

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
академік НАН України
Сергій КОМІСАРЕНКО



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу в рамках реалізації проекту
із виконання наукових досліджень і розробок

«Дослідження імуногенних властивостей протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 як основа для розроблення вакцини проти COVID19»
(назва Проекту)

Назва конкурсу: «Наука для безпеки людини та суспільства»
Реєстраційний номер Проекту: 2020.01/0322

Підстава для реалізації Проекту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проекту) 2020.01/0322 «Дослідження імуногенних властивостей протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 як основа для розроблення вакцини проти COVID19»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства» (назва конкурсу) протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21.

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проекту
Початок – 23 жовтня 2020 року;
Закінчення – 15 грудня 2021 року.

Загальна вартість Проекту, грн. 7 541 000 грн.

Вартість Проекту по роках, грн.:
1-й рік 3 000 000 грн.
2-й рік 4 541 000 грн.

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проекту залучено 8 виконавців, з них:
доктори наук 2;
кандидати наук 6;
інші працівники 0.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Грантоотримувач: Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (державна організація)

Підпорядкованість: Національна академія наук України

Код ЄДРПОУ 05417288. Код(и) КВЕД 72.11; 72.19

Стратегічні напрями наукової діяльності:

- 1) Дослідження структури, фізико-хімічних властивостей і біологічних функцій складних білкових та надмолекулярних систем.
- 2) Вивчення молекулярної організації метаболічних процесів та механізмів їх регуляції біологічно активними речовинами.
- 3) Розробка біотехнологій та нанобіотехнологій для медицини, сільського господарства, екології та промисловості.

ПІБ керівника: акад. НАН України Комісаренко Сергій Васильович

Адреса: вул. Леонтовича 9, 01054, Київ, Україна

Телефон: +38(044) 234-59-74; +38(044) 279-63-65 (факс)

Адреса електронної пошти: secretar@biochem.kiev.ua

Посилання на веб сторінку: <http://www.biochemistry.org.ua>

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Дослідити імуногенні властивості рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх кон'югатів з носіями, здатними до транспортування протеїнів, розробити склад вакцини проти COVID19 і провести випробування її дослідного зразка.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

Створити генетичні конструкції, що містять гени протеїнів SARS-CoV-2, їх злитих кон'югатів з носіями, а також із eGFP. Одержати рекомбінантні протеїни, імунізувати ними мишей. Провести аналіз рівнів антитіл проти SARS-CoV-2, дослідити цитокіновий профіль сироваток. Оцінити здатність антитіл проти протеїну S (RBD) захищати клітини від зараження. Провести аналіз антигенних властивостей рекомбінантних протеїнів. Розробити оптимальний склад вакцини проти COVID19 та провести її випробування на тваринах.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

У 2020 р. Україна зіткнулася з пандемією SARS-CoV-2, що викликає COVID19. Значні надії покладаються на вакцини проти COVID19. Застосовують чотири основні стратегії створення вакцин: на основі цілих ослаблених вірусів, окремих протеїнів і вірусоподібних часток, ДНК або РНК і вірусних векторів. Тривають клінічні випробування, але невідомо, який підхід виявиться кращим. Важливим завданням є розроблення вітчизняної вакцини проти COVID19.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

У світі сотні компаній розробляють вакцину проти COVID19. Майже третина з них, як і ми, обрали стратегію створення вакцини на основі окремих протеїнів вірусу. Ми пропонуємо для підсилення імуногенності новий підхід: приєднати антигени коронавірусу з N-кінця до похідних дифтерійного токсину (носіїв) шляхом злиття їх генів. Очікується, що це дозволить в подальшому розробити ефективну вітчизняну вакцину проти COVID19.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Буде використано: 1) методи молекулярної біології та генної інженерії для створення генетичних конструкцій і методи металоафінної хроматографії та електрофорезу на етапі очищення рекомбінантних протеїнів; 2) імунохімічні методи для вивчення імуногенних та антигенних властивостей рекомбінантних протеїнів та статистичні – для обробки результатів; 3) методи

роботи з клітинами і цитофлуориметрію для дослідження здатності антитіл проти протеїну S (RBD) захищати клітини від зараження вірусом.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

В результаті виконання **I етапу Проєкту** у жовтні-грудні 2020 р. було створено генетичні конструкції на основі плазмідних векторів для прокаріотичної та еукаріотичної експресії протеїнів, що містять гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2: протеїну нуклеокапсиду (N), протеїну «шипа» (S), його мутантної форми (Smut), рецептор-зв'язувального домену (RBD), злитих кон'югатів RBD із носієм – дифтерійним токсодом CRM197, а також із зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP).

Для експресії цих рекомбінантних протеїнів у клітинах прокаріотів (*E. coli* штаму Rosetta (DE3)) було створено 5 генетичних конструкцій на основі плазмідного вектору *pET24entero*. Для експресії у клітинах еукаріотів (HEK293) було створено 4 генетичні конструкції на основі плазмідного вектору *pcDNA3*. Ще 2 генетичні конструкції для еукаріотичної експресії були додатково створені на основі човникового плазмідного вектору *pShuttle-CMV*, а потім переклоновані у конструкції на основі геному аденовірусу Adv5 – *pAdv-CMV-Easy1* для збереження можливості розроблення вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних аденовірусів, нездатних до самостійної реплікації, у випадку, якщо дослідний зразок вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів виявиться недостатньо ефективним. Крім того, було створено ще 1 генетичну конструкцію на основі вектору *pEGFP-N1* для еукаріотичної експресії злитого кон'югату RBD–eGFP. Правильність будови створених генетичних конструкцій було підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу та/або секвенування.

В результаті виконання **II етапу Проєкту** у травні-серпні 2021 р. було одержано рекомбінантні протеїни коронавірусу SARS-CoV-2: протеїн нуклеокапсиду (N) і рецептор-зв'язувальний домен S-протеїну (RBD) та злиті кон'югати протеїну RBD із дифтерійним токсодом CRM197 і зеленим флуоресцентним протеїном eGFP. Крім того, одержано відомості щодо імуногенності рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і злитого кон'югату RBD–CRM197, а також особливостей клітинної імунної відповіді при використанні гідроксиду алюмінію як ад'юванту під час імунізації мишей.

Показано, що рекомбінантний протеїн N є більш імуногенним у порівнянні з рекомбінантними протеїнами RBD і RBD–CRM197, а високого рівня антитіл проти RBD-домену можна досягти при застосуванні повторних імунізацій. Крім того, було показано, що протеїн N на відміну від RBD-домену стимулював підвищення експресії IFN-gamma і меншою мірою IL12b та IL-4 в клітинах селезінки мишей, а також підвищення рівня хемокіну CCL4 в крові мишей, що свідчить про участь протеїну N у запальних процесах і активацію ним насамперед клітинної імунної відповіді.

В результаті виконання **III етапу Проєкту** у вересні-грудні 2021 р. було одержано дані щодо відповідності антигенних властивостей рекомбінантних і природних протеїнів SARS-CoV-2, а також захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2. Також було розроблено оптимальний склад рекомбінантного вакцинного препарату проти COVID19 і проведено доклінічні випробування його дослідного зразка на тваринах (мишах).

Показано, що за антигенними властивостями одержаний рекомбінантний протеїн N відповідає природному протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2 і може бути використаний у складі вакцин проти COVID19, а також діагностичних тест-систем для виявлення антитіл проти SARS-CoV-2. Оцінювання відповідності антигенних властивостей рекомбінантного протеїну RBD (у тому числі, RBD у складі злитого кон'югату RBD–CRM197) було ускладненим через низький вміст антитіл до RBD у сироватках крові, що досліджувались. Цитофлуориметричні дослідження із використанням злитого протеїну RBD–eGFP показали, що антитіла проти RBD-домену протеїну S і злитого кон'югату RBD–CRM197 володіють більшими захисними властивостями, ніж

антитіла проти протеїну N. Було розроблено дослідний зразок вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого кон'югату RBD–CRM197, який має більш стабільну конформацію, ніж RBD. Слід зауважити, що протеїн N може бути введений у склад вакцини за умови появи доказів його безпечності як компонента, здатного викликати запалення і надмірну реакцію імунної системи. Випробування на тваринах довели, що дослідний зразок вакцини проти COVID19 характеризується достатньою імуногенністю, гарною місцевою переносимістю і низькою токсичністю в дозах, що застосовуються для імунізації.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Одержаний дослідний зразок вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого протеїну RBD–CRM197 не має аналогів у світі. Перша вакцина проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 виробництва Novavax (США) наразі отримує дозвіл на використання. Ця вакцина створена на основі рекомбінантних наночасток протеїну S і ад'юванту сапоніну. Більшість компаній, що розробляють вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2, використовують у їх складі протеїн S або його RBD-домен. Створений нами рекомбінантний злитий кон'югат RBD–CRM197 є достатньо імуногенним, нетоксичним, здатним викликати утворення антитіл із захисними властивостями і, на відміну від RBD, він має більш стабільну конформацію молекули. Безперечними перевагами створення вітчизняної рекомбінантної вакцини проти COVID19 із використанням одержаних продуцентів є її значно менша вартість, а також можливість регулювання обсягів виробництва та вчасного постачання в необхідній кількості населенню України, незалежно від зовнішньополітичних обставин і домовленостей.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Оскільки коронавіруси можуть зберігатись у період між епідемічними спалахами в організмі тварин, а імунітет проти них є нетривалим, то вакцини проти COVID19 у наш час стали головним фактором, який стримує розповсюдження вірусу SARS-CoV-2. Одержання рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, дослідження їх імуногенних властивостей і розроблення дослідного зразка вакцини проти COVID19 на основі злитого протеїну RBD–CRM197, ймовірно, пришвидшить появу в Україні власної рекомбінантної вакцини проти COVID19, що має важливе стратегічне значення. Враховуючи, що світова пандемія COVID19 призвела до смерті 5,2 млн. людей (в тому числі, 90 тис. українців), спричинила глибоку економічну кризу та постійно викликає заворушення у суспільстві, пов'язані з введенням карантинних обмежень, практичну цінність результатів реалізації цього Проєкту для економіки та суспільства складно переоцінити.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

Слід зазначити, що результати виконання проєкту можуть стати відправним пунктом для проведення клінічних випробувань (за наявності відповідного фінансування) і впровадження в Україні рекомбінантної вакцини проти COVID19 власного виробництва. Створені продуценти рекомбінантних протеїнів N і RBD коронавірусу SARS-CoV-2, а також злитого кон'югату RBD–CRM197 дозволяють безпечно і дешево одержувати антигенні субстанції для виробництва імунодіагностикумів і вакцин проти COVID19. Наразі у рамках Меморандуму про співробітництво між НАН України і ПрАТ «По виробництву інсулінів «Індар» щодо розробки вакцин проти COVID19 розпочато співпрацю з цією фармацевтичною компанією з метою проведення оптимізації та адаптації до умов виробництва процесів одержання і очищення рекомбінантного злитого кон'югату RBD–CRM197, а також виготовлення промислової дослідної партії вакцини проти COVID19 для подальших випробувань.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проєкту

Головний науковий співробітник, д.б.н., проф.
(посада)

Денис КОЛИБО
(Власне ім'я та ПРИЗВИЩЕ)

(підпис)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Denys Kolibo', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.