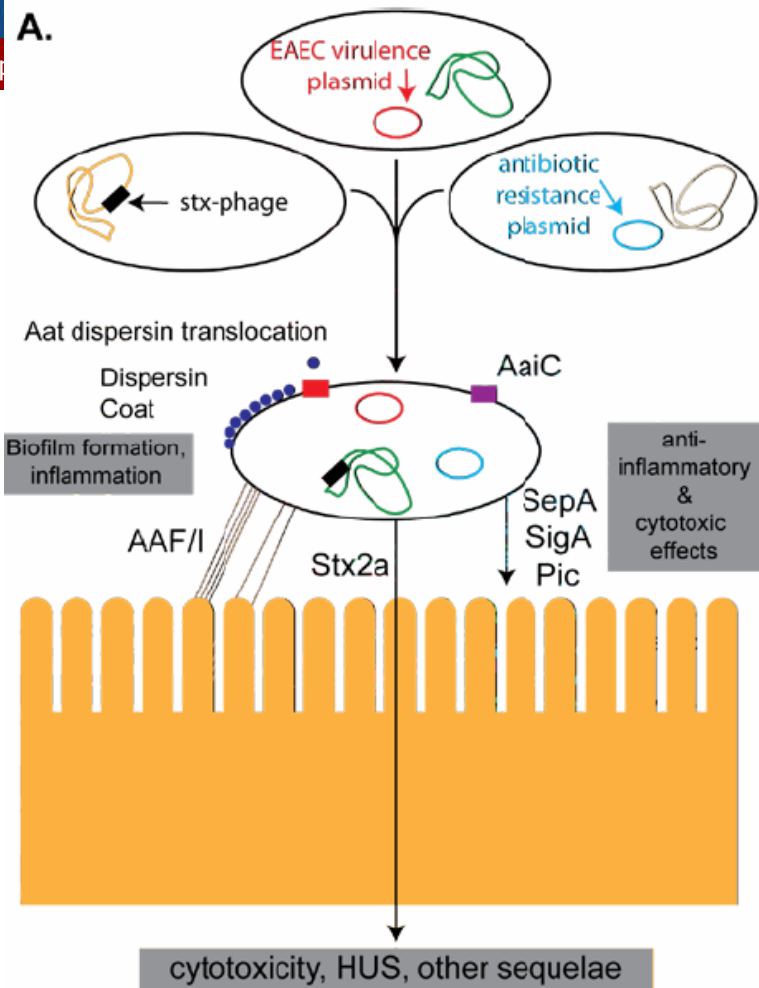


Энтерогеморрагические штаммы (EHEC) *E. Coli* O157:H7

Реализация системы экскреции 3-го типа
Впрыскивание токсина через молекулярный
стержень
Ключевые белки EspA b EspB



Эшерихиозные вакцины

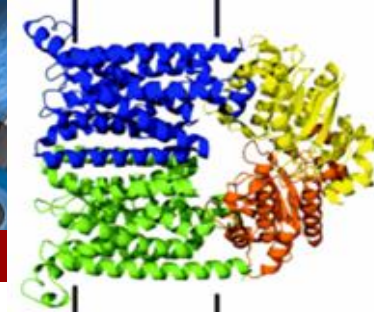


Энтероаггративные штаммы *EAggEC*) *E.Coli* 104:H4

Накопление токсина в межклеточном пространстве. Прямой впрыск токсина в районе пейеровых бляшек.

Технология создания эшерихиозной вакцины

Передовые технологии – защита Вашего здоровья



- ❖ Препараты ЛПС штаммов *E.Coli* O157:H7 и *E.Coli* 104:H4 получали из КЖ с помощью ультрафильтрации и очистки гельхроматографией.
- ❖ Структура ЛПС определялась с помощью ^{13}C -ЯМР- спектроскопии.
- ❖ Детоксикация в максимально щадящих условиях – собственная технология.
- ❖ Использованы мыши линии BALB/c, ЛПС вводился внутривбрюшинно двух или трехкратно в дозе от 25 до 5000 мкг\мышь.
- ❖ Заражение через 14 дней: внутривбрюшинно (летальная модель), интрагастрально (нелетальная колонизационная модель).

Результаты

- ❖ В\бр иммунизация мышей моно- и комбинированными неэндоотоксичными препаратами ЛПС из штаммов *E.Coli* O157:H7 и *E.Coli* 104:H4 индуцирует образование высоких титров специфических IgG и эффективную защиту от в\бр заражения смертельными дозами гомологичных штаммов.
- ❖ Наибольший протективный эффект от применения комбинированного препарата – модифицированный ЛПС из *E. Coli* O157:H7 и 104:H4 .

Основные проблемы и решения по совершенствованию вакцин для бактериальных ООИ



Передовые технологии – защита Вашего здоровья

- ❖ Отсутствие современных производств по выпуску коммерческих вакцин по требованиям GMP
- ❖ Отсутствие экспериментально- производственных мощностей для разработки технологий выпуска новых современных вакцин на основе разработанных прототипов
- ❖ Отсутствие достаточных средств на фундаментальные и прикладные разработки по совершенствованию вакцин.

Необходимо

Сформировать программу развития направления по созданию рецептур и технологий новых бактериальных вакцин против ООИ.

Выбрать профильное учреждение для размещения гибкого производства по выпуску пяти бактериальных вакцин против ООИ бактериальной природы (чума, сибирская язва, туляремия, бруцеллез, эшерихиозы) и отработки производственных технологий разработанных к настоящему времени новых прототипов.



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Спасибо за внимание!



www.obolensk.org