

ПРОСТОЕ СЛЕПОЕ ПЛАЦЕБО-КОНТРОЛИРУЕМОЕ РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ, РЕАКТОГЕННОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИНЫ «ЭПИВАККОРОНА» ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19 НА ДОБРОВОЛЬЦАХ В ВОЗРАСТЕ 18-60 ЛЕТ (ФАЗА I-II)

Введение

За последние два десятилетия коронавирусы спровоцировали эпидемические вспышки двух респираторных заболеваний: ближневосточный респираторный синдром и тяжёлый острый респираторный синдром [3, 15]. В конце 2019 года в Китае был обнаружен новый тип вируса, способный передаваться от человека к человеку, вызывая вспышку вирусной пневмонии [25]. Возникновение нового коронавируса подтверждает, что заболевания, вызываемые этой группой вирусов, представляют угрозу для всемирного общественного здравоохранения, поскольку в течение короткого периода времени вирус распространился почти по всему миру. 11 марта 2020 года ВОЗ придала новому коронавирусу статус пандемии.

Нынешняя ситуация, связанная с непрекращающейся пандемией COVID-19, ставит вопрос о необходимости оперативной разработки контрмер, среди которых одной из важнейших мер является доступность эффективной и безопасной вакцины [10]. В настоящее время во всем мире ведется разработка профилактических средств против COVID-19 на основе следующих технологических платформ: субъединичных, векторных реплицирующихся и векторных нереплицирующихся, РНК- и ДНК- вакцин; инактивированных, живых ослабленных вакцин и вирусоподобных вакцин на основе частиц [9]. Мы разработали вакцину "ЭпиВакКорона", содержащую химически синтезированные пептидные иммуногены, соответствующие выбранным защитным эпитопам шиповидного (S) белка коронавируса SARS-CoV-2. Пептиды конъюгированы (пришиты) к рекомбинантному вирусному нуклеокапсидному N-белку-носителю. Гидроксид алюминия используется в качестве адъюванта. В настоящее время проводится I–II фаза клинических испытаний вакцины "ЭпиВакКорона", то есть изучение показателей безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины на добровольцах в возрасте 18-60 лет. В данной статье обобщаются промежуточные результаты исследований.

Основными задачами исследований являются: оценка безопасности вакцины "ЭпиВакКорона" при двукратном внутримышечном введении; оценка реактогенности и побочных реакций на введение вакцины; исследование иммунных реакций после двух доз вакцины "ЭпиВакКорона" в сравнении с плацебо.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Исследование проводилось в федеральном государственном учреждении здравоохранения «Медико-санитарной части № 163 Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ МСЧ-163 ФМБА России).

Первый этап был открытым исследованием. В этом исследовании были задействованы 14 мужчин и женщин в возрасте от 18 до 30 лет включительно, которые соответствуют критериям включения и не имеют критериев исключения, данные которых будут использованы для последующего анализа безопасности и иммуногенности. Второй этап был простым, слепым, плацебо-контролируемым, рандомизированным исследованием на параллельных группах. В исследовании были задействованы 86 мужчин и женщин в возрасте от 18 до 60 лет включительно, которые соответствуют критериям включения и не имеют критериев исключения (Рис. 1). До начала всех процедур исследования от испытуемых было получено письменное информированное согласие на их включение в исследование. Критерии включения: в исследование были включены добровольцы обоего пола с индексом массы тела от 18,5 до 30 кг/м². При сборе анамнестических данных и данных, основанных на субъективном отчете, добровольцев не было выявлено хронических заболеваний, серьезных сопутствующих заболеваний, патологий или острых инфекционных заболеваний. Данных о положительном аллергическом анамнезе или непереносимости препарата не поступало. В течение исследуемого периода, а также за 7 недель и менее до иммунизации добровольцы не принимали никаких препаратов, влияющих на параметры иммунной системы. На этапе скрининга у добровольцев не было выявлено отклонений в жизненно важных параметрах (артериальное давление, ЧСС, ЧД, температура тела). При тестировании образцов сыворотки крови добровольцев на наличие антигена к гепатиту В (HBsAg), антител к ВИЧ и к гепатиту С, а также на наличие возбудителя сифилиса были получены отрицательные результаты.

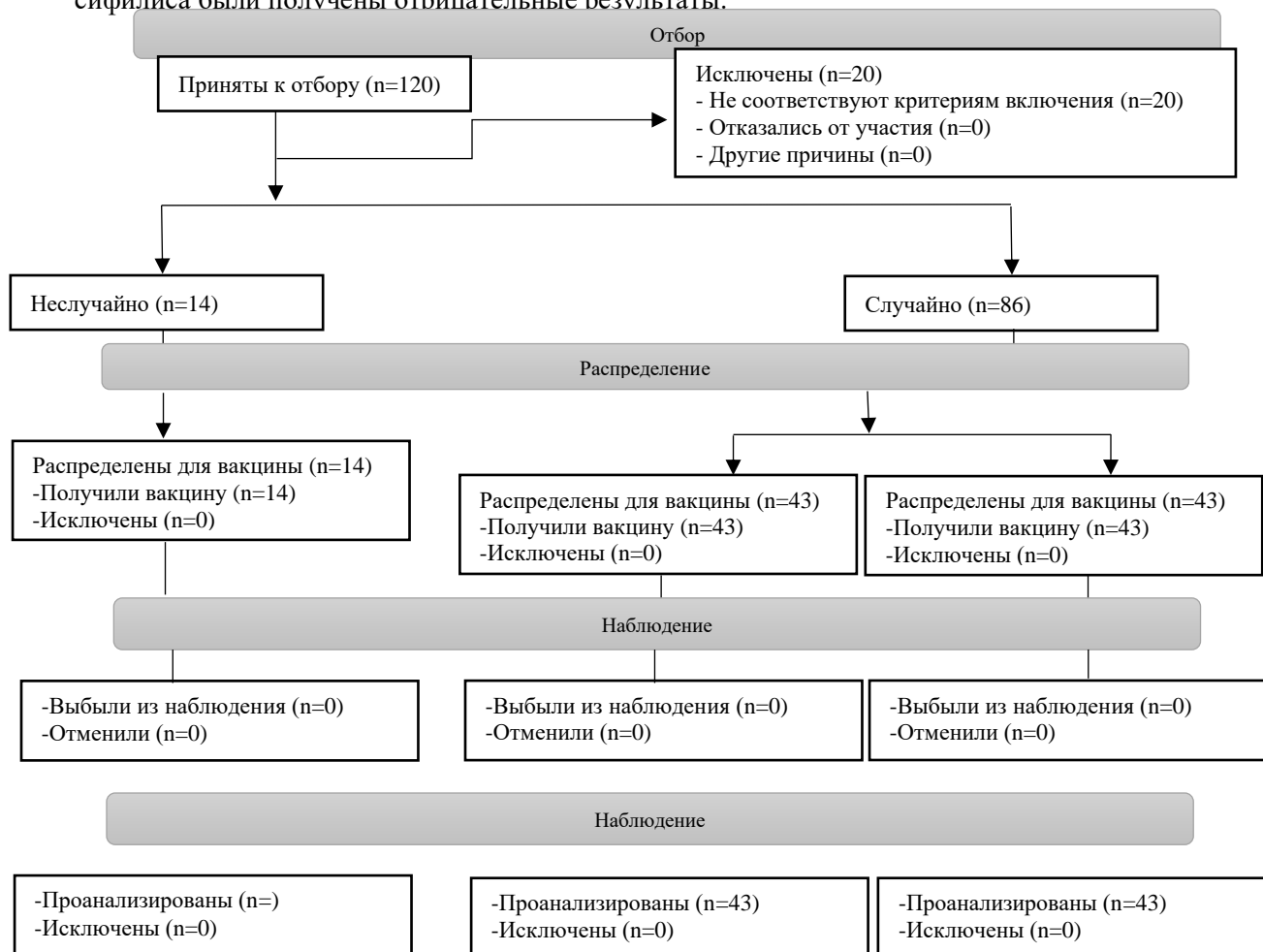


Рис. 1. Блок-схема клинических испытаний

Определение антител класса А, М и G, характерных для SARS-CoV-2, проводили методом ИФА. На этапе скрининга антитела, а также РНК коронавируса SARS-CoV-2 отсутствовали в мазках из носоглотки у всех добровольцев.

Критерии исключения были такими: контакты с COVID-19 в течение 14 дней до начала клинического исследования; гиперчувствительность к любому компоненту вакцины и наличие в анамнезе аллергических реакций на любую вакцинацию в прошлом; наличие в анамнезе серьезных поствакцинальных реакций/осложнений; беременность и грудное вскармливание; военнослужащие-призывники; симптомы любого заболевания на момент

включения в исследование или если прошло менее 4 недель с момента выздоровления; наличие в анамнезе любого острого респираторного заболевания в течение менее 3 месяцев до включения в исследование; туберкулез, рак, аутоиммунные заболевания, кожные заболевания (пузырчатка, псориаз, экзема, диффузный нейродермит); длительное применение (более 14 дней)

иммунодепрессивных препаратов, глюкокортикоидов системного механизма действия или иммуномодуляторов в течение 6 месяцев до исследования; вакцинация любой вакциной в течение одного месяца до включения в исследование; прием иммуноглобулиновых препаратов или препаратов крови в течение последних 3 месяцев до исследования; донорство 450 мл или более крови или плазмы в течение менее 2 месяцев до исследования.; участие в других клинических испытаниях менее чем за 3 месяца до начала исследования; алкогольная или наркотическая

зависимость; прием более 10 единиц алкоголя в неделю; положительный тест на ВИЧ, вирусные гепатиты В и С, сифилис; ложное включение (нарушение критериев включения и невключения) или появление критериев невключения во время исследования; исключение в связи с клинически значимым отклонением от протокола/нарушением протокола; и/или отказ добровольца от продолжения исследования.

После получения результатов обследования (анамнез, физический осмотр, лабораторное и томографическое исследование) добровольцы были разделены на группы. На первом этапе исследование проводилось с привлечением 14 добровольцев, включенных в одну группу (1-ая Группа). Вакцина не была защищена кодом. Первому добровольцу вакцина была введена внутримышечно, затем доброволец в течение 72 часов находился под наблюдением (т. е. период остановки); в случае отсутствия осложнений у первого добровольца вакцинировали второго добровольца. Далее последовал период остановки, и через 72 часа вакцина была введена третьему добровольцу; затем через 72 часа — четвертому; и еще через 72 часа — пятому добровольцу. Через семьдесят два (72) часа после вакцинации 5-го добровольца была проведена первая вакцинация оставшихся 9 добровольцев. Через 21 день после первого введения вакцины проводили вторую инъекцию. Второй этап- простое слепое сравнительное рандомизированное плацебо-контролируемое исследование. Восемьдесят шесть (86) добровольцев были разделены на две группы методом блочной рандомизации в соотношении 1:1 (рандомизация по методу “запечатанного конверта”): Группа 2 получила вакцину “ЭпиВакКорона” (43 субъекта); Группа 3 получила плацебо (43 субъекта). За день до первой вакцинации все добровольцы были госпитализированы. Время пребывания в больнице составило 23 дня. Для объективизации исследования добровольцы не знали, какую исследуемый препарат им вводили. Исследуемые препараты доставлялись в испытательный центр в готовом к применению (защищенным кодом) виде. Для обеспечения маскировки перед инъекцией исследуемые препараты были подготовлены в процедурном кабинете за ширмой. Никаких специальных мер по обеспечению выполнения требований для допущения исследуемого препарата не требовалось, поскольку исследуемый препарат был назначен в медицинском учреждении сотрудниками испытательного центра учреждения. Врач-исследователь, открывая конверт с наименьшим номером в наборе, знал, какой рандомизационный номер должен быть назначен и какой препарат исследования должен быть введен добровольцу. Когда в исследование был включен следующий доброволец, был вскрыт следующий конверт.

Первичными критериями эффективности были соотношения вакцинированных добровольцев, у которых не было лабораторно подтвержденных симптомов SARS-CoV-2 в сочетании с одним или несколькими из следующих симптомов: лихорадочное состояние или озноб; кашель; одышка или затрудненное дыхание; усталость; мышечная боль; головная боль; потеря вкуса или запаха; боль в горле; заложенность носа или насморк; тошнота или рвота; диарея в течение 9 месяцев после вакцинации по сравнению с плацебо. Вторичными критериями эффективности были следующие: доля добровольцев с повышением уровня иммунного ответа в виде средних геометрических титров специфических антител в ИФА; и титр специфических нейтрализующих антител $\geq 1:20$ через 42 дня после первой вакцинации и 90, 180 и 270 дней после первой вакцинации по сравнению с плацебо.

Протокол клинического исследования был рассмотрен на заседании местного комитета по этике в ФГБУЗ МСЧ-163 ФМБА России, где проводилось клиническое исследование (протокол заседания от 25 июля 2020 года). Исследование одобрено Советом по этике Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола заседания Совета по этике № 376 от 24 июля 2020 г.). Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации, первоначально принятой 18-й сессией Всемирной медицинской ассоциации (1964), пересмотренной в 2013 году. В ходе клинического исследования “простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины "ЭпиВакКорона" для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 19-60 лет (фаза I-II)” не было внесено никаких изменений в протокол исследования. Все процедуры (физический осмотр, клинические тесты, иммунологическое исследование и выявление нежелательных явлений) проводились в соответствии с Протоколом № COV/rept-01/20 (Версия 2 от 22.07.2020). Исследование началось 26 июля 2020 года и завершится 18 мая 2021 года.

Вакцина и плацебо

Вирусный шиповидный белок S, находящийся на поверхности вириона и образующий гомотримеры, является перспективной мишенью для разработки вакцин против нового коронавируса. Этот белок вируса SARS-CoV-2 состоит из двух субъединиц. Субъединица S1 обеспечивает связывание вируса с рецептором ACE2, расположенным на мембране клетки-хозяина. Субъединица S2 обеспечивает слияние оболочки вириона и мембраны клетки-хозяина. Блокирование функций первой субъединицы, а именно связывания рецептора, а также функции второй субъединицы, обеспечивающей слияние вирусной оболочки и мембраны клетки может обеспечить защиту от вирусной инфекции. Однако разработка вакцин SARS-CoV-2 с использованием полной молекулярной структуры вирусного S-белка имеет ряд потенциальных нюансов, и наиболее серьезным из них является антителозависимое усиление инфекции, как это было ранее показано для шиповидного белка SARS-CoV-1 группой китайских ученых [22].

Исходя из этого, нами был рассмотрен альтернативный подход, обеспечивающий развитие защитного иммунитета и исключая возможность антителозависимого усиления инфекции. Мы использовали технологию синтетических пептидных вакцин. Эта технология включает компьютерный дизайн нескольких иммуноактивных пептидных фрагментов шиповидного S-белка, химический синтез пептидов с последующей конъюгацией с высокомолекулярным белком-носителем. Наиболее эффективные пептиды были отобраны для включения в состав пептидной вакцины-кандидата после изучения их иммуногенности, антигенности и протективности на животных моделях (данные не приведены).

Отбор пептидов проводился на основе опубликованных пространственных структур шиповидного S-белка SARS-CoV-1, гомологичного SARS-CoV-2, и фактических данных нуклеотидных последовательностей нового коронавируса SARS-CoV-2 [5, 19]. Эпитопы, расположенные вблизи жизненно важных для вируса участков, были отобраны с использованием оригинальных методов машинного моделирования. Техническая разработка исключала эпитопы, которые могут привести к антителозависимому усилению инфекции (например, пептид S597-603) или иметь локальное антигенное сходство с белками человека [7, 11, 12, 22]. Для обеспечения устойчивости вакцины к возможным мутациям вируса, которые повлекли бы за собой изменение антигенных свойств, эпитопы отобраны из наиболее консервативных областей S-белка [7, 12]. Синтезированные пептиды были ковалентно связаны с белком-носителем. Белок-носитель MBP-6xHis-N_pCoV-2019 содержит структуры N-белка SARS-CoV-2, мальтозо-связывающего белка кишечной палочки (MBP) и 6xHis-метки (полигистидиновой метки), необходимой для очистки посредством аффинной хроматографии с хелатами металлов. N-белок SARS-CoV-2 был выбран потому, что он высоко консервативен и содержит вирусспецифичные T-клеточные эпитопы и, следовательно, должен способствовать производству T-клеток памяти. После стадии очистки белок-носитель покрывается ковалентно связанными пептидами и адсорбируется на гидроксиде алюминия, используемом в качестве адьюванта.

Вакцина «ЭпиВакКорона» представляет собой суспензию для внутримышечного введения, которая была разработана и изготовлена ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора (Россия, Кольцово) (GMP-0112-000170/17).

Вакцина вводилась испытуемым дважды внутримышечно с интервалом в 21 день. В одной прививочной дозе было (225±45) мкг/0,5 мл активного вещества. Инъекция вакцины проводилась в дельтовидную мышцу с использованием стерильных шприцев (Vogt Medical, Германия). В качестве плацебо использовался раствор хлористого натрия (0,9% раствор для приготовления лекарственных форм для инъекций). Его вводили внутримышечно дважды с интервалом 21 день в дозе 0,5 мл.

Вакцина и плацебо хранились при диапазоне температуре от 2°C до 8°C.

Физический осмотр и клинические лабораторные процедуры

Физический осмотр, биохимические, иммунологические и гематологические показатели крови, клинический анализ мочи были проведены в соответствии со стандартными клиническими протоколами. График обследования и все оцениваемые параметры приведены в Дополнительной таблице 1.

Физический осмотр проводился в соответствии со стандартной практикой и включал обследование, выявление жалоб и симптомов, измерение температуры тела, артериального давления, ЧСС и ЧД (данные показатели измерялись после того, как доброволец отдыхал в течение 5 минут в положении сидя). Обследование добровольцев также включало в себя осмотр кожи и слизистых оболочек (глаз, рта и глотки), диагностическое выслушивание звуков, перкуссию легких, пальпацию органов брюшной полости и лимфатических узлов.

Исследование безопасности и реактогенности

Безопасность вакцины оценивали по частоте и типу нежелательных явлений во время исследования: побочные эффекты немедленного типа (аллергические реакции), которые происходят в течение 2 часов после вакцинации и идентифицируются как врачом-исследователем, так и по информации, предоставленной добровольцем; неблагоприятные происходящие события (местные и системные реакции), в течение 7 дней после вакцинации и выявленных как врачом-исследователем, так и по предоставленным добровольцем данным, предоставленными; или другие нежелательные явления, которые происходят через 7 дней после каждой вакцинации (от 8 до 42 дней после первой вакцинации, исключая допустимый интервал посещений) и которые отмечались добровольцем в дневнике пациента (самонаблюдательном). Во время эксперимента следили за частотой серьезных нежелательных явлений. Оценивались показатели жизнедеятельности (температура, артериальное давление, ЧСС, ЧД). Были проведены физический осмотр и исследование биохимических и гематологических показателей. Значительные отклонения фиксировались.

Типичные поствакцинальные реакции организма делятся на местные и системные [1, 17]. Местные симптомы подразумевают гиперемию, отек, болезненные ощущения, образование инфильтрата и зуд в месте ввода инъекции. Системные реакции подразумевают лихорадку, недомогание, головную боль, миалгию и проч. Местные и системные реакции были оценены по 4-балльной шкале [23]. Температуру тела измерялась два раза в день (утром и вечером) и записывалась в дневник пациента и в персональную регистрационную карту. Вакцина считается реактогенной, если умеренные или сильные местные реакции или катаральные явления, длящиеся более 3 дней, были зарегистрированы более чем у одного из 50 вакцинированных пациентов [2].

Побочные явления, выявленные в ходе исследования, были сгруппированы в таблицы по частоте в соответствии с типом, тяжестью и корреляцией с введением исследуемой вакцины. Также была оценена доля пациентов с лабораторными показателями, превышающими физиологические нормы в целых сравнения исследуемых групп.

Сывороточные тесты ИФА

Специфические антитела, выработанные на вакцину «ЭпиВакКорона» определялись с помощью тест-системы ИФА «Вектор ИФА Корона-Ат», ТУ 21.10.60-092-05664012-2020. Вирусспецифические антитела определялись с помощью инактивированного бета-пропиолактоном вируса SARS-CoV-2 штамма nCoV/Victoria/1/2020, размноженного в клетках Vero E6. Иммуносорбент представлял собой 96-луночный полистирольный планшет высокой сорбционной способности, содержащий иммобилизованный инактивированный природный антиген SARS-CoV-2. Инактивация вируса была проведена путем добавления бета-пропиолактона к антигенам, очищенным осаждением в конечной концентрации 0,5%. Инкубация была проведена в течение 2 часов при температуре 4°C и перемешивании. После этого бета-пропиолактон подвергся разложению посредством нагревания в течение 2 часов при температуре 37°C. Для титрования были приготовлены двукратные разведения сывороток животных, иммунизированных вакциной, и контрольных животных (не иммунизированных) в соотношении 1:40-1:2560. После инкубации в течение 30 мин при 37°C лунки планшет пять раз были промыты ФСБТ, содержащим полисорбат твин 20. После промывки в лунки было добавлено 100 мкл раствора белка А золотистого стафилококка, соединенного с пероксидазой хрена в конечной концентрации 1,26 мкг/мл (Биосан, Новосибирск). После 30-минутной инкубации при температуре 37°C лунки были промыты, после в них был добавлен 0,05% субстрат тетраметилбензидина. Оптическую плотность растворов измерена на длине волны 450 нм. Титр антител - это максимальное разбавление исследуемой сыворотки, при котором оптическая плотность раствора превышает среднюю оптическую плотность отрицательного контроля.

Тесты нейтрализации вируса

Исследуемые образцы сыворотки были подвержены термической инактивации в течение 30 мин при температуре 56°C перед тестом на нейтрализацию вируса. Стерильные круглодонные планшеты были использованы для приготовления серийных двукратных разведений исследуемых сывороток в клеточной среде для культивирования (DMEM, 100 мкг/мл бензилпенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 300 мкг/мл L-глутамина, 2% фетальной бычьей сыворотки [Invitrogen]). Вирусная суспензия, содержащая 200 БОЕ SARSCoV-2 (штамм nCoV/Victoria/1/2020), была добавлена в каждую лунку планшета, кроме отрицательных контролей, с последующим выдерживанием в термостате в течение 1 ч при температуре 37°C. Монослой клеток Vero E6 с более чем 90% конфлюентностью в плоскодонном 96-луночный планшете для культивирования клеток дважды промывали средой для культивирования клеток и переносили 100 мкл вирусной суспензии из круглодонного планшета с разведениями сыворотки в соответствующие лунки планшета с клеточным монослоем. После выдерживания в термостате в течение 1 часа при температуре 37°C и 5% уровне CO₂ среду удаляли из лунок, планшет промывали один раз и добавляли 150 мкл среды во все лунки. После 18-20 часов выдерживания в термостате при температуре 37°C и 5% уровне CO₂ среду удаляли из лунок, добавляли 100 мкл 80% ацетона (охлажденного до температуры минус 20°C). После 10-15 мин выдерживания в термостате ацетон удаляли, а планшет промывали фосфатным буфером (ФБС). В каждую лунку добавляли 100 мкл растворённых человеческих моноклональных антител к SARS-CoV-2 (Анти-N-белок SARSCoV-2 mAb_IgG, “Sanyou Biopharmaceuticals”, антитела в ФБС в соотношении 1:2000). Планшет выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 1 часа. Лунки промывали с помощью ФБС четыре раза и добавляли вторичные кроличьи антитела к IgG человека, соединённого с пероксидазой хрена (Abcam) в соотношении 1:1000. После 30 минут инкубации лунки четыре раза промывали ФБС и добавляли раствор АЭК (3-амино-9-этилкарбазола, Sigma). Через 30 минут раствор удаляли, планшет один раз промывали ФБС, под микроскопом проводили подсчёт зараженных клеток, окрашенных в красно-коричневый цвет, и подсчитывали количество бляшкообразующих единиц (БОЕ). Титр нейтрализующих сывороточных антител представляет собой титр, при котором количество БОЕ снижается на 50% по сравнению со средним значением БОЕ в контрольных лунках.

ПЦР-тестирование мазка из носоглотки

Выделение РНК из назальных смывов проводили с помощью набора реактивов “РИБО-сорб” (ЦИЭФ, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК из выделенной РНК был проведен с использованием набора реактивов “РЕВЕРТА-Л” (ЦИЭФ, Россия) для реакции обратной транскрипции в соответствии с инструкциями производителя. Амплификацию фрагментов кДНК SARS-CoV-2, синтезированных на матрице РНК SARS-CoV-2 в реакции обратной транскрипции, проводили с использованием набора реактивов Вектор ОТ-ПЦР-COVID-19-РГ (ФБУН ГНЦ ВБ ВЕКТОР, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты испытаний интерпретируются так, как описано в инструкции, прилагаемой к набору.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием критерия Вилкоксона для парных выборок и критерия Манна–Уитни для непарных выборок. Анализ динамических изменений исследуемых показателей внутри групп проводился с помощью критерия Фридмана с последующим ретроспективным анализом Немени. Статистическую значимость для категориальных переменных (изменения сероконверсии, маркеров инфекции и др.) определяли с помощью точного теста Фишера. Корректировка для многократного тестирования проводилась с использованием поправки по методу Бонферрони. Значение альфа 0,05 или менее считалось статистически значимым. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения R для статистического анализа [16].

Результаты

Контингент исследования

Клинические испытания начались 26 июля 2020 года. Началу клинических испытаний предшествовал этап скрининга состояния здоровья добровольцев. После получения результатов обследования (анамнез, физический осмотр, лабораторное и томографическое исследование) и принятия решения о том, соответствует ли доброволец критериям включения/исключения, добровольцы были разделены на группы. На первом этапе с участием 14 добровольцев было проведено открытое исследование безопасности, реактогенности и иммунологической активности вакцины (исследование началось 26 июля 2020 года).

Переведено с английского на русский

Соотношение мужчин и женщин в группе составило 64,3% и 35,7% соответственно. Средний возраст - 25,1 года, средний вес - 71,8 кг. На втором этапе с участием 86 добровольцев было проведено одно слепое сравнительное рандомизированное плацебо-контролируемое исследование (исследование началось 15 августа 2020 года). Соотношение мужчин и женщин в группе, получавшей вакцину "ЭпиВакКорона", составило 60,5% и 39,5% соответственно. Средний возраст - 35,1 года, средний вес - 73,7 кг. Соотношение мужчин и женщин в группе плацебо составило 48,8% и 51,2% соответственно. Средний возраст - 31,5 года, средний вес - 67,9 кг. Более подробную информацию можно найти в Таблице 1.

Результаты в области безопасности

Пептидная вакцина "ЭпиВакКорона" прошла токсикологическое исследование только на животных, показатели безопасности вакцины для человека были абсолютно неизвестны. Далее, в соответствии с рекомендациями, была начата вакцинация добровольцев с участием первых 5 участников, которые вакцинировались по очереди с интервалом в 72 часа. Иначе говоря, вакцина была введена внутримышечно первому добровольцу, который находился под наблюдением в течение 72 часов (период остановки). В случае отсутствия побочных эффектов у первого добровольца прививали второго добровольца и т. д.

По результатам наблюдений, полученных после первых пяти добровольцев, в Министерство здравоохранения Российской Федерации был представлен первый промежуточный отчет и через 72 часа после вакцинации пятого добровольца были вакцинированы остальные 9 добровольцев первого этапа. Добровольцы наблюдались ежедневно в течение 5 дней. Вслед за тем, на основании результатов оценки местных и системных реакций всех участников первого этапа (14 добровольцев), а также результатов биохимических и гематологических анализов крови и клинического анализа мочи был представлен второй промежуточный отчет о безопасности и реактогенности вакцины "ЭпиВакКорона". Было принято решение о дальнейшем проведении исследования в связи с отсутствием значительных побочных эффектов.

Внутримышечное введение вакцины "ЭпиВакКорона" сопровождалось болью в месте введения инъекции после каждой инъекции (у 2-ух из 14 добровольцев, что составляет 14,3% от общего числа добровольцев). Симптомы были очень легкими и проходящими (в течение 1-2 дней). Никаких аллергических реакций немедленного типа не наблюдалось. В фазе I не было зарегистрировано никаких системных побочных явлений, таких как головная боль, миалгия, астения, лихорадка и т. д. При этом средние значения биохимических показателей не выходили за пределы физиологических норм, за исключением одного добровольца (т. е. увеличение содержания креатинина в крови до 110 мкмоль/л на 7-й и 14-й дни после первой вакцинации). Вакцинация у большинства добровольцев не вызывала изменений гематологических показателей, за исключением двух случаев (14% от общей статистики), когда на 3-и сутки после первой вакцинации были обнаружены изменения моноцитов. При проведении спирографии во все сроки наблюдения изменений параметров легочной функции выявлено не было. Значения ЭКГ оставались в пределах нормы у всех добровольцев. УЗИ органов брюшной полости не выявило патологических изменений в исследуемых органах. Существенных изменений в результатах физического осмотра или лабораторного обследования не наблюдалось, за исключением наблюдений активности АЛТ/АСТ в биохимических анализах крови (Дополнительная таблица 2). Однако эти наблюдения не были связаны с вакцинацией и не считались клинически значимыми.

Последующее изучение безопасности и реактогенности вакцины "ЭпиВакКорона" было проведено с привлечением 86 добровольцев, разделенных на две группы. Одна группа получала вакцину дважды с интервалом в 21 день. Другая группа получала плацебо по той же схеме. Никаких аллергических реакций в фазе II не наблюдалось. Наиболее распространенным побочным эффектом была локальная боль в месте введения инъекции (наблюдалась у 4-ех из 43 добровольцев после первой инъекции и еще у двух пациентов после второй инъекции). Все местные реакции были умеренными и проходящими (в течение 1-2 дней). Только у одного добровольца из группы вакцинированных наблюдалось кратковременное умеренное повышение температуры тела через 12 часов после первой инъекции, сопровождавшееся головной и ушной болью. Добровольца поместили в изолированный кабинет, где продержали 6 дней. При ежедневном исследовании мазков из носоглотки вирусная РНК не выделялась. Была проведена консультация отоларинголога, диагностирован средний отит и назначено лечение.

За весь период наблюдения (24 посещения) не было обнаружено существенных изменений таких показателей, как температура тела (все, кроме одного, приписываемого в основном среднему отиту), кровяное давление, ЧСС или ЧД ни у одного добровольца (вакцинированного вакциной "ЭпиВакКорона" или плацебо). Во все периоды все жизненно важные показатели находились в пределах физиологических норм. Местные и системные реакции приведены в Таблице 2.

У 12 добровольцев, получавших вакцину "ЭпиВакКорона", и у 12 человек из группы плацебо была обнаружена повышенная ферментная активность АЛТ. Повышенная активность АСТ наблюдалась по крайней мере один раз у 25 вакцинированных и у 25 добровольцев, получавших плацебо. Повышенная

Переведено с английского на русский

активность ЛДГ наблюдалась по крайней мере один раз у 11 пациентов, получавших вакцину, и у 9 человек из группы плацебо. Повышенная активность щелочной фосфатазы наблюдалась у 9 вакцинированных. Однако наблюдаемые отклонения имели умеренный характер и не имели клинических проявлений; они объяснялись физиологическими причинами, не связанными с патологией и не приписываемыми вакцинации. При исследовании биохимических и гематологических показателей крови не было обнаружено достоверных различий между группами добровольцев, получавшими вакцину и плацебо. Наблюдения за отклонениями результатов биохимических и гематологических тестов от родственных физиологических норм, полученных в разных группах добровольцев, приведены в Дополнительной таблице 2.

У пациентов, получивших плацебо, не отмечалось никаких аллергических реакций немедленного типа, местных или системных реакций.

Таблица 1. Характеристики субъектов исследования

Переменная	Фаза	Вакцина	Пол	Номер	Мин	Макс	Средн	СО	Медиан	K1	K2
Температура	I	1	Ж	5	36.4	36.8	36.64	0.18	36.7	36.5	36.8
Температура	I	1	М	9	36.2	36.8	36.52	0.2	36.4	36.4	36.7
Температура	II	0	Ж	16	36	36.9	36.69	0.26	36.75	36.6	36.9
Температура	II	0	М	27	36	36.9	36.59	0.23	36.6	36.4	36.75
Температура	II	1	Ж	23	36	36.9	36.59	0.27	36.7	36.5	36.8
Температура	II	1	М	20	36.1	36.9	36.69	0.2	36.8	36.6	36.8
Возраст	I	1	Ж	5	18	36	23.6	7.64	19	19	26
Возраст	I	1	М	9	18	41	26	8.06	24	19	28
Возраст	II	0	Ж	16	22	59	35.31	12.42	32.5	24	41.25
Возраст	II	0	М	27	21	52	32.81	8.23	32	27.5	37.5
Возраст	II	1	Ж	23	19	55	35.22	11.67	37	23.5	42
Возраст	II	1	М	20	18	57	31.05	10.16	28	23.75	36.25
Вес	I	1	Ж	5	62	74	67	4.9	65	64	70
Вес	I	1	М	9	70	90.3	83.28	7.31	82	79.1	90
Вес	II	0	Ж	16	48	78	63.75	9.11	66	58	70
Вес	II	0	М	27	62	97	77.85	10	79	68.5	86.5
Вес	II	1	Ж	23	48	84	62.32	9.5	59	56	69
Вес	II	1	М	20	55	103	79.7	10.28	77.5	74.75	84.5
Высота	I	1	Ж	5	160	169	166	3.67	168	165	168
Высота	I	1	М	9	171	188	180.89	6.03	182	176	186
Высота	II	0	Ж	16	157	177	165.06	4.67	165	163.75	166.25
Высота	II	0	М	27	166	194	180.19	6.69	180	176	184.5
Высота	II	1	Ж	23	148	176	164.48	5.5	165	161	168
Высота	II	1	М	20	160	195	177.9	7.83	178	173.5	182.5
САД	I	1	Ж	5	118	130	124.4	5.55	124	120	130
САД	I	1	М	9	120	130	125.11	4.01	124	124	130
САД	II	0	Ж	16	110	141	125.12	7.69	122	120	129.5
САД	II	0	М	27	119	139	130.07	5.58	130	125.5	134.5
САД	II	1	Ж	23	117	137	125.04	5.84	125	120	128
САД	II	1	М	20	110	137	125.6	7.16	125.5	120.75	130.25
ДАД	I	1	Ж	5	70	80	75.8	3.63	76	76	77
ДАД	I	1	М	9	78	82	80	1.41	80	80	80
ДАД	II	0	Ж	16	63	97	79.25	8.47	76.5	73.75	85.75
ДАД	II	0	М	27	67	95	81.85	6.27	82	80	85
ДАД	II	1	Ж	23	63	97	79.17	7.33	80	75.5	83
ДАД	II	1	М	20	65	90	78.2	6.76	77.5	73.75	81.75
ЧД	I	1	Ж	5	16	18	17.6	0.89	18	18	18
ЧД	I	1	М	9	16	18	16.44	0.88	16	16	16
ЧД	II	0	Ж	16	16	18	16.69	0.6	17	16	17
ЧД	II	0	М	27	15	18	16.33	0.78	16	16	17
ЧД	II	1	Ж	23	15	18	16.57	0.66	17	16	17

Переведено с английского на русский

ЧД	II	1	М	20	15	17	16.2	0.62	16	16	17
ЧСС	I	1	Ж	5	74	78	77.2	1.79	78	78	78
ЧСС	I	1	М	9	72	76	74	1.73	74	72	76
ЧСС	II	0	Ж	16	66	84	77.56	4.53	78	75.75	82
ЧСС	II	0	М	27	68	88	76.15	5.33	76	72	79
ЧСС	II	1	Ж	23	63	84	75.91	5.35	77	72.5	79
ЧСС	II	1	М	20	62	86	74.2	7.13	73.5	71.75	77.25

Прим. Переменные: Т-температура тела, Возраст (годы), Вес (кг), Рост (см), САД и ДАД — систолическое и диастолическое артериальное давление соответственно, ЧД — частота дыхания, ЧСС — частота сердечных сокращений. Вакцина — 1 в группе ЭпиВакКорона и 0 в группе плацебо. Номер — количество добровольцев. Мин, Макс и Средн — это минимальные, максимальные и средние значения соответственно. СО - это стандартное отклонение. Медиан K1 и K2 - это медианное значение, а также значения 1-го и 2-го квартилей

Статистически значимых изменений частот ПР/ТПР не наблюдалось; статистически значимых различий в результатах лабораторных исследований между вакцинированными и плацебо-группами не наблюдалось.

Вакцина не вызвала развития немедленных побочных явлений (аллергических реакций), возникающих в течение 2 часов после вакцинации. В ходе исследования не наблюдалось развития серьезных побочных явлений. Таким образом, вакцина считалась низкоректогенной, безопасной и хорошо переносимой. Обратимый локально-раздражающий эффект вакцинации, наблюдавшийся у нескольких пациентов (у 6-ех из 43), был ожидаемо обусловлен известными эффектами гидроксида алюминия, используемого в качестве адьюванта в препарате "ЭпиВакКорона".

Однако в ходе исследования было зарегистрировано три случая острых респираторных вирусных инфекций, причем два из них были лабораторно подтверждены в качестве COVID-19. Это были единственные зарегистрированные тяжелые побочные явления.

Одним из случаев был 18 - летний пациент из первой группы вакцинированных (фаза I). 30 июля 2020 года он был госпитализирован на 23 дня в больницу, а первая вакцинация "Эпиваккорона" (серия № K010520) была проведена 1 августа 2020 года. Вторая вакцинация была проведена 22 августа 2020 года, и пациент вернулся домой 23 августа 2020 года. Плановые приёмы состоялись 24 августа, 28 сентября и 4 октября 2020 года. Жалоб не поступало, и в эти даты в мазках из носоглотки не была обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2. На 45 - й день после первой вакцинации был зарегистрирован сомнительный результат ПЦР-теста (значение порогового цикла - 33). На 47-й день повторное обследование было положительным, значение порогового цикла - 21. У больного наблюдалось общее недомогание, редкий сухой кашель, выделения из носа, повышенная температуры тела (38,0°C). В глотке наблюдалась приглушённая гиперемия задней стенки глотки. Патологий в сердце и лёгких не замечено. Согласно самоотчету пациента, 15 сентября 2020 года он почувствовал ухудшение состояния (появилась умеренная слабость, потеря обоняния, редкий сухой кашель и выделения из носа). Больной был изолирован (жил отдельно). 22 сентября результаты ПЦР-тестирования на SARS-CoV-2 оказались отрицательными.

Еще один лабораторно подтвержденный случай COVID-19 был зарегистрирован у 50-летней пациентки, получившей плацебо. Первое введение плацебо она получила 18 августа, второе - 7 сентября 2020 года. Плановые приёмы состоялись 9 и 15 сентября 2020 года. Жалоб не поступало, в эти даты в мазках из носоглотки не была обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2. Первые признаки заболевания (повышенная температура тела 37,5°C и слабость) были зафиксированы 17 сентября 2020 года. Однако 20 сентября 2020 года не было зафиксировано никаких симптомов, кроме слабости: температура тела была 36,6°C, артериальное давление и ЧСС были в норме, звук дыхательные звуки были чистыми, без хрипов. 24 сентября температура поднялась до 39,0°C, а 25 сентября 2020 года пациентка была госпитализирована в областную клиническую больницу с диагнозом двусторонняя нижнедолевая пневмония с РНК SARS-CoV-2, обнаруженной в мазках из носоглотки. Пациентка находилась в больнице до 6 октября 2020 года.

Таблица 2. Сводка местных и системных побочных эффектов на протяжении всего исследования

Кол-во добровольцев		Побочные эффекты											
		Местные реакции						Системные реакции					
		Слабые		Умеренные		Серьезные		Слабые		Умеренные		Серьезные	
		Н	%	Н	%	Н	%	Н	%	Н	%	Н	%
ЭпиВакКорона (I)													
После 1-ой инъекции	n = 14	2	14.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
После 2-ой инъекции	n = 14	2	14.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ЭпиВакКорона (II)													
После 1-ой инъекции	n = 43	4	9.3	0	0	0	0	0	0	1*	2.3*	0	0
После 2-ой инъекции	n = 43	2	4.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Плацебо (II)													
После 1-ой инъекции	n = 43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
После 2-ой инъекции	n = 43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Прим. * — Наблюдаемые реакции не были отнесены к вакцинации.

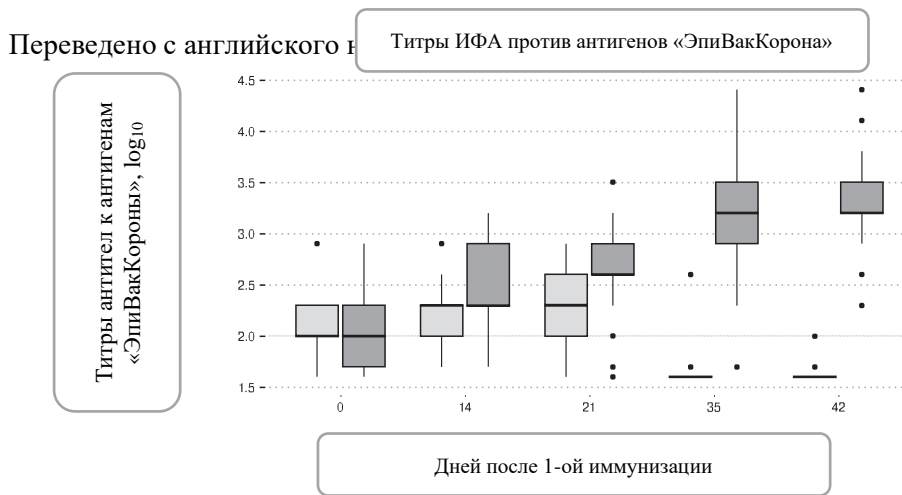


Рис. 2. Специфические антитела к антигенам «ЭпиВакКорона» через 14, 21, 35 и 42 дня после первой иммунизации, log₁₀

Еще один случай ОРВИ был зафиксирован у 25 - летней пациентки. Первую инъекцию плацебо пациентка получила 18 августа, вторую - 7 сентября. Запланированные визиты состоялись 9 и 15 сентября. Жалоб не поступало, и РНК коронавируса SARS-CoV-2 не была обнаружена в мазках из носоглотки в эти даты. Первые признаки заболевания появились 7 октября: температура тела повысилась до 38,8°C, наблюдались общая слабость и миалгия. Гипертермия сохранялась в течение 3 дней. РНК SARS-CoV-2 не была обнаружена.

У больного добровольца из группы плацебо с лабораторно подтвержденным заболеванием COVID-19 развилась двусторонняя пневмония. Клинические симптомы у привитого добровольца были значительно менее выражены, но это также возможно объяснить тем, что, как правило, у молодых людей заболевание протекает в легкой форме.

Иммуногенность вакцина

Для оценки специфического гуморального иммунного ответа на антигены "ЭпиВакКорона" и антигены нативного SARS-CoV-2 использовали ИФА. Наибольший индекс сероконверсии (100%) вакцинного антигена был отмечен на 42-е сутки после первой инъекции "ЭпиВакКорона" со средним геометрическим титром, достигающим 1:2475 (Рис. 2, Таблица 3). Средние геометрические титры антител на антигены цельновирионного SARS-CoV-2 были значительно ниже: 1:105 и 1:156 на 35-й и 42-й дни после первой иммунизации соответственно. Сероконверсия IgG к нативным антигенам коронавируса была зарегистрирована у 82,1% добровольцев на 42-й день после первой иммунизации (Рис. 3, Таблица 3). Сероконверсия IgM, измеренная по отношению к общим белкам коронавируса, была минимальной и составила 5,3% на 14-ый и 21-ый дни после первой иммунизации, снизившись до 1,8% к 35-му дню после первой иммунизации (данные не приведены).

Для измерения уровня нейтрализующих антител был использован тест нейтрализации вируса на клетках Vero E6. На 42-й день после первой вакцинации у 100% добровольцев обнаруживались нейтрализующие антитела с титрами со значениями от 1:20 до 1:160. Средние геометрические титры составили 1:68 и 1:48 на 35-й и 42-й дни после первой иммунизации соответственно. Сероконверсия не наблюдалась ни у одного добровольца из группы плацебо (Рис. 4, Таблица 2).

Обсуждение результатов

Клиническое исследование "ЭпиВакКорона" показало, что максимальное значение сероконверсии на вакцинные антигены было зарегистрировано у 100% добровольцев на 42-й день после первой инъекции. К этому времени средний геометрический титр к вакцинному антигену в группе вакцинированных добровольцев достиг значения 1:2475, варьируя в диапазоне значений от 1:800 до 1:25 600.

Высокая иммуногенность "ЭпиВакКорона" наблюдалась в ходе доклинических исследований (данные не приведены, статья находится на стадии рецензирования). Средний геометрический титр (СГТ) антител к вакцинным антигенам в сыворотках хомяков, вакцинированных дозой 260 мкг вакцинного материала, составил 1:11 943 через две недели после второй инъекции. К тому же у 100% вакцинированных хорьков развился высокий уровень специфических антител, причем

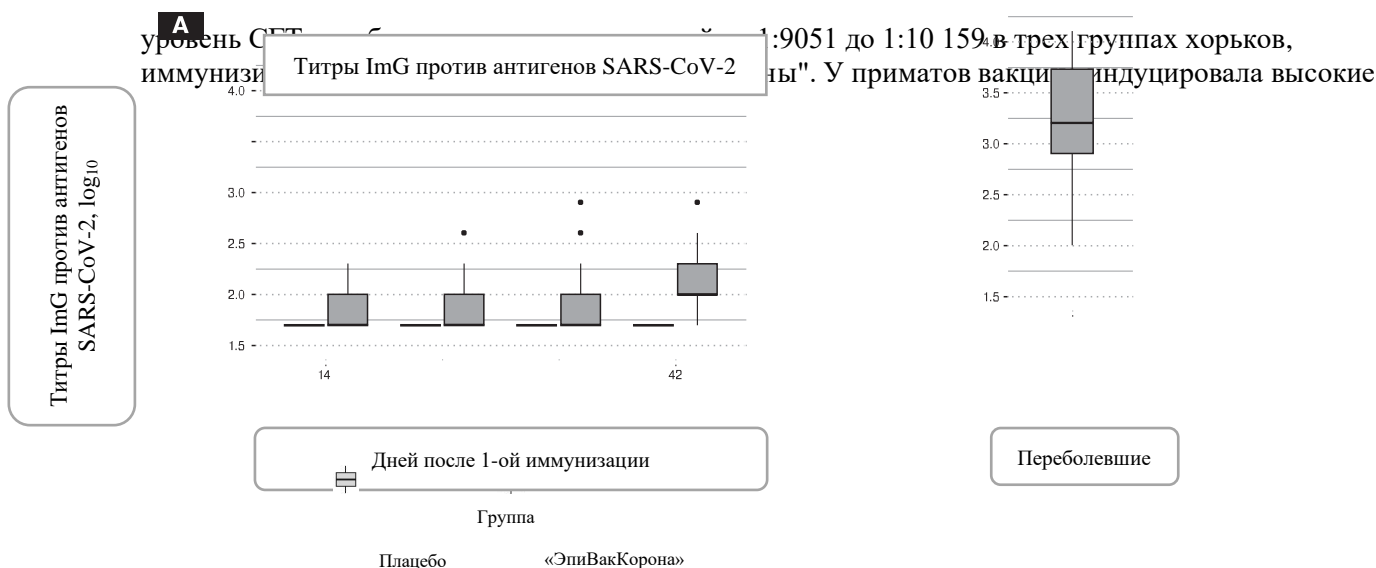


Рис. 3. А) Специфические антитела к антигенам SARS-CoV-2 в сыворотках добровольцев через 14, 21, 35 и 42 дней после первой иммунизации, log₁₀. Б) Специфические антитела к антигенам SARS-CoV-2 в сыворотках выздоравливающих, log₁₀

титры антител к вакцинным антигенам и цельновирионному антигену коронавируса у 100% животных через 2-3 недели после первой вакцинации. Через четыре недели после первой вакцинации СГТ к вакцинному антигену достигали значений в диапазоне 1:12 800 и 1:11 143 у макак-резусов и зеленых обезьян соответственно. У 100% животных опытной группы титр антител, характерных для вакцинного антигена, колебался в диапазоне значений от 1:6400 до 1:25 600. Однако нейтрализующие антитела были зарегистрированы через 14 недель после первой вакцинации и исчезли за 4 недели до инфицирования коронавирусом. После заражения вирусом вакцинированных животных ни у одного из приматов не наблюдалось фокальных инфильтрирующих изменений в легких, характерных для вирусных пневмоний, в то время как у животных, получавших плацебо, наблюдалось обширное повреждение легочной ткани и признаки вирусной пневмонии (плеврит, кардиомегалия). В отличие от наших результатов в доклинических исследованиях на приматах, у 100% добровольцев титры нейтрализующих антител составляли значения в диапазоне от 1:20 до 1:160 после двух прививок, СГТ - в диапазоне значений от 1:68 на 35-й день после 1-й инъекции. Таким образом, вакцина "ЭпиВакКорона" оказалась иммуногенной и способной индуцировать потенциально защитный иммунитет и вируснейтрализующие антитела у людей-добровольцев.

Пептиды, входящие в состав "ЭпиВакКороны", перекрываются с эпитопами, описанными программой VirScan, и наиболее заметным среди них является эпитоп S454-463, который расположен к рецептор-связывающему домену и перекрывает центр связывания вируснейтрализующего антитела CB6 [18]. В другом исследовании В-клеточного эпитопа SARS-CoV-2 с пептидными микрочипами был обнаружен аналогичный перекрывающийся эпитоп S456-460, который ранее был идентифицирован как эпитоп нейтрализующего антитела B38, выделенного от выздоравливающего пациента [24].

Кроме шиповидного белка, который является основной мишенью большинства современных иммуно-тестов и вакцин SARS CoV-2, многие современные серологические анализы используют рекомбинантный белок N, поскольку он продуцируется в огромных количествах реплицирующимся вирусом [13]. Белок N был даже предложен для метода с применением масс-спектрометрии специфического и чувствительного обнаружения вируса SARS-CoV-2 в эпителиальных мазках носоглотки, поскольку такой подход позволял четко определять вирус в образцах пациентов даже с самыми низкими вирусными нагрузками [14]. Детальные обзоры картирования эпитопов в вирусе SARS-CoV-2 подтвердили, что белок N является полезным маркером, несущим многие В-клеточные эпитопы, распознаваемые антителами у инфицированных вирусом пациентов [13, 18, 21]. Весьма примечательно, что даже при наличии одного эпитопа белка N, расположенного в области 155-171, удалось достичь 92% чувствительности и 100% специфичности при различении здоровых субъектов от инфицированных [13]. Белок N был предложен в качестве возможного антигена для будущих

Переведено с английского на русский

вакцин против SARS-CoV-2 [4]. Было показано, что данный белок индуцирует Т-клеточные иммунные ответы. N-специфические Т-клетки наблюдались у мышей, заражённых SARS-CoV-2 и реконвалесцентов COVID-19 [6, 8]. В последнее время было продемонстрировано, что интраназальная инокуляция рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего белок N вируса SARS-CoV-2, индуцирует местные и системные Т-клеточные иммунные ответы у мышей. Белок N индуцировал CD8⁺ Т-киллеры в легких и CD4⁺ Т-клетки в селезенке иммунизированных животных. N белок-специфичные CD4⁺ Т-клеточные ответы также были связаны с гуморальным иммунным ответом [8]. Вакцина "ЭпиВакКорона" содержит вирусный белок N вируса SARS-CoV-2, который был выбран для использования в качестве носителя пептидных антигенов из-за его высокого уровня эволюционной консервативности и иммуногенности, а также в качестве ценного источника CD4⁺ Т-клеточных эпитопов в соответствии с нашим предыдущим опытом. Последние результаты подтверждают вывод о том, что белок N, хотя и не способен вызывать вирус-нейтрализующие реакции, все же может быть важен для развития вирус-специфичных Т-и В-клеток памяти; это особенно важно, поскольку Т-клетки памяти могут сохраняться дольше, чем антитела или В-клетки памяти, как это наблюдалось при атипичной пневмонии [6].

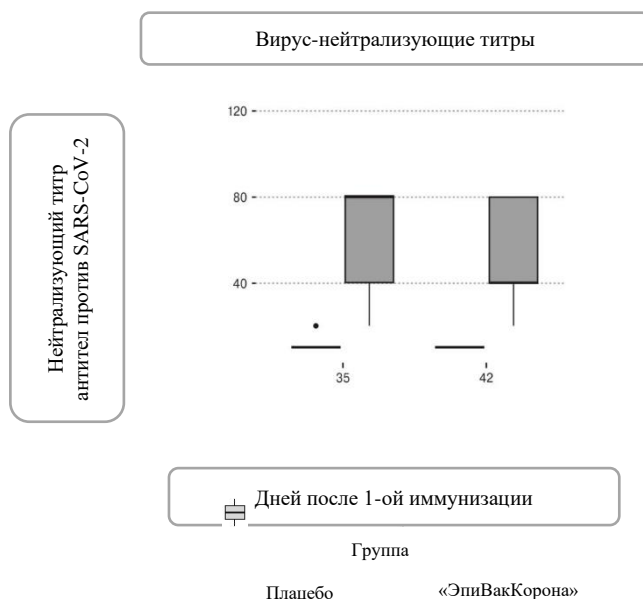


Рис. 4. Вирус-нейтрализующие антитела (обратный титр) в сыворотках добровольцев через 35 и 42 дня после первой иммунизации

Кроме того, важно отметить, что высокие титры вирусспецифических антител не обязательно связаны с защитой от COVID-19. Во время нынешней пандемии многие исследовательские группы обнаружили то, что люди с легким или бессимптомным заболеванием часто характеризуются низкими титрами антител к антигенам SARS-CoV-2. Например, в одном из таких исследований было показано отсутствие антител у 87,5% бессимптомных и 23,5% пациентов с лёгким течением болезни [20]. Быстрое снижение вирусспецифических титров IgG после вирусной инфекции было описано в многочисленных работах. Кроме того, было показано, что до 40% бессимптомных субъектов становятся серонегативными уже через 3 месяца [6].

Вакцина "ЭпиВакКорона" показала низкую реактогенность. Только у четырех (9,3%) и двух (4,7%) добровольцев после первой и второй инъекций вакцины соответственно развились слабые местные реакции. Продолжительность симптомов после первой и второй прививки составила 1-2 дня. Поствакцинальные реакции были умеренными, кратковременными и не вызывали дискомфорта у добровольцев. О других проявлениях реактогенности не сообщалось. Вакцина оказалась безопасной и хорошо переносимой. Доказано, что пептидная вакцина "ЭпиВакКорона" индуцирует вирусспецифические и нейтрализующие антитела у 100% добровольцев, величины титров которых, как было показано в доклинических исследованиях (у хомяков, хорьков и приматов), обеспечивают сокращение продолжительности вирусносительства на 5-7 дней и предотвращают пневмонию (публикация находится на стадии рецензирования). Количество зарегистрированных добровольцев и количество лабораторно подтвержденных случаев

Переведено с английского на русский

заболевания COVID-19 недостаточно для того, чтобы сделать выводы об эффективности вакцины.

Дополнительные материалы

Дополнительные таблицы доступны по адресу: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699>

Благодарность

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

Конфликт интересов

ABR, MPB, EDD, EAN, OVP, OGP, EVG, RAM и EAR заявляют о наличии патента RU2738081 на пептидные иммуногены и вакцинную композицию. EAR и ESS заявляют о приеме на работу в ООО "ЭпиВак". Все прочие авторы заявляют об отсутствии конкурирующих интересов.

Все авторы подтверждают, что они соблюдают критерии МКМРЖ в отношении авторства.

Ссылки