

# **Новые разработки отечественных противовирусных вакцин.**

**ФГУП «НПО «Микроген»**

**И.В. Красильников  
д.б.н., академик РАЕН**

**МИКРО****ГЕН**

## **ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА -**

*это наиболее эффективный и экономически доступный способ снижения детской смертности, увеличения ожидаемой продолжительности жизни и достижения активного долголетия во всех социальных группах развитых и развивающихся стран*

**ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**

**МИКРОХГЕН**

- ❖ **Всего 46 заболеваний контролируемых вакцинами.**
- ❖ **В мире разработано более 100 различных вакцин. (12 в 90-е годы XX столетия).**
- ❖ **Ежегодно умирает от инфекционной патологии более 12 млн. детей.**
- ❖ **4 млн. от инфекций контролируемых вакцинами.**

## Вакцины с доказанным или предполагаемым профилактическим эффектом при различной патологии

Вакцина	Патология	Эффект *)	
		I	II
Против гриппа	инсульт	19%	
	инфаркт	16-23%	
			48-50%
гепатита В	гепатокарцинома	изучается	
краснухи	ювенильный диабет	предполагается	
паротита	мужское бесплодие	предполагается	
вируса папилломы **)	рак шейки матки	предполагается	

\*) Уменьшение госпитализации (I), летальности (II)

\*\*) Проходит клинические испытания

*Вакцинопрофилактика  
дает высокий  
экономический эффект*

**Лечение больного гриппом**

**720 \$**

Предупреждение 1 случая гриппа  
при эффективности вакцинации

**80 %**

**10 \$**

**90 %**

**9 \$**

## Вакцины национального календаря профилактических прививок

- АДС и АДС-М анатоксины (дифтерийно-столбнячный)
- АД-М анатоксин (дифтерийный)
- АС анатоксин (столбнячный)
- коклюшно-дифтерийно-столбнячная (АКДС-вакцина)
- коревая, паротитная, паротитно-коревая
- гриппозные (аттенуированная интраназальная живая, инактивированная субъединичная, сплит)
- краснушная
- против гепатита В, АКДС-Геп В
- туберкулезная (БЦЖ, БЦЖ-М)



МИКРОГЕН

## Приоритетные направления развития вакцинопрофилактики и производства вакцин

- Создание новых вакцин: комбинированных; на основе молекулярного конструирования; терапевтических вакцин
- Разработка новых способов введения вакцин и новых лекарственных форм (назальные спреи, эмульсии и т.д.)
- Расширение охвата населения и увеличение объемов вакцинации в соответствии с рекомендациями ВОЗ
- Введение новых вакцин в Национальный календарь профилактических прививок

## Внедренные научные разработки вакцин

- Вакцина клещевого энцефалита «ЭнцеВир»
- Оспенная вакцина
- Краснушная вакцина
- Комплексная вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В (АКДС-Геп)
- Гриппозная виросомальная вакцина





## Научные разработки вакцин

- Вакцины против гриппа птиц аттенуированная живая и субъединичная инактивированная
- Комплексная вакцина против паротита, кори и краснухи
- Вакцина против гемофильной инфекции (Hib-инфекции)
- Вакцина стафило-протейно-синегнойная СПСА-вакцина
- Вакцина ВП-4 (St.aureus, Pr.vulgaris, Kl.pneumoniae, E.coli)
- Вакцина менингококковая группы А и С
- Бесклеточная вакцина против коклюша
- Новые адъюванты для вакцин

## Объем закупок вакцин НКПП, млн. доз

<b>Название вакцины</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>
АКДС	5,21	4,18	3,93	4,00
Коревая	2,38	1,38	1,04	1,50
Паротитная	1,98	1,03	0,70	0,42
Паротитно-коревая	2,89	2,90	2,76	3,03
АС	2,61	2,08	1,64	2,62
АДС и АДС-М	21,9	16,4	12,1	13,3
АД-М	0,76	0,74	0,56	0,24
БЦЖ и БЦЖ-М	8,69	6,72	5,24	5,26

**Все используемые до недавнего времени  
способы вакцинации были связаны с  
введением в организм вакцинируемого  
антигенов различной природы.**

**Убитые или живые аттенуированные  
вирусы или бактерии.**

**Очищенные вирусные, бактериальные,  
рекомбинантные белки.**

**Полипептиды, синтетические пептиды.**

# Стратегия конструирования вакцин нового поколения

1. Выбор адекватной мишени, способной обеспечить протективный эффект

2. Определение типа конструкции или носителя, обеспечивающих эффективную индукцию иммунитета:

- вирусные вектора

- свободная ДНК

- белок

- трансфицированные дендритные клетки

3. Выбор удобной в применении лекарственной формы:

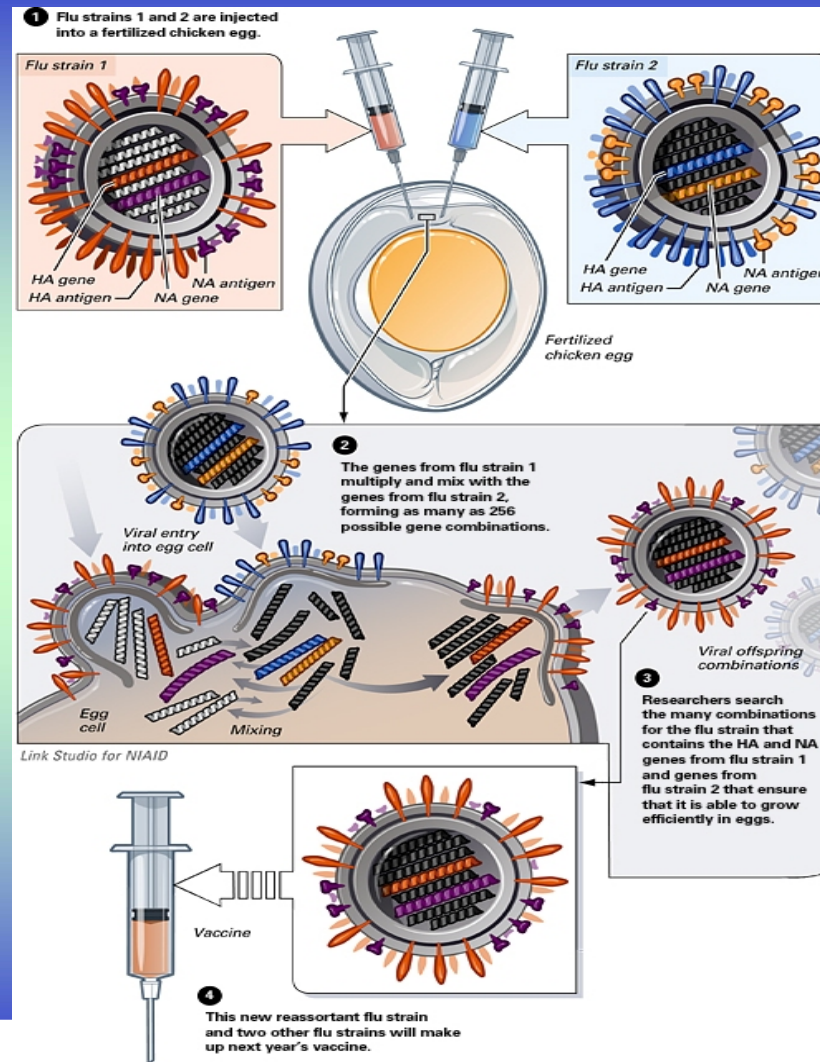
- инъекционная форма

- вагинальные суппозитории

- пероральная форма в виде бактерий, колонизирующих ЖКТ

- аэрозольная форма

# Схема получения реассортантов



# Potential advantages of LAIVs



- **no down-stream processing required (harvested vaccine is simply packaged);**
- **high yield (40-60 doses of monovalent vaccine per an egg);**
- **needle-free delivery (administration is via an intra-nasal spray), which may facilitate administration in resource-poor settings;**
- **induction of a broad immune response including mucosal, systemic and cell-mediated responses (in contrast parenterally administered inactivated vaccines do not induce mucosal immunity);**
- **induction of cross-reactive immune responses;**
- **the potential to induce a protective immune response after a single administration in naïve individuals;**
- **safety for fully susceptible seronegative individuals;**
- **poor transmissibility; and genetic and phenotypic stability.**

LAIV has a long-term (more than 30 years) successful application experience in Russia - about 60 mio children have been vaccinated.

## The intranasal H5N2 LAIV (Ultragrivak®)

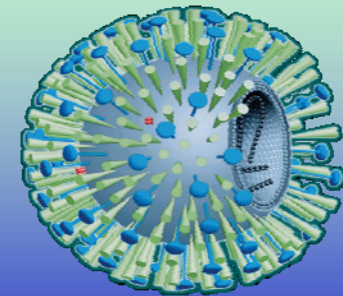
The strain is a high-growth reassortant

A/17/Duck/Potsdam/86/92 (H5N2) [Len17/H5]:

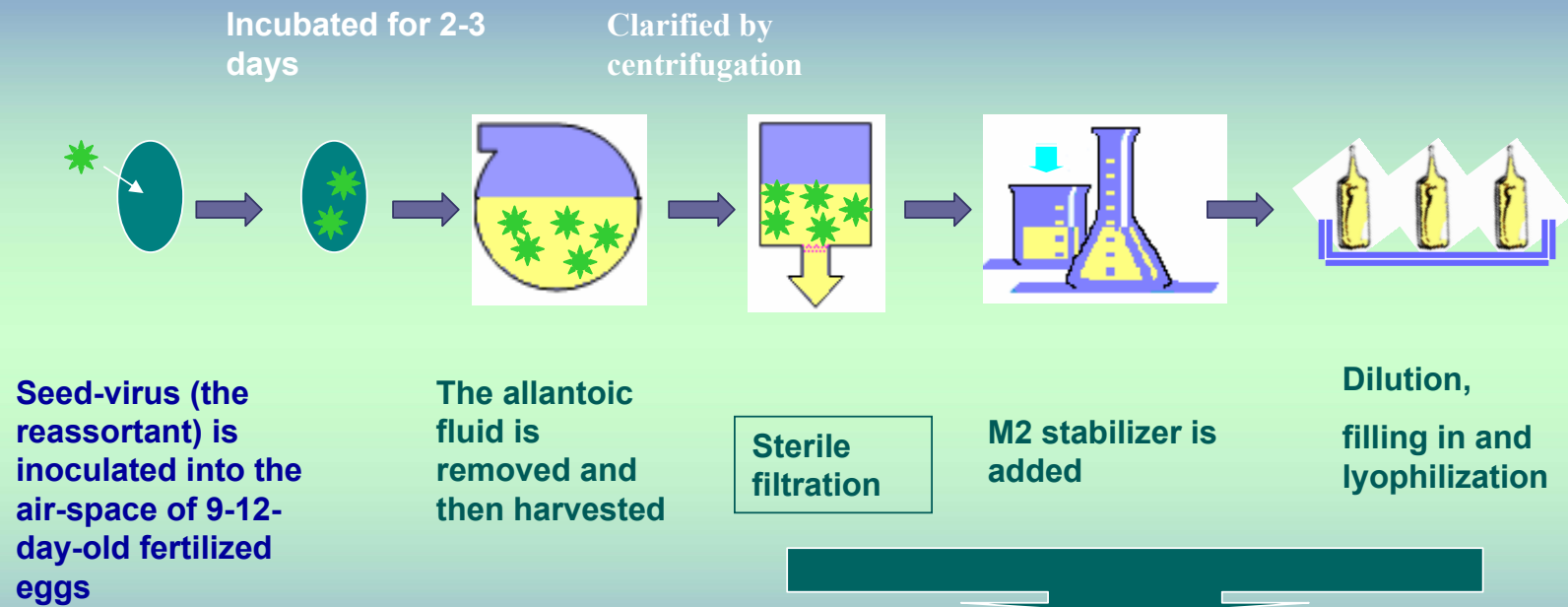
**one hemagglutinin gene from non-pathogenic  
A/Duck/Potsdam/1402-6/86 (H5N2) virus**

**7 genes from the *ca* attenuated**

**A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) strain**



# LAIIV production scheme



**No other down-stream processing is required**



# Preclinical trials

*(clinical base: Institute of Experimental Medicine (IEM) in St. Petersburg;  
Virology Center at the Microbiology Research Institute, the RF Ministry of Defense)*



## Aim

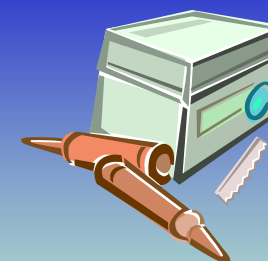
- to perform molecular genetic analysis of Len17/H5
- to investigate the reassortant antigenic properties
- to evaluate pathogenicity and safety (in white mice, chicken (Legorn) and monkeys)
- to evaluate genetic stability (in ferrets)
- to develop dosage and administration scheme (a 10 day's and 21 day's interval)

## Preclinical trial results



- **H5N1 LAIV showed genetic stability**
- **Proved safe and apathogenic for mice, Legorn chicken and monkeys**
- **Induced local and systemic immune response to both homologous virus and HPAI strains of H5N1**
- **the two-dose immunization provided protection from intranasal challenge with A/Chicken/Kurgan/Russia/2/2005 (H5N1) in 87 % cases**

# Phase I Clinical Trials



**Vaccine:** Intranasal live attenuated influenza vaccine H5N2 (Ultragrivak®)

**Manufacturer:** MICROGEN State Scientific Industrial Company, RF

**Research Aim:**

- to investigate reproduction activity, genetic stability, safety, reactogenicity and immunogenicity of H5N2 LAIV

**Study design**

- an open, prospective, randomized, controlled clinical trials in healthy adults, ages 18 to 50 (limited contingent - 20)

**Dose, Volume, Route:** 7,5 lg EID<sub>50</sub>/0,5 ml; administrated intranasally by spray 0,25 ml into each nasal track (0,5 ml dose).

**Procedures:**

- a 2-dose schedule with a 21 day's interval

**Clinical base:**

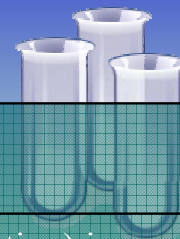
- Virology Center at the Microbiology Research Institute, the RF Ministry of Defence

**The study inclusion criteria for volunteers:**

- to be seronegative for the influenza A/H5N2 virus with the Ab titre < 1:10 in HAI and MN; and
- to sign Volunteer Informed Consent.

**The exclusion criteria:** standard for influenza vaccine clinical trials.

# Immunogenicity profile of H5N2 LAIV in ELISA (Phase I)



Immunogenicity criteria	Vaccination #	% of participants	
		Specific IgG,	Local (nasal secretion) immune response, IgA
SC or 4-fold titre increase, %	V1	60	30
	V2	95	65
GMT	V1	5,2	10
	V2	5,5	16
GMT post-to-pre ratio	V1	1,1	1,7
	V2	1,2	2,8

## Immunogenicity profile of H5N2 LAIV in HA after V2 (Phase I)



Serocoverision, %	GMT		GMT post-to-pre ratio
	Before vaccination	After second vaccination	
47	5,6	15,7	2,8

# Phase II Clinical Trials



**Vaccine:** Intranasal live attenuated influenza vaccine H5N2 (Ultragrivak®)

**Manufacturer:** MICROGEN State Scientific Industrial Company, RF

**Research Aim:**

- to investigate safety, reactogenicity and immunogenicity of H5N2 LAIV

**Study design**

- a single blind, comparative, randomized, controlled clinical trials in 200 healthy adults, ages 18 to 60

**Dose, Volume, Route:** 7,5 lg EID<sub>50</sub>/0,5 ml; administrated intranasally by spray 0,25 ml into each nasal track (0,5 ml dose).

**Procedures:**

- a 2-dose schedule with a 10 and 21 day's interval

**Clinical base:**

- Military Hospital N 1137, FGUS # 163, SES of Russia.

**The study inclusion criteria for volunteers:**

- to be seronegative for the influenza A/H5N2 virus with the Ab titre < 1:10 in HAI and MN; and
- to sign Volunteer Informed Consent.

**The exclusion criteria:** standard for influenza vaccine clinical trials.

## Immunogenicity profile of H5N2 LAIV in HAI Phase II

Immunogenicity criteria	10 day's interval				21 day's interval			
	Ultragrivac		Placebo		Ultragrivac		Placebo	
	Day 10	Day 31	Day 10	Day 31	Day 21	Day 42	Day 21	Day 42
SC or 4-fold titre increase, %	<b>58,9</b>	<b>74,3</b>	13,6	0	<b>52,4</b>	<b>71,9</b>	0	5,6
GMT	19	29,6	3,3	3,3	16	28,7	2,2	2,4
GMT post-to-pre ratio	<b>3,1</b>	<b>4,9</b>	1,1	1,1	<b>2,9</b>	<b>5,2</b>	1	1,1

# Potential cross-reactive immunogenicity of H5N2 LAIV in HAI



## To A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)

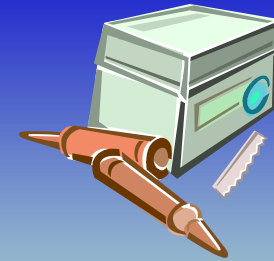
	10 day's interval		21 day's interval	
	Day 10	Day 31	Day 21	Day 42
SC or 4-fold titre increase, %	51,3	74,4	30,5	51,2
GMT	15,5	25,9	10,6	15,8
GMT post-to-pre ratio	2,8	4,7	2	2,9

## To A/Indonesia/5/2005 (H5N1)

SC or 4-fold titre increase, %	64,1	71,8	42,7	59,8
GMT	17	24	12,8	18,7
GMT post-to-pre ratio	3,1	4,4	2,9	3,5



# Summary



- **H5N2 LAIV showed genetic stability and proved safe and apathogenic in study in animals.**
- **Phase I and II clinical trials demonstrated areactogenicity and immunogenicity of H5N2 LAIV (Ultragrivak®)**
- **Cross-protective effect to HPAI strains (A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) and A/Indonesia/5/2005 (H5N1) was confirmed in clinical trails.**
- **Our results suggest a new strategy (a 2-dose schedule with a 10 day's interval) of using Ultragrivak® as a pre-pandemic vaccine.**

## Morphological analyses of Grifor®

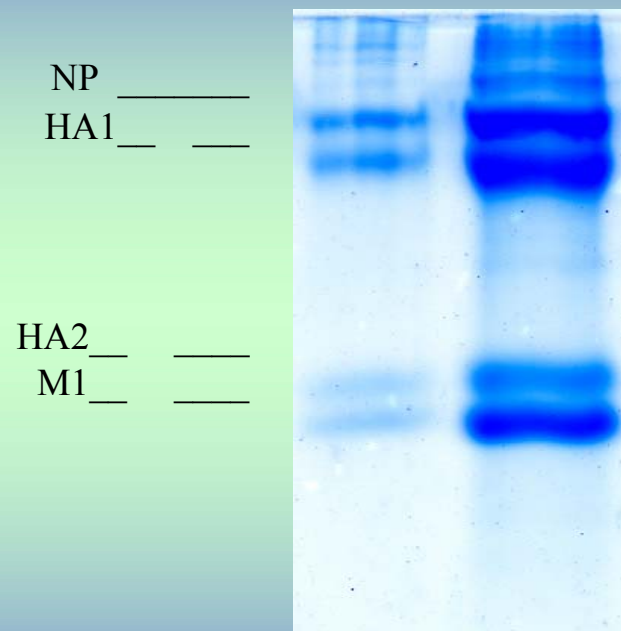


**Method:** negative phase contrast microscopy

### **Detections:**

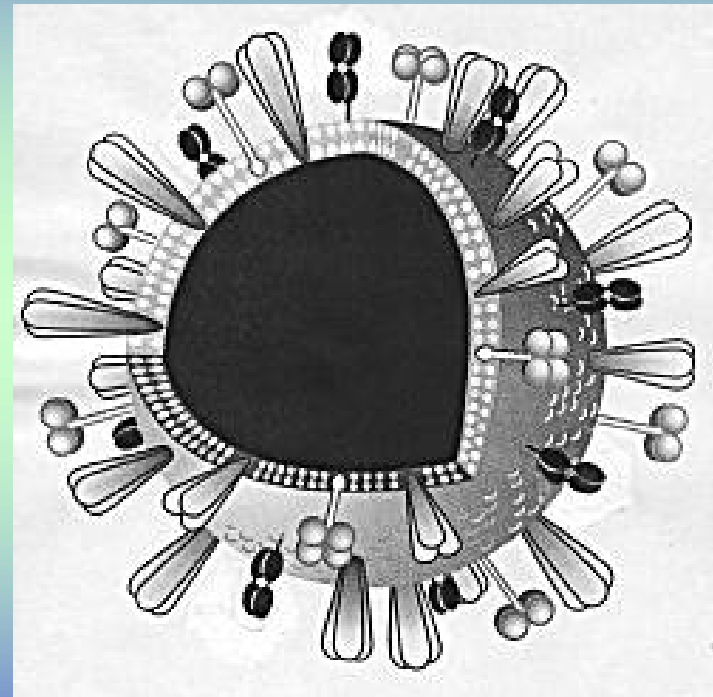
- virosoms sized from 100 to 300 nm (HA and NM of type A(H1N1 and H3N2) and type B strains
- micelles (M1)

# SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS of Grifor®



# Split IIV Grifor® - is the first home-produced vaccine in Russia based on virosomes

The influenza virus surface glycoprotein HA guides the virosomes specifically to antigen-presenting cells and leads to fusion with their endosomal membrane. This process provides optimal processing and presentation of the antigens to immunocompetent cells. The T lymphocytes are activated to produce cytokines, which in turn stimulate the B lymphocytes to form large amounts of specific antibodies. The stimulation of B lymphocytes also occurs through direct contact with the antigen-virosome complex.



## Preclinical trials

The study in animals showed that:

- The vaccine candidate did not produced toxic effects and marked local reactions in white mice, guinea pigs and rabbits; it did not provoke marked changes in organs and systems of laboratory animals and proved safe and areactogenic.
- Immunological assay showed that, compared to Vaxigrip®, Grifor® induced Abs in the same titre with a small variations depending on the virus serotype.

**Thus, the preclinical study results demonstrated safety and effectiveness of the vaccine candidate.**

# Phase I Clinical Trials

**Vaccine:** Split inactivated influenza vaccine Grifor®

**Manufacturer:** MICROGEN State Scientific Industrial Company, RF

**Research Aim:**

- to evaluate safety, reactogenicity and immunogenicity of Grifor® vaccine candidate

**Study design**

- An open, prospective, randomized, placebo-controlled clinical trials in healthy adults, ages 18 - 50 (limited contingent)

**Dose, Volume, Route:** 45 µg HA (15 µg of HA of the influenza A (H1N1), A (H3N2) and B strains) in 0.5 ml; given intramuscular

**Procedures:**

- 1 IM dose of the vaccine or placebo

**Clinical base:**

- Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

# Phase I Clinical Trials. Results.

## Safety

After vaccination with Grifor® there were no detections of undue reactions in post-vaccination period. Slightly shaped general ( $6,92 \pm 3,91$ ) and local reactions ( $12,73 \pm 6,47$ ) were a short period and did not much influence a good state of health of the vaccinated volunteers, which proves safety of the vaccine.

## Immunogenicity

Grifor (n=20)			HAI assay			Placebo (n=20)		
SP (Ab titer, $\geq 1:40$ ) (%)	4-fold rise SC (%)	GMT	GMT ratio (post:pre)	Strain	GMT ratio (post:pre)	SP (Ab titer, $\geq 1:40$ ) (%)	4-fold rise SC (%)	GMT
95	55	1:380	3,8	A (H1N1)	1,0	80	0	1:86
90	50	1:117	3,5	A (H3N2)	1,0	60	5	1:32
100	45	1:144	2,7	B	0,9	85	0	1:46

Thus, all CPMP EMEA requirements for influenza vaccine efficacy were met.

# Phase II Clinical Trials

## Research Aim:

- to evaluate dose related safety, reactogenicity and immunogenicity of Grifor® vaccine candidate and compare it with Vaxigrip®, France

## Clinical base:

- Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, RF
- Research Institute of Influenza RAMS, St. Petersburg, RF

## Study design

- A blind, comparative, prospective, randomized multicentre clinical trials in healthy adults (men and women), ages 18 – 60.
- Number of participants: **300** (150 in each clinical base)

**Group 1 (n=50)** received Grifor® with 45 µg of HA in 0.5 ml dose (15 µg of HA of the influenza A (H1N1), A (H3N2) and B virus strains)

**Group 2 (n=50)** received Grifor® with 35 µg of HA in 0.5 ml dose (10 µg of HA of the influenza A (H1N1) and A (H3N2) virus strains and 15 µg of HA of the influenza B virus strain)

**Group 3 (n=50)**, received Vaxigrip®, with 45 µg of HA in 0.5 ml dose (15 µg of HA of the influenza A (H1N1), A (H3N2) and B virus strains)

## Procedures:

- 1 IM dose of the vaccines



## Antigenic activity of the vaccines in HAI on Day 21 and 180

Vaccine	Antigen	4-fold rise SC %		SP (Ab titer, $\geq 1:40$ ) %		GMT			GMT ratio (post:pre)	
		Day 21	Day 180	Day 21	Day 180	Day 0	Day 21	Day 180	0-21	0-180
Grifor 35 $\mu$ g	A (H1N1)	83	78	100	97	22	359	249	16,3	11,3
	A (H3N2)	89	75	97	86	11	183	111	16,6	10,1
	B	94	94	94	75	7	95	64	13,0	8,7
Grifor 45 $\mu$ g	A (H1N1)	90	87	97	96	20	358	250	18,3	12,8
	A (H3N2)	97	74	97	87	14	250	128	17,5	8,9
	B	90	84	90	77	10	100	61	10,0	6,1
Vaxigrip 45 $\mu$ g	A (H1N1)	94	86	100	86	22	339	210	15,7	9,7
	A (H3N2)	97	72	99	81	14	163	86	11,3	6,0
	B	97	72	98	75	12	154	86	12,7	7,1

# Conclusions

A single dose of Grifor® both with 35 and 45 µg of HA induces immunogenicity rates that correspond to CPMP EMEA, CPMP/EWP/1045/01 demands for routine seasonal influenza vaccines.

In terms of immunogenicity criteria Grifor® is proved to be not inferior to Vaxigrip® and even better as a lower dose of antigens has induced longer immune response in the vaccinees.

The vaccine candidate containing 35 µg of the antigens per a dose is considered an optimal formulation that demonstrates a good immune response while limiting reactogenicity.

**Thus, experimental clinical evidences have been obtained that prove advantages of the vaccines based on virus-like nanoparticles - virosomes - compared to traditional split vaccines.**

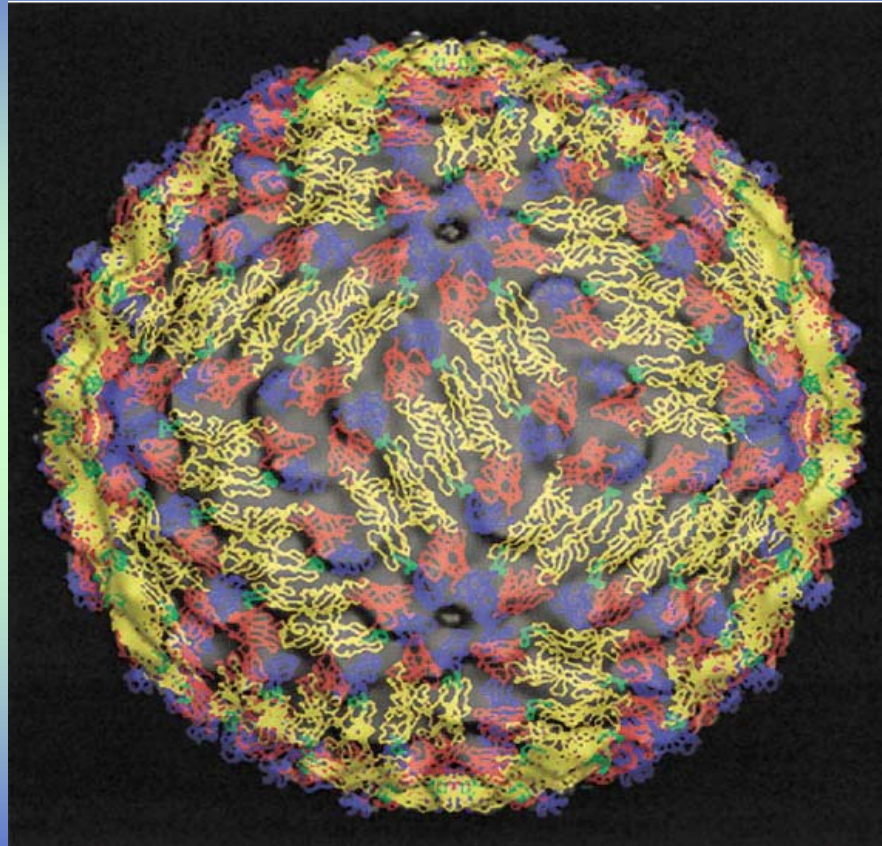
**ВАКЦИНЫ**  
**ФГУП «НПО «МИКРОГЕН»**,

не входящие в национальный календарь прививок

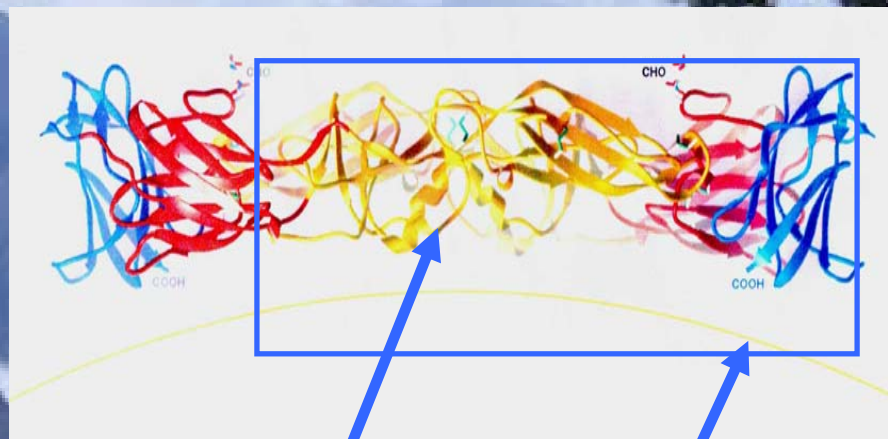
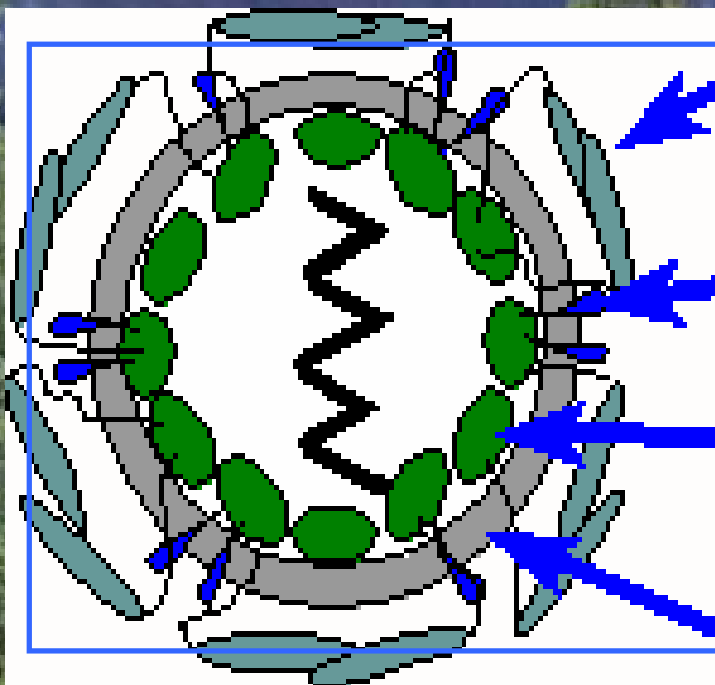
- **ЭНЦЕВИР**

- **контролируемое содержание антигена**
- **высокая степень очистки**
- **на основе отечественных штаммов**

# Структура поверхности флавивирусов (на примере вируса КЭ)



## Строение вирионов вируса КЭ



Белок Е

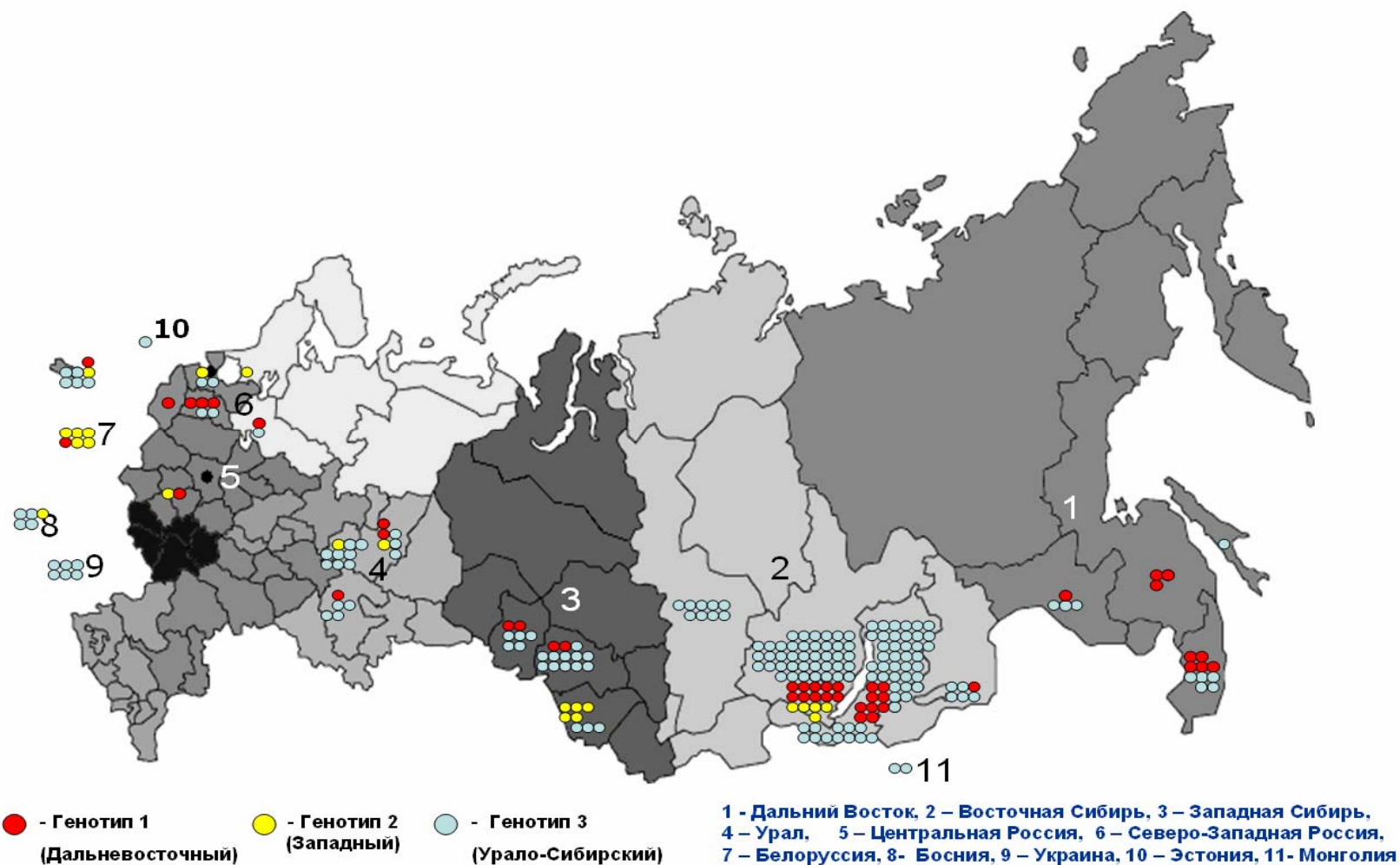
Белок М

Белок С

Мембрана

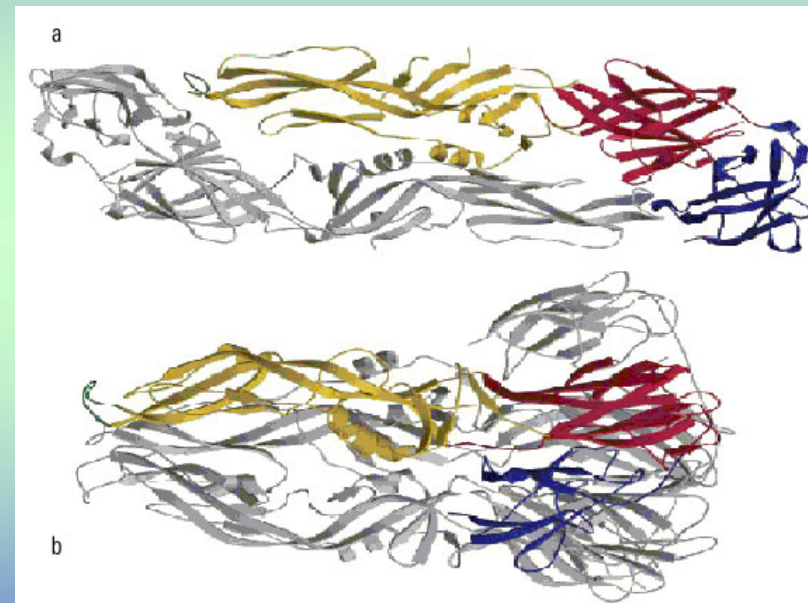


# РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА КЭ В РОССИИ (М.М.Верхозина)



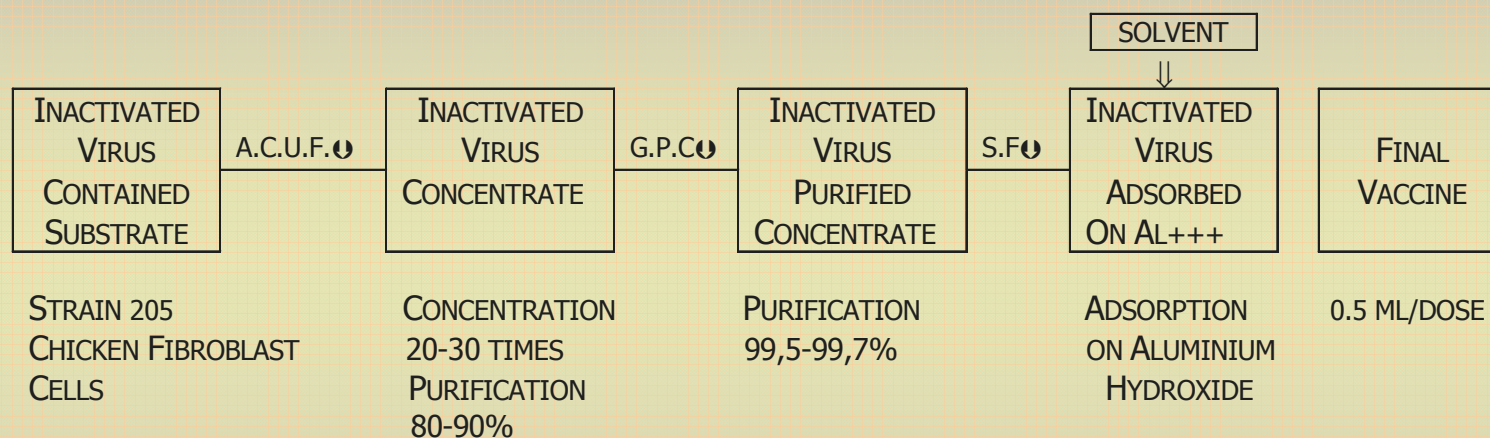


# Конформационные изменения белка E





## VACCINE PRODUCTION

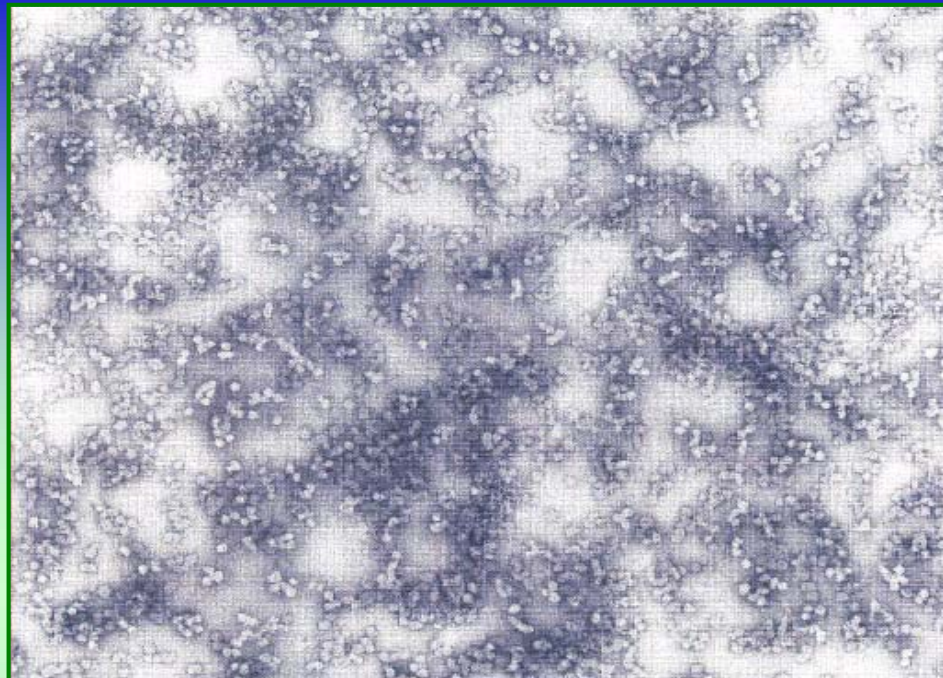


A.C. ADSORPTION CHROMATOGRAPHY ON MACRO POROUS SILICA

U.F. ULTRA FILTRATION ON TRACK MEMBRANES

G.P.C. GEL PERMEATED CHROMATOGRAPHY

S.F. STERILIZED FILTRATION (0.22 MK)



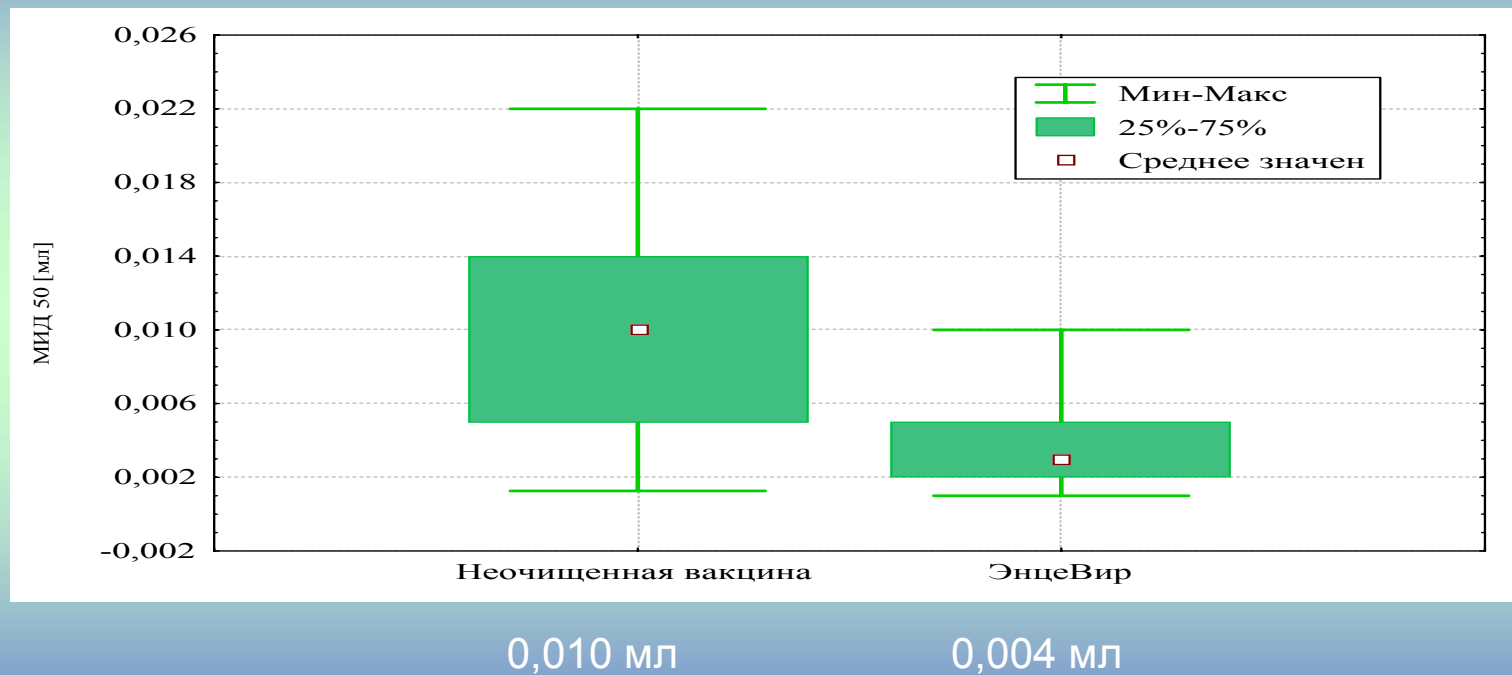
### EXPERIMENTAL LOTS OF TBE-VACCINE

№ TECHNOLOGY LOT	IMMUNOGENITY	CHICKEN PROTEIN	OVALBUMIN	PROTEIN	REACTOGENITY
	MID 50	MKG/ML	MKG/ML	MKG/ML	MICE/G.P.
5. A.C+G.P.C	0,0030	= 0,05	= 0,01	3,5	NO/NO
6. A.C+G.P.C	0,0021	= 0,005	= 0,01	4,3	NO/NO
7. A.C+G.P.C	0,0014	= 1,0	= 0,01	3,2	NO/NO
9. U.F.+G.P.C	0,0018	= 0,5	= 0,01	3,7	NO/NO
10. U.F.+G.P.C	0,0015	= 0,5	= 0,01	5,1	NO/NO
11. U.F.+G.P.C	0,0023	= 0,5	= 0,01	4,9	NO/NO
12. U.F.+G.P.C	0,0017	= 0,5	= 0,01	3,8	NO/NO

## Результаты определения содержания гликопротеина Е в вакцине «ЭнцеВир»

- Высокая точность анализа по определению концентрации гликопротеина Е (gpE) в вакцине, превосходящая точность определения минимальной иммунизирующей дозы
- Наличие корреляции средней степени между концентрацией gpE и иммуногенной активностью вакцины
- Среднее содержание gpE - 5 мкг на дозу вакцины

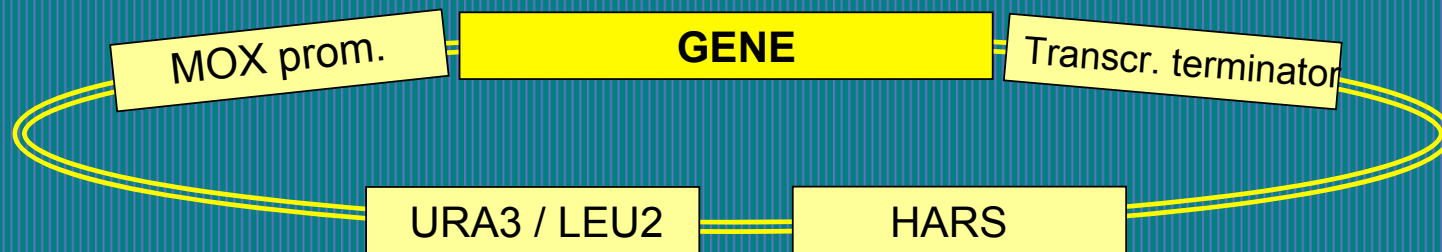
Иммуногенная активность вакцины клещевого энцефалита культуральной инактивированной и вакцины «ЭнцеВир» при определении минимальной иммунизирующей дозы (МИД50).



## Таблица соответствия вакцины «ЭнцеВир» некоторым требованиям ВОЗ и НОК

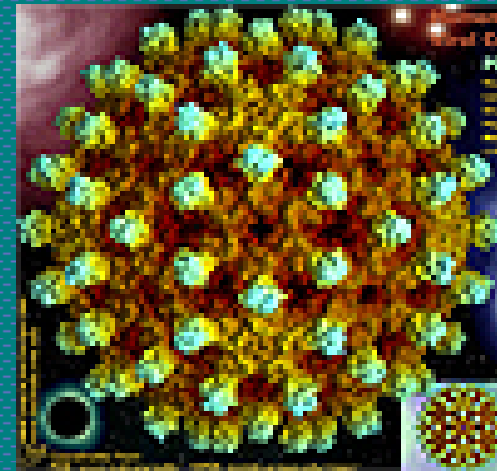
Наименование показателя	Требования ВОЗ и НОК	Вакцина «ЭнцеВир»
Иммуногенность вакцины	Содержание не менее 40 МИД в 1 дозе вакцины	Соответствует в дозе (0,5 мл)
Содержание формальдегида в вакцине	Не более 200 мкг/мл, рекомендовано полное удаление	Отсутствует
Содержание антибиотиков в вакцине	Канамицин $\leq 150$ мкг/мл, рекомендовано полное отсутствие	Отсутствует
Содержание белков куриного эмбриона	Рекомендовано $< 1,0$ мкг/мл	$< 0,5$ мкг/доза
Присутствие консервантов	Допускается разрешенные НОК	Отсутствуют
Общий белок без учета стабилизатора	$\leq 65$ мкг/доза для взрослых, $\leq 35$ мкг/доза для детей	$11,3 \pm 3,4$ мкг/доза

# Vectors for expression



# Hepatitis B

- ~2 billion people with history of HBV infection worldwide;
- ~350 million people chronically infected;
- 1-2 million deaths/year;
- 25% of all carriers develop liver cirrhosis or cancer.

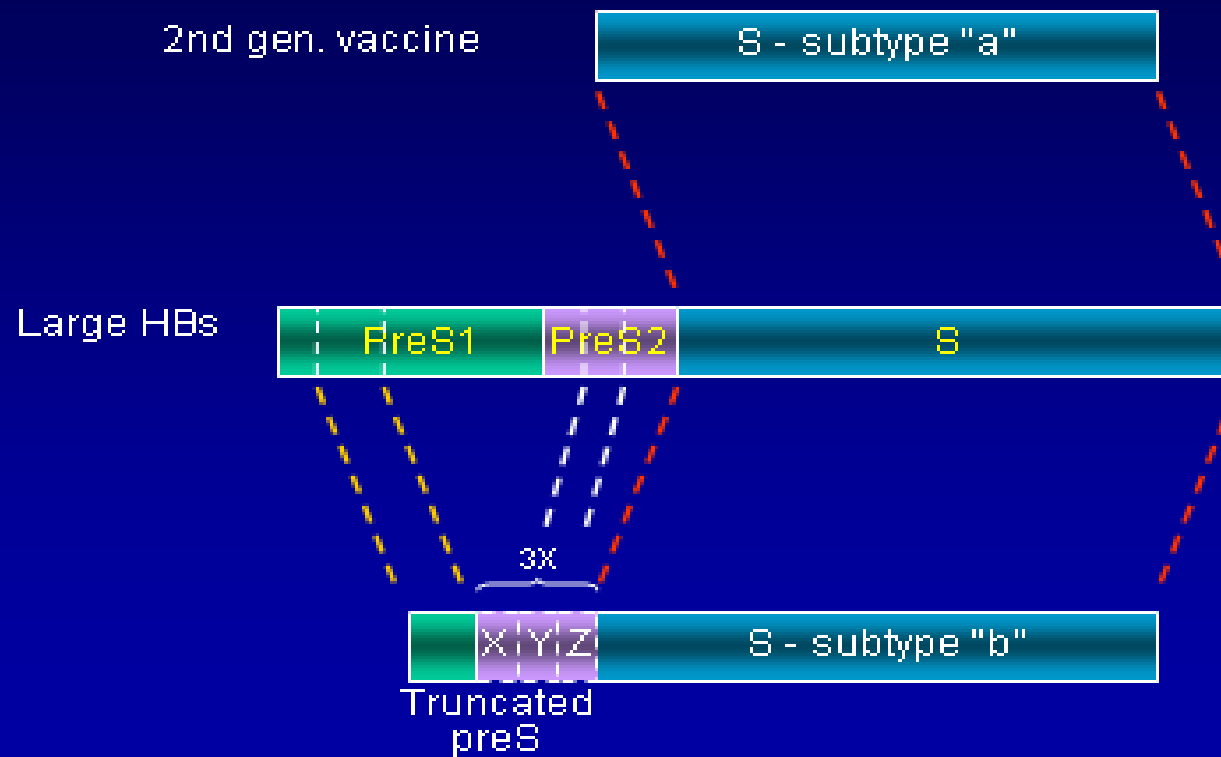


# Hepatitis B vaccines

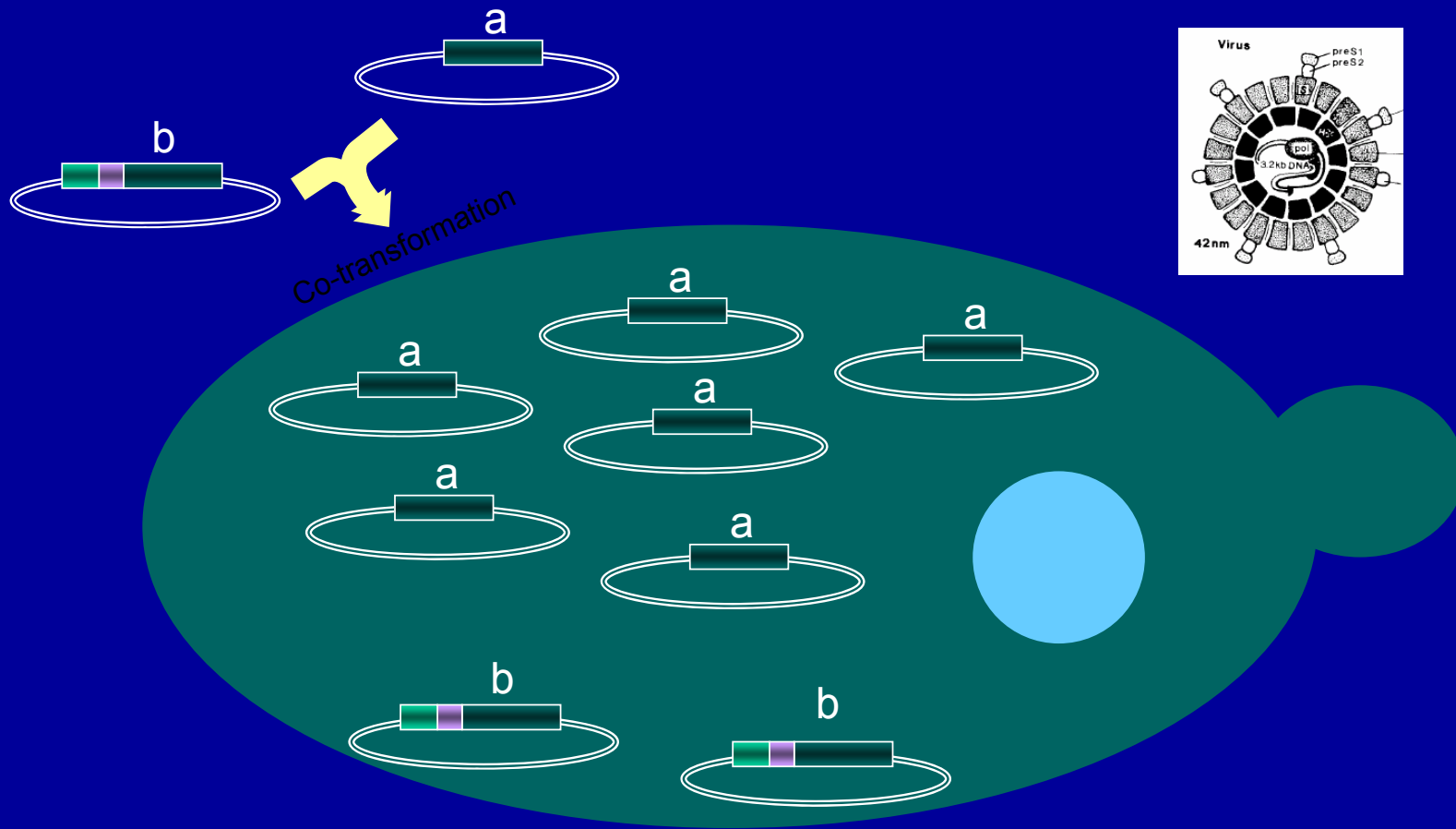
- First generation: antigen from infected patients
- Second generation (current vaccine): yeast-derived recombinant small HBs antigen  
~ 15% of healthy people do not respond properly  
*Zuckerman et al. (1997). Br. Med. J. 314, 329.*
- Third generation: combination of HBs antigens (small and medium or large)



# S and preS-S antigens



# S and preS-S antigens design



# S/preS-S features

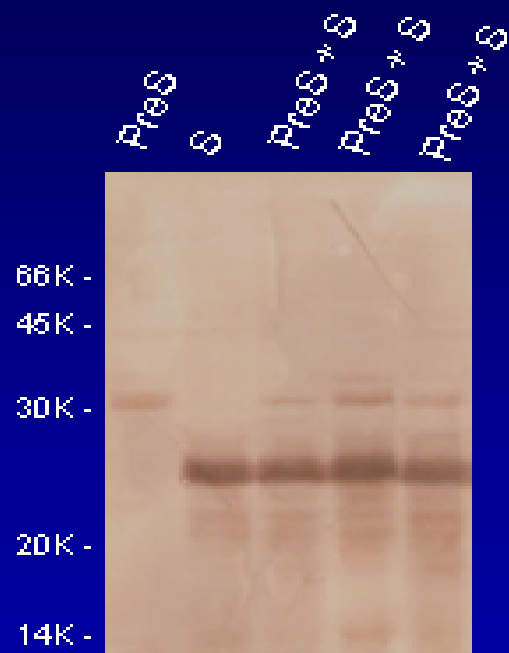
## HBV variants:

- 7 genotypes
- Escape mutants (sHBs)

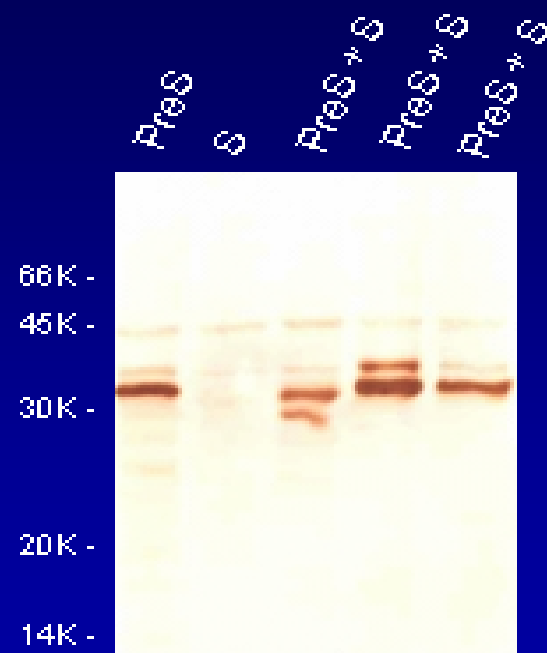
## Advantages of the new construct:

- 2 different genotypes of S
- Addition of preS1 (1 different) and preS2 (3 different genotypes) neutralization epitopes
- Higher Ab titers
- Earlier immune response
- Low cost compared to mammalian-expressed preS-S antigen

# Immunoblotting



Anti-S antibody

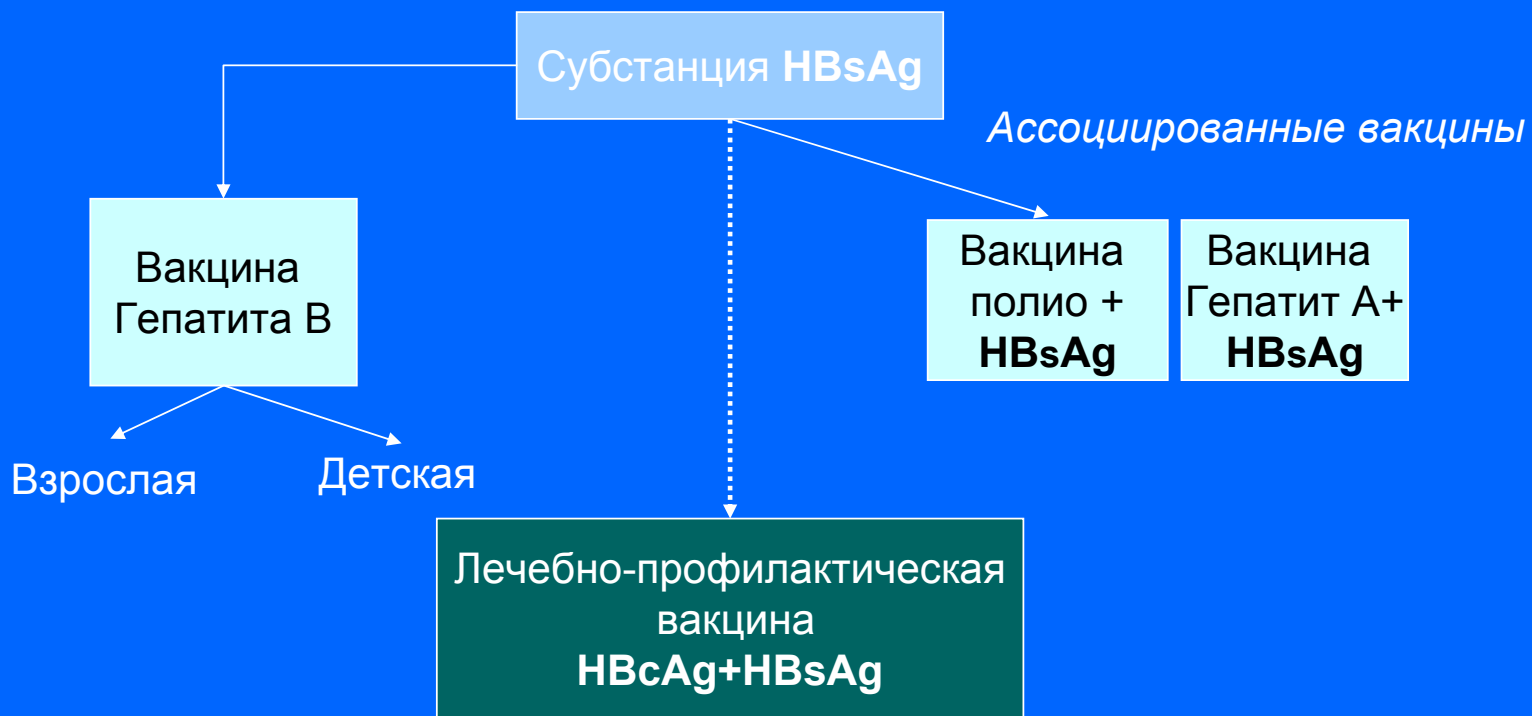


Anti-preS2 antibody

# Summary

- PreS-S antigen obtained
- Antigenicity of S, preS1 and 2 confirmed by Western blot.
- Antibodies against S, preS1 and preS2 elicited in mice immunized with hybrid S/preS-S.

# Развитие производства вакцин на основе HBsAg



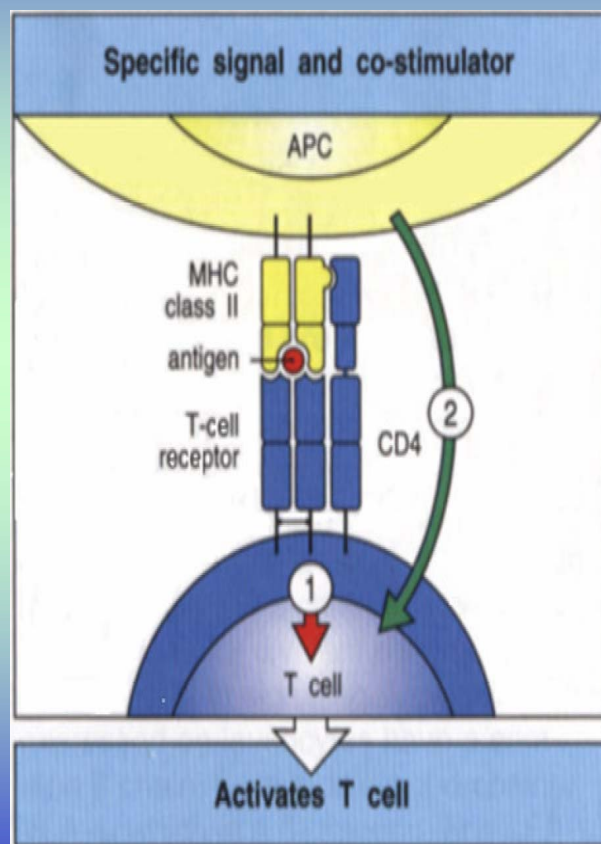
## Разработка новых адъювантов для вакцин

Адъюванты (от латинского «adjuvare» - помогать) – это вещества, компоненты вакцин, проявляющие иммуностимулирующую активность.

Адъюванты используют чтобы:

- увеличить иммуногенность «слабых» антигенов,
- увеличить скорость и продолжительность иммунного ответа у привитых,
- стимулировать клеточный иммунитет,
- индуцировать защитные свойства слизистых оболочек,
- уменьшить дозу антигена в вакцине,
- увеличить иммунный ответ у детей и лиц пожилого возраста,
- предотвращать конкуренцию антигенов в комбинированных вакцинах.

# Двухсигнальная модель: для активации наивных Т-клеток требуется наличие двух независимых сигналов



- **Сигнал 1** – инициирующий сигнал, вызванный взаимодействием антигенного пептида и ТКР-CD3 комплекса.
- **Сигнал 2** – последующий антиген-неспецифичный сигнал, обеспечивается взаимодействием между молекулами B7 (на профессиональной АПК) и CD28 на Т-клетке.
- **Сигнал 0** – распознавание чужих микробных/вирусных консервативных последовательностей.
- **Сигналы опасности** – сигналы, вызванные повреждением тканей организма.

Janeway, Travers, Walport, Copra (1999); Schijns (2000); Goldsby et al. (2002)

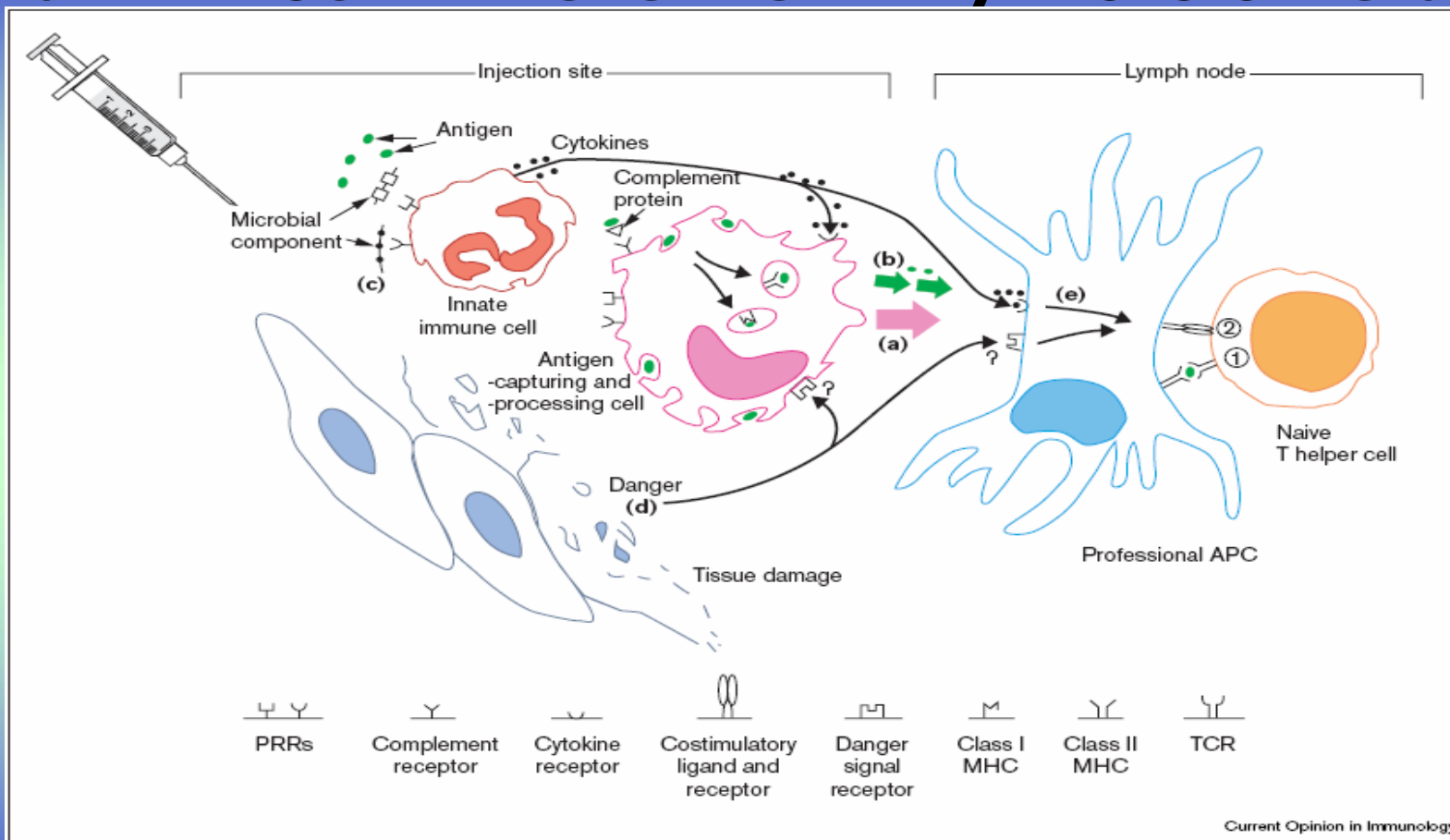


# Классификация адъювантов на основе индуцируемых ими иммунологических событий (Schijns, 2000)

Группа	Принцип действия	Пример адъювантов	Ключевые события
<b>a</b>	Усиление захвата, транспорта и презентации антигена клетками АПК (системы доставки)	ИСКОМы, Quil A, Al(OH) <sub>3</sub> , липосомы, ПЛГ	Локализация антигена в лимфатическом узле
<b>b</b>	Депозит-эффект	Эмульсии, Al(OH) <sub>3</sub> (?*), гели, полимерные микросферы, неионные блок-сополимеры	Продолжительная презентация антигена
<b>c</b>	Сигнал 0	Комплемент, CpG, LPS, MDP, дрожжевой экстракт, холерный токсин, ИСКОМы(?)	Сигналинг через патоген-распознающие рецепторы клеток врожденного иммунитета
<b>d</b>	Сигнал опасности	Эмульсии с поверхностно локализованным антигеном, Al(OH) <sub>3</sub> , ИФ, белки теплового шока, гипоксия и др.	Повреждение тканей/стресс
<b>e</b>	Рекомбинантный сигнал 2	Цитокины, ко-стимуляторные молекулы	Поляризация АПК, помощь в активации Т- и В-клеток

\*Flarend RE, Hem SL, White JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, Dandashli EA: *In vivo* absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26AL. *Vaccine* 1997.

# Важнейшие этапы развития адъювантной активности в течение иммунного ответа



Обозначения а, b, с, d, е как на предыдущем слайде (Schijns, 2000)

МИКРОГЕН

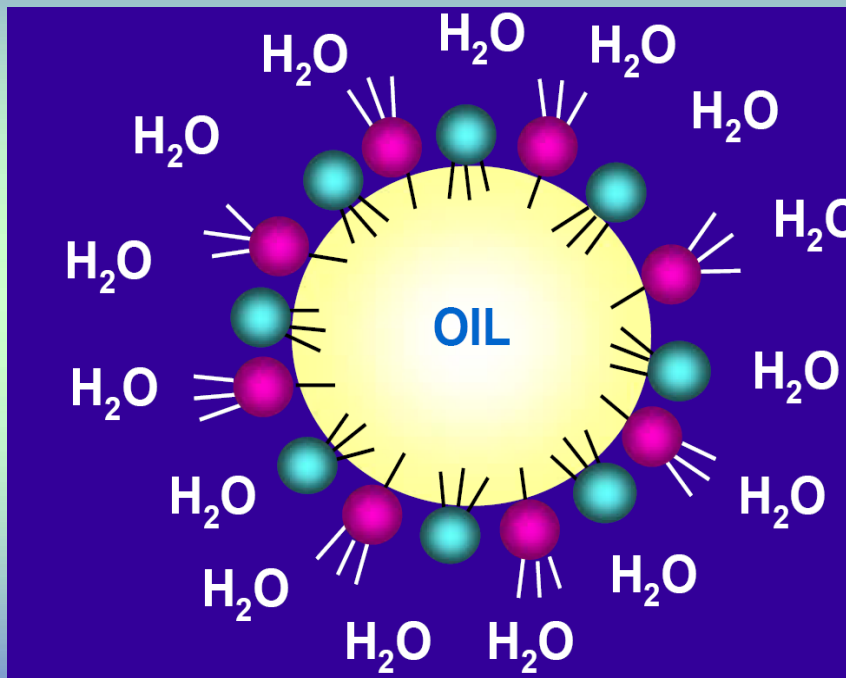
## Адъюванты на основе солей алюминия

- Адсорбция антигена на гидроокиси/фосфате алюминия – наиболее общий принцип создания вакцин для человека и животных;
- Безопасны;
- Применяются уже более 60 лет;
- Обеспечивают кратковременный «депо-эффект» путем связывания антигена с помощью электростатических взаимодействий;
- Вызывают иммунный ответ Th2 типа.

## Эмульсии

- Первый адъювант на основе эмульсии – **адъювант Френда** (полный - состоит из убитых микобактерий, эмульгатора и биodeградируемого масла, неполный не содержит микобактерии); используется только в вакцинах против рака и СПИДа, т.к. достаточно токсичен
- **Синтетический адъювант (SAF)** – был получен в 1980х из сквалана, однако также отличается высокой токсичностью;
- **MF59** – масловодный адъювант, безопасный и более мощный, чем соли алюминия.

# MF59 – масловодный (oil-in-water) адьювант



## Состав:

0.5% Полисорбат 80 (твин-80)  
- водорастворимый  
сурфактант;

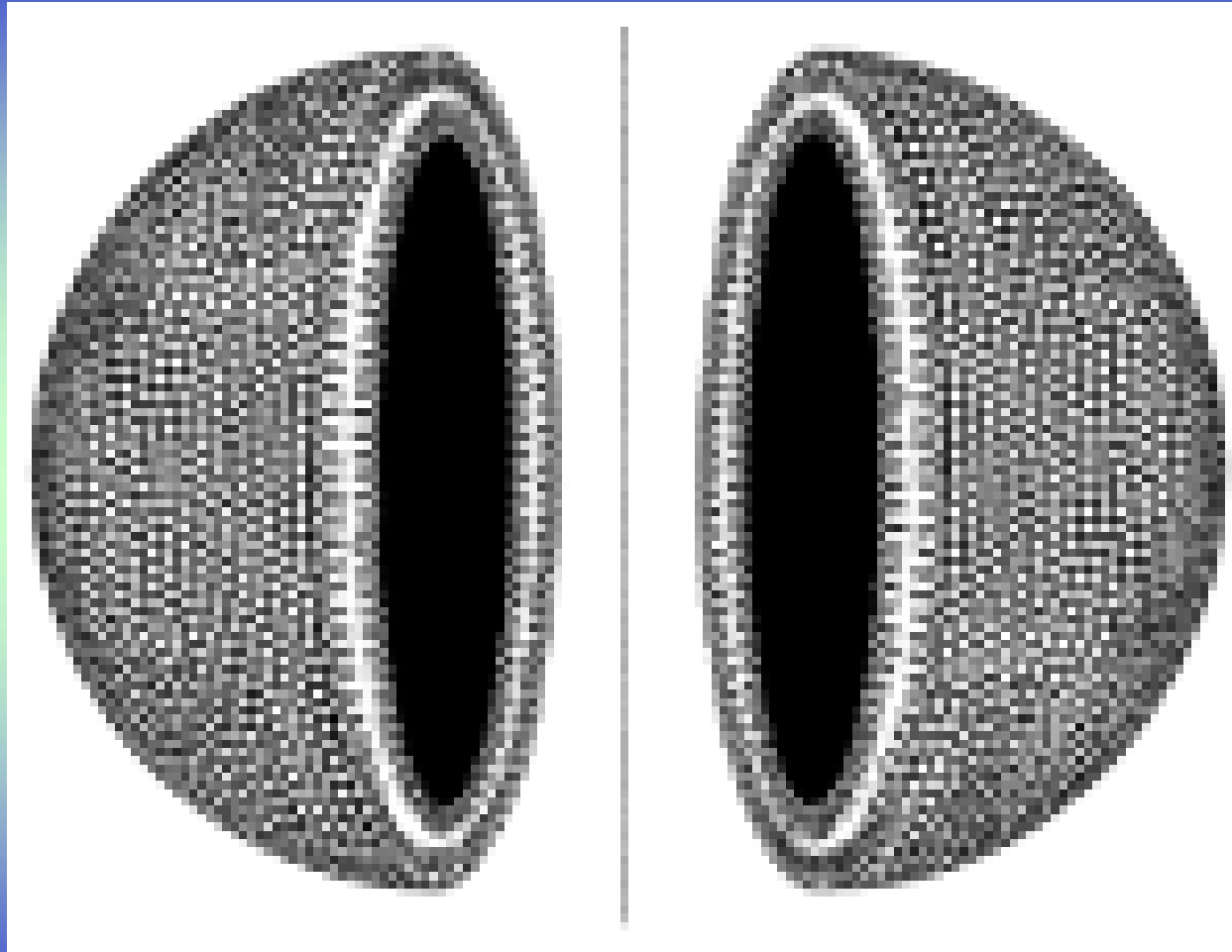
0.5% Сорбит Триолеат -  
жирорастворимый  
сурфактант;

4.3% Сквален (масло);

Вода для инъекций;

10 нМ Na-цитратный буфер.

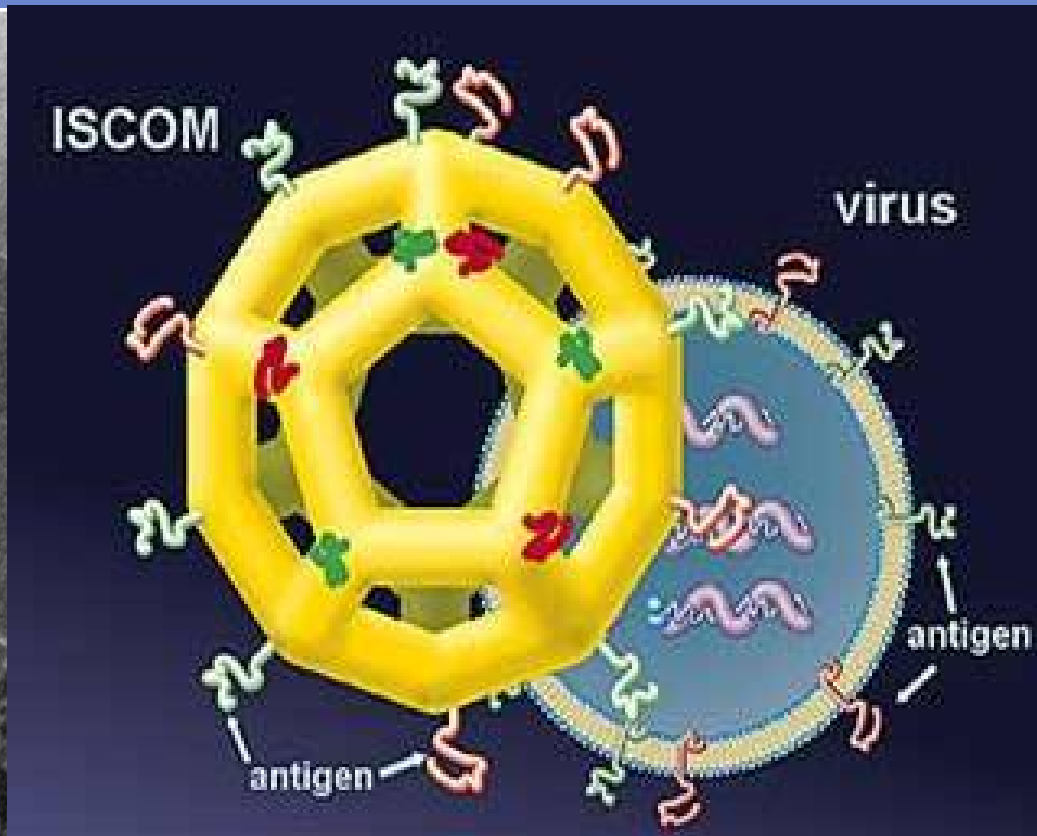
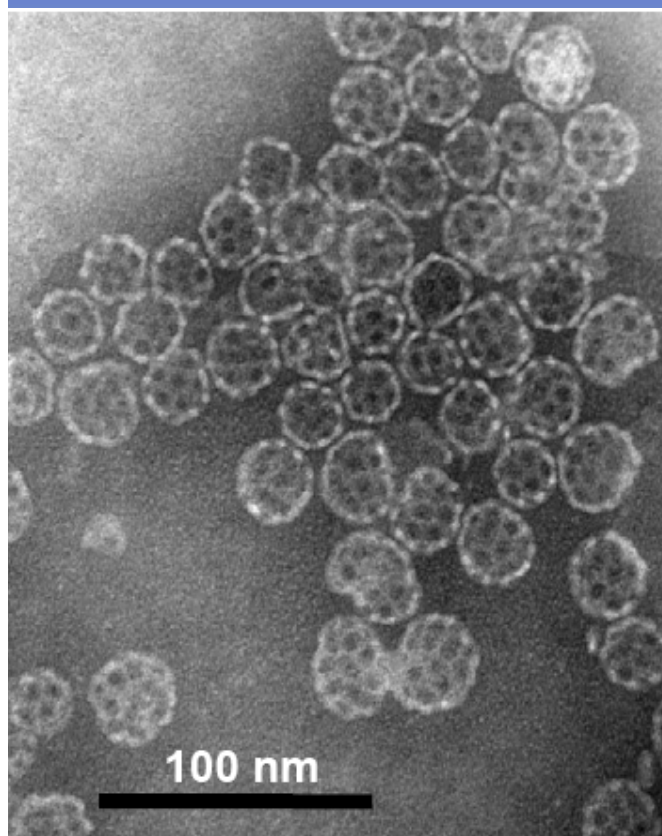
# Липосомы



# Липосомы

- Представляют собой фосфолипидные везикулы, используемые для доставки активных веществ в клетки.
- При создании **липосом** используется нейтральный липид **фосфатидил холин** с различными ацильными остатками. Для увеличения стабильности и жесткости липидной мембраны часто добавляют холестерин.
- Для увеличения длительности пребывания в организме используют ПЭГирированные липосомы, защищенные от воздействия ретикуло-эндотелиальной системы.
- Иногда **липосомы** используют вместе с другими адъювантами, например, monophosphoryl lipid A (MPL).
  - **Липосомальная** вакцина Stimuvax® (Merck) против немелкоклеточного рака легких, содержащая синтетический пептид MUC1, проходит III стадию клинических испытаний
  - Разработкой липосомальных вакцин также занимается фирма Lipoxen (Великобритания).

# ИСКОМЫ (иммуностимулирующие комплексы)



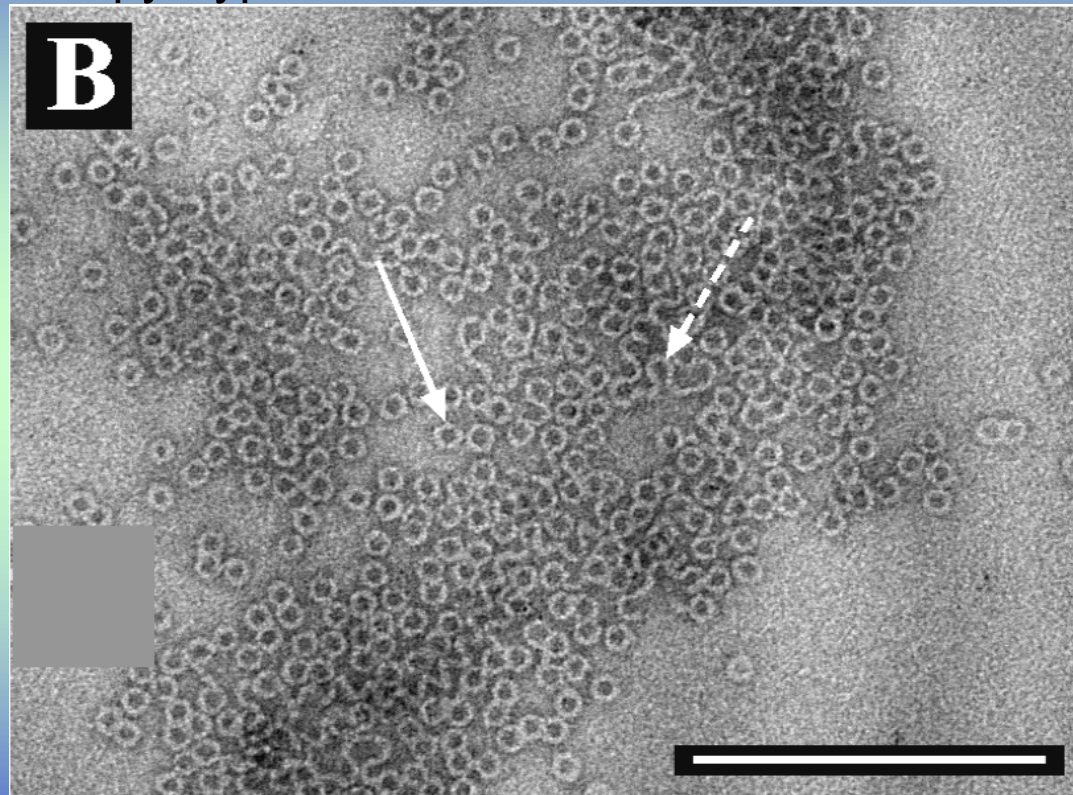


# ИСКОМы (иммуностимулирующие комплексы)

- **ИСКОМы** состоят из сапонины (Quil A) и антигенов в составе липидной мембраны содержащей холестерин и фосфолипиды. Средний размер ИСКОМов – 40 нм. Молекула ИСКОМа состоит из ~20 кольцеобразных субъединиц и имеет поверхностный отрицательный заряд при физиологическом pH.
- Показано, что **ИСКОМы** вызывают синтез цитокинов, например ИЛ-12 и ИФ-γ.
- **ИСКОМы** индуцируют пролиферативный ответ против антигенов цитомегаловируса, вируса гриппа, вируса Эпштейна-Барр, ВИЧ.
  - *В лаборатории Костецкого Э.Я. заменили токсичный Quil A на биологически активные гликолипиды и сапонины из морских гидробионтов, таких как моногалактозил диацилглицерид. Полученные частицы повторяли морфологию классических **ИСКОМов**.*
  - *В клинических исследованиях Sjölander S. и коллег было показано, что гриппозная **ИСКОМ**-вакцина способна вызывать у пациентов цитотоксический Т-клеточный ответ.*

# ИСКОМЫ

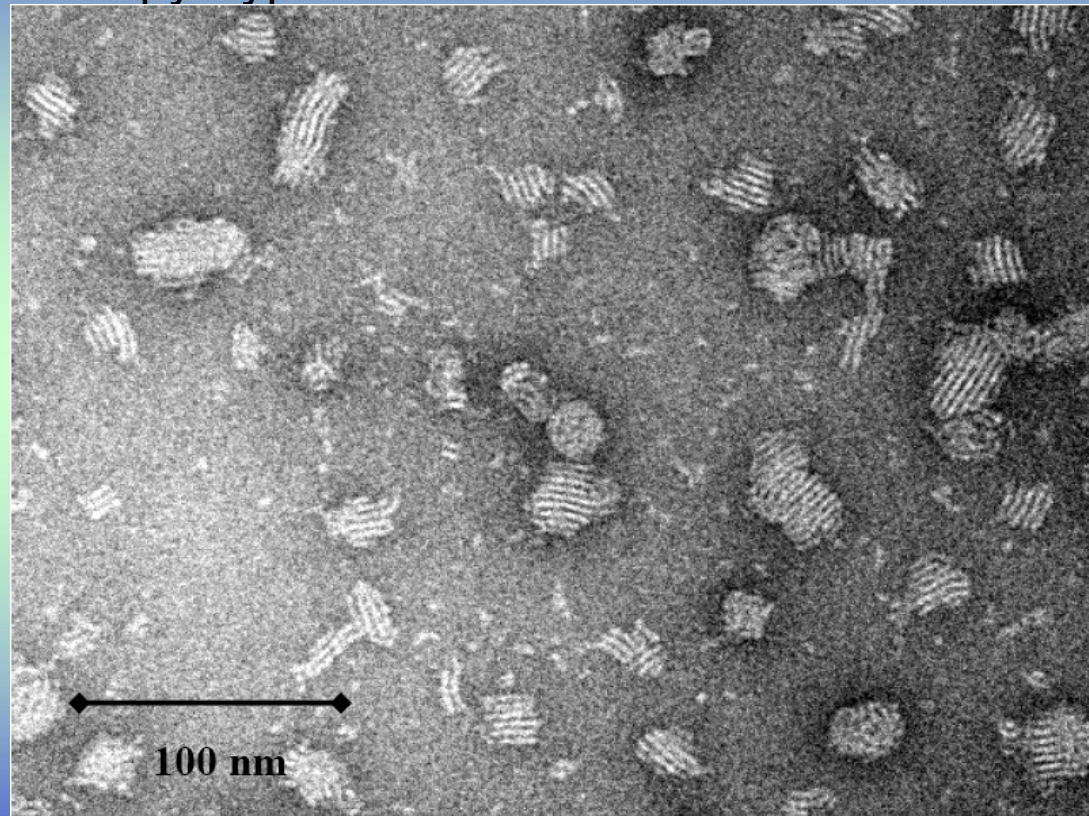
В зависимости от процентного содержания компонентов (Qui A, холестерин, фосфатидилхолин), могут быть получены различные структуры:



Кольцеобразные структуры

# ИСКОМЫ

В зависимости от процентного содержания компонентов (Qui A, холестерин, фосфатидилхолин), могут быть получены различные структуры:

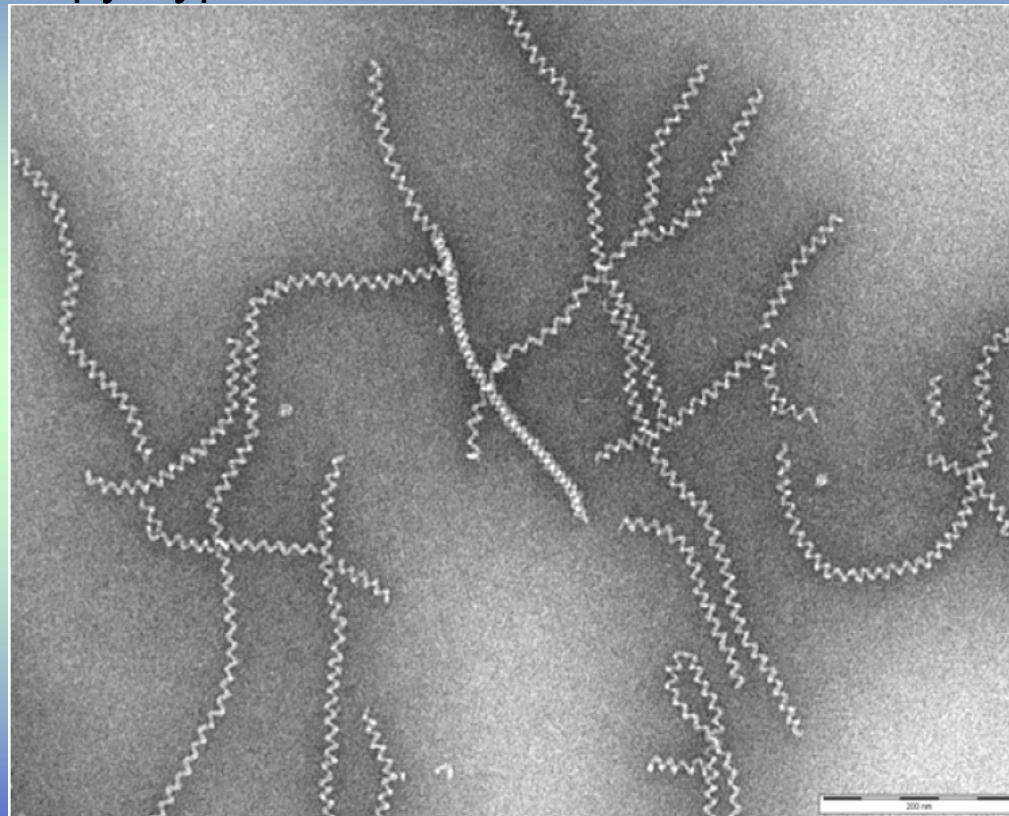


Липидные/слоистые структуры



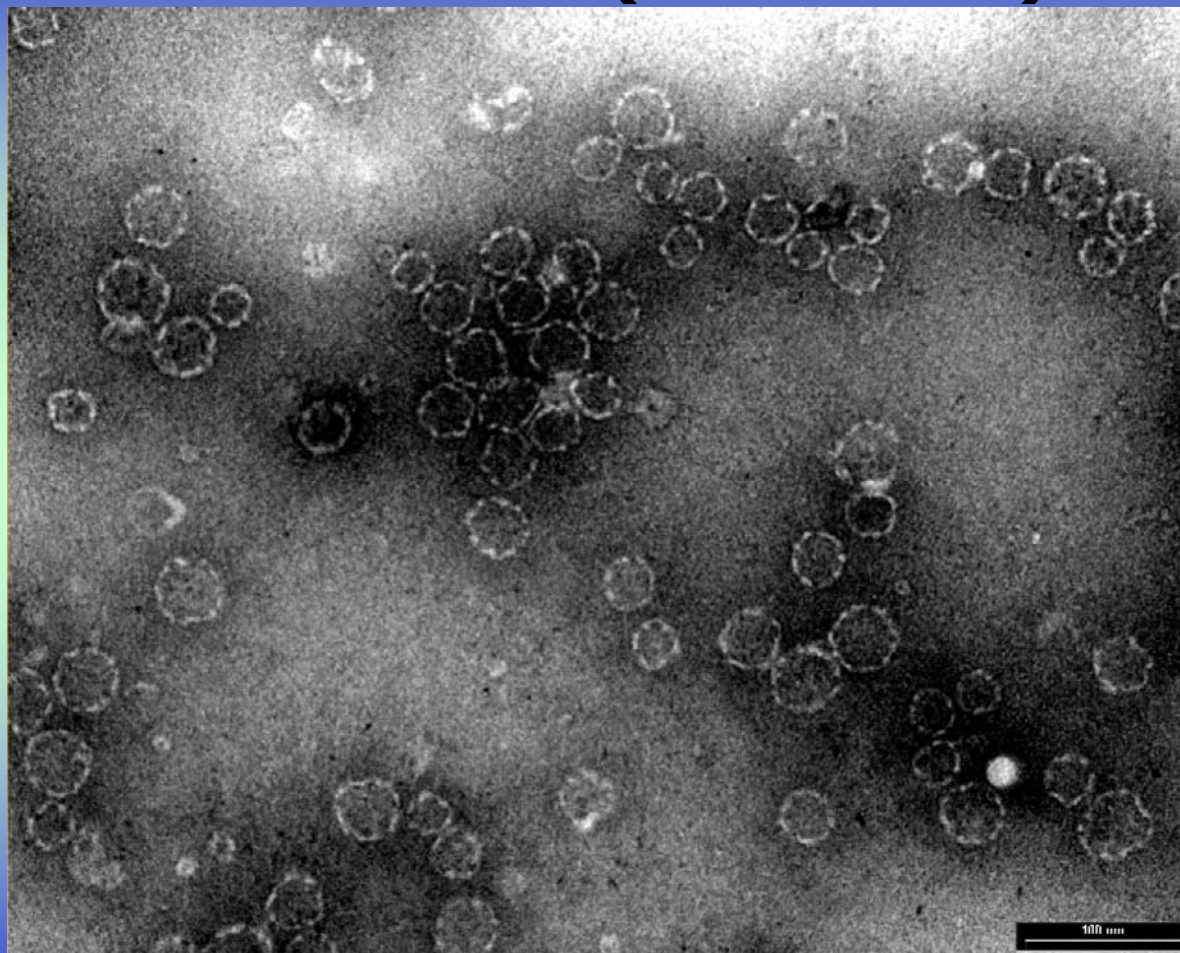
# ИСКОМЫ

В зависимости от процентного содержания компонентов (Qui A, холестерин, фосфатидилхолин), могут быть получены различные структуры:



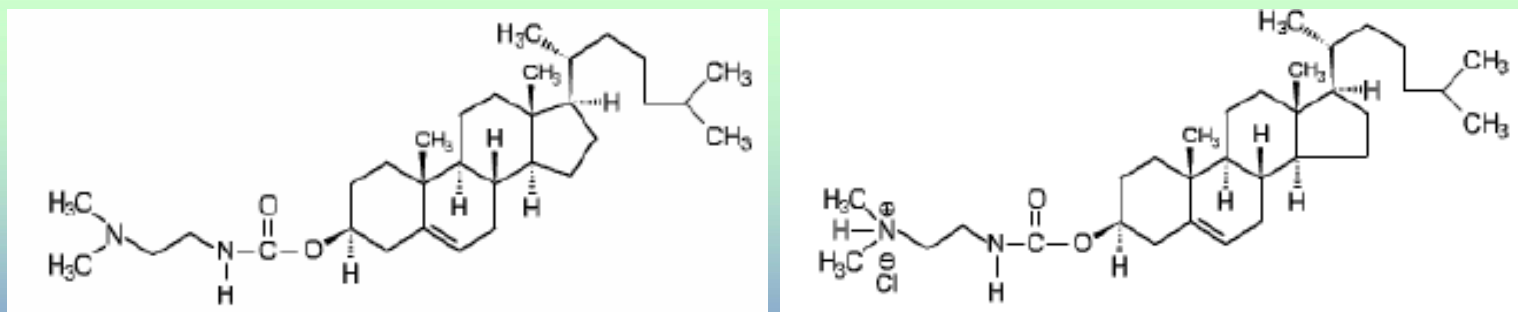
Червеобразные структуры

## Катионные ИСКОМы, или Плюскомы (Pluscoms)



## Катионные ИСКОМы, или Плюскомы (Pluscoms)

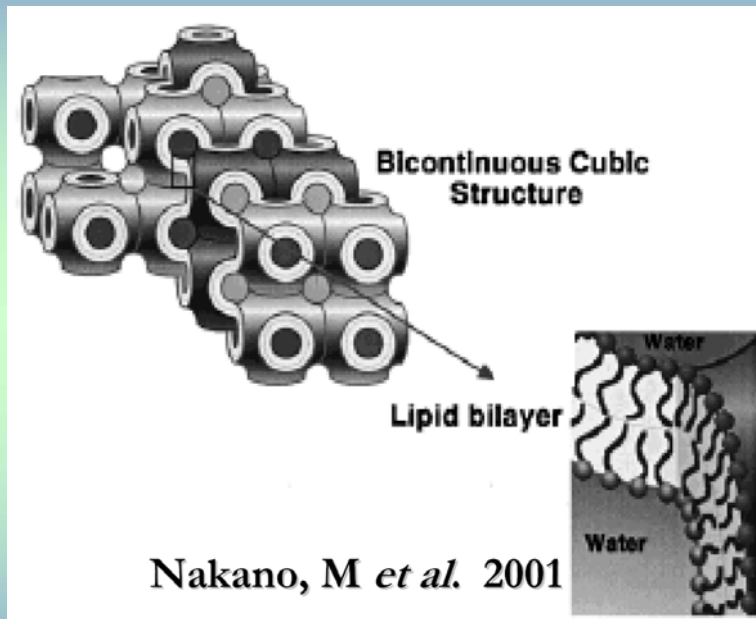
- Для доставки отрицательно заряженных молекул Lendenmans D.G. было предложено заменить холестерин в составе ИСКОМов на положительно заряженный 3beta-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]-cholesterol, или ДК-холестерин.
- Такие структуры были названы Плюскомами и в ТРИС-солевом буфере образовывали положительно заряженные ИСКОМ-подобные структуры.



ДК –холестерин

Lendenmans D. et al. Journal of Pharmaceutical Sciences 94: 1794-1807(2005).

# Кубосомы. Биконтинуальная кубическая фаза.

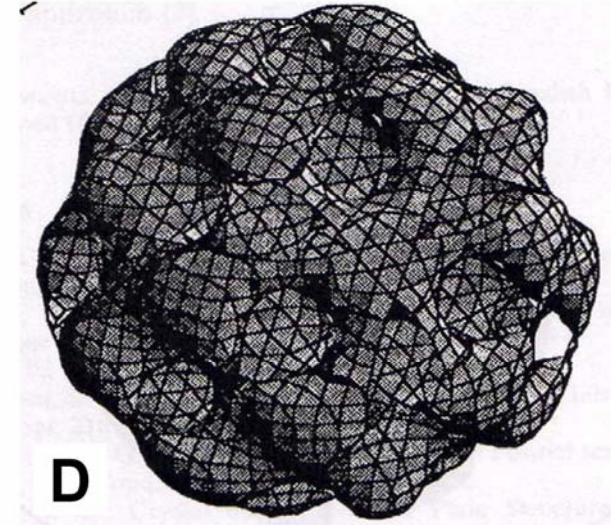
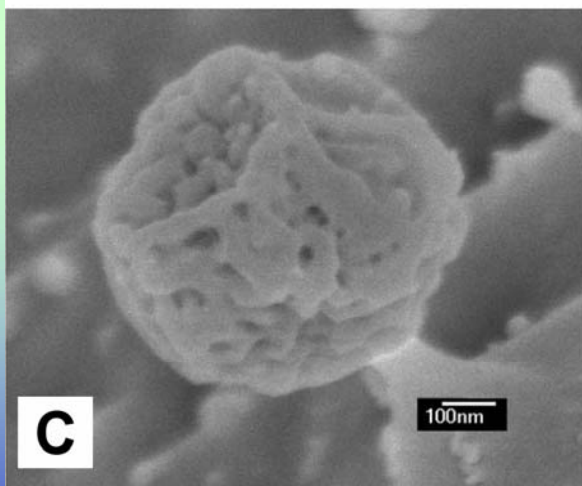
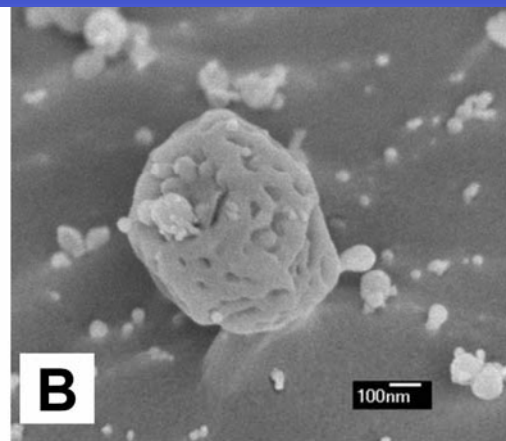
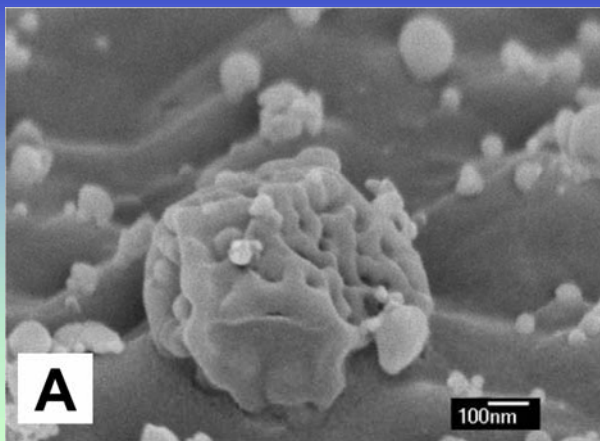


**Кубосомы** представляют собой биконтинуальную (непрерывную) кубическую фазу, состоящую из липидного бислоя.

- Липидный бислой в кубосомах организован в периодическую решетчатую кубическую 3D – структуру.
- Биконтинуальная фаза может являться:
  - двойной алмазной структурой;
  - гироидной структурой;
  - «примитивной» структурой.

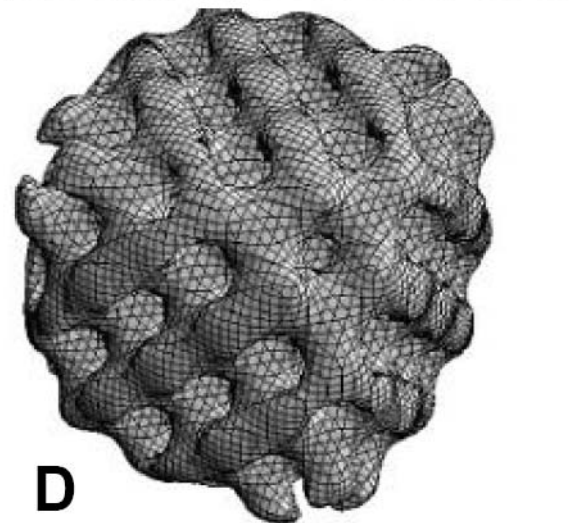
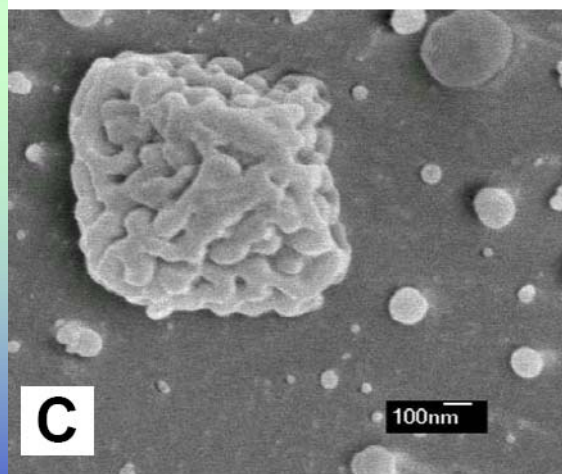
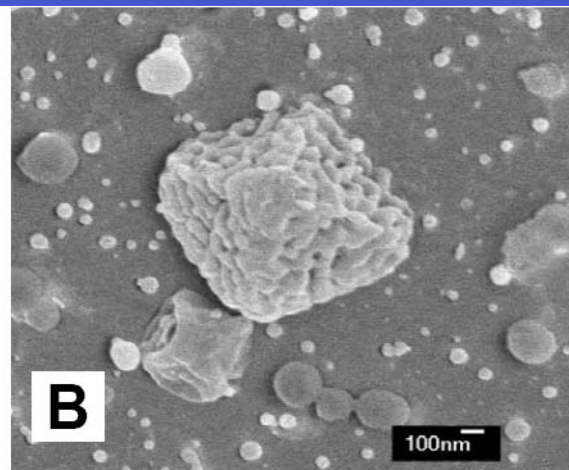
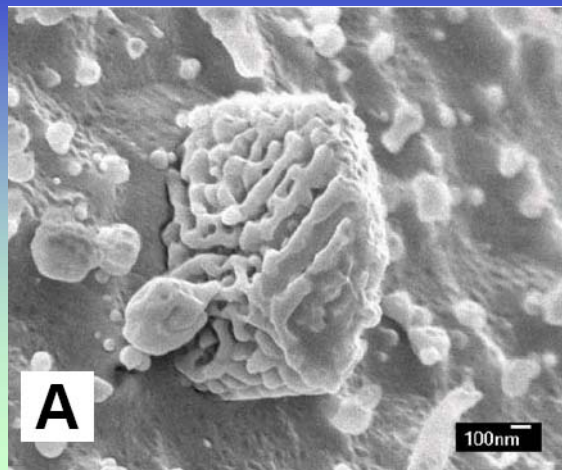


# Кубосомы. Примеры.





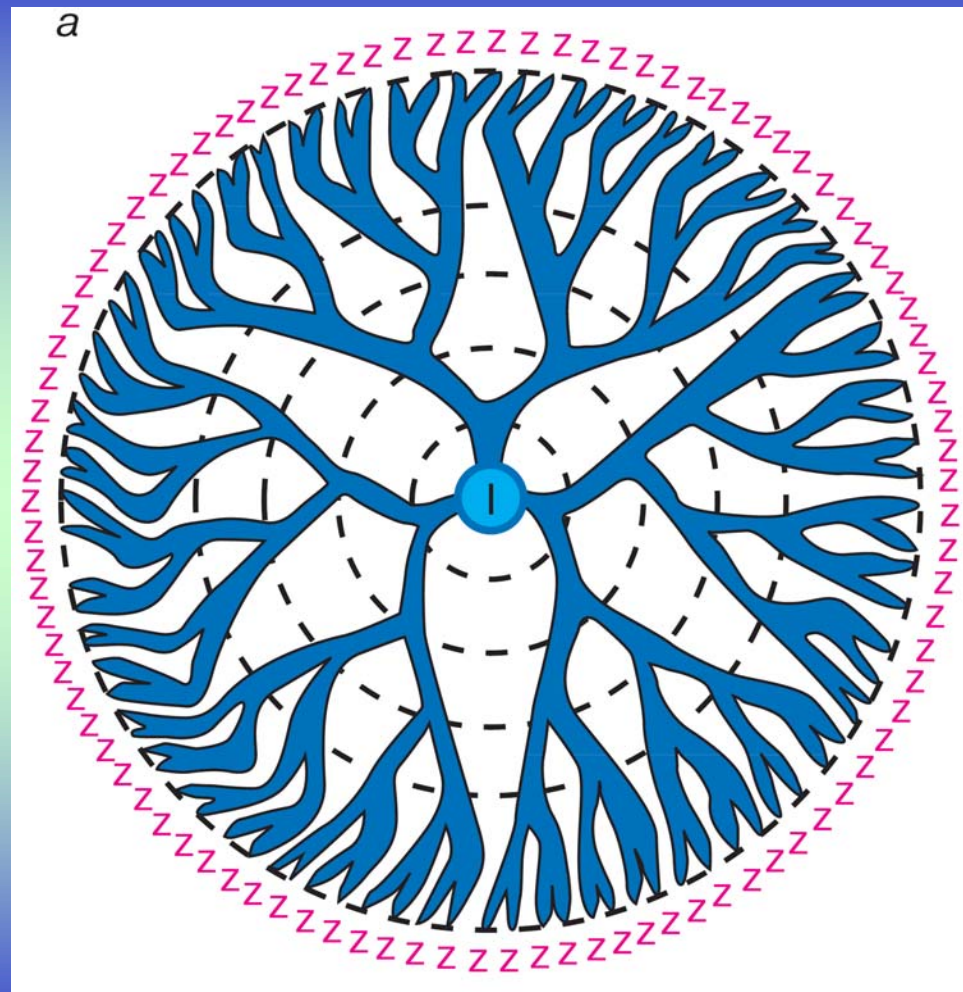
# Кубосомы. Примеры.



# Альтернативные липидные частицы для доставки вакцин

- Альтернативные липидные частицы для доставки вакцин иногда называют «неионными поверхностно-активными везикулами» (nonionic surfactant vesicle) или **ниосомами**.
- **Ниосомы** всегда содержат неионогенные поверхностно-активные вещества, или детергенты, и могут включать/не включать в свой состав холестерин и дицетил фосфат.
  - При использовании **ниосом** для транспортировки ацикловира для орального введения наблюдается ярко выраженный депо-эффект при высокой биодоступности (Attia I.A, 2007).
  - В клинических исследованиях в госпитале Виктория (Индия) использовали **ниосомы** с метотрексатом, включенным в хитозановый гель. Была показана меньшая системная токсичность и большая эффективность препарата по сравнению с метотрексатовым гелем (Lakshmi PK, 2007).

# Дендримеры



# Дендримеры

- **Дендримеры** – разветвленные молекулы на основе различных полимеров биологического и небиологического происхождения с точно проектируемой архитектурой, получаемые путем контролируемого многоступенчатого синтеза, с каждой новой стадией которого разветвленность молекулы увеличивается.
- **Дендримеры** могут быть легко модифицированы в зависимости от задач применения.
- Для направленной доставки препаратов в клетки и органы-мишени могут быть использованы специфические антитела, связанные с молекулой **дендримера**.
- Успешно используются для доставки белков, пептидов, ДНК.
  - В России группа ученых под руководством Власова Г.П. занимается созданием и испытанием **гиперразветвленных и звездообразных гомо- и гетеродендримеров на основе аминокислот**, используемых для доставки ДНК (эффективность трансфекции – около 25%).

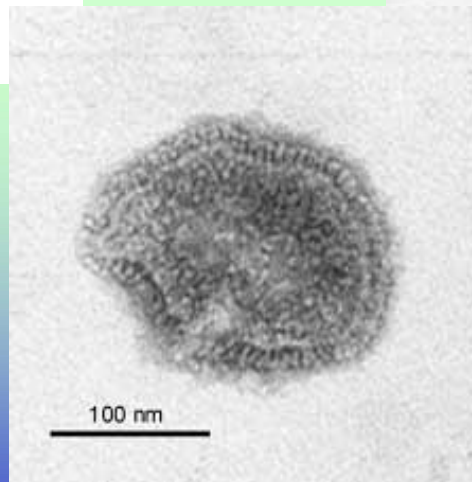
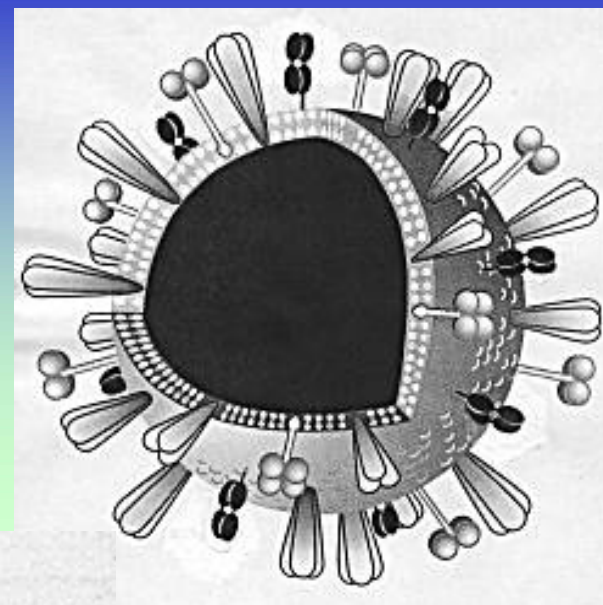
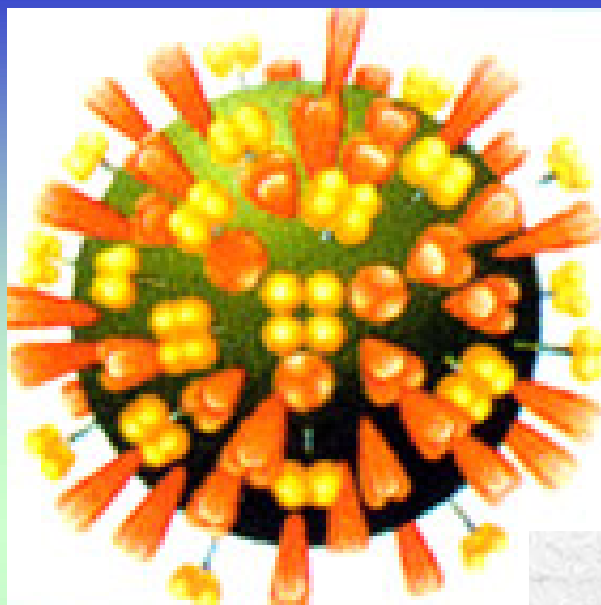
# Вирусоподобные частицы (ВПЧ)

- **Вирусоподобные частицы** – частицы, представляющие собой вирусный капсид без генетического материала; могут содержать липидную мембрану.
- В 2003 году были описаны ВПЧ на основе двух белков **вируса Эбола** гликопротеина GP и белка матрикса VP40. Такие ВПЧ активировали гуморальный и клеточный иммунитет, что было показано на мышах\*.
- В качестве векторных систем для доставки вакцин и лекарственных веществ используют **аденовирусные частицы** (без генетического материала вируса). Такие частицы легко подвергаются модификации для точного нацеливания их на клетки и органы-мишени.

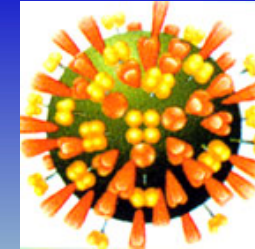
\*Warfield KL, Bosio CM, Welcher BC. Proc Natl Acad Sci U S A. Ebola virus-like particles protect from lethal Ebola virus infection. 2003



# Вирсомы



# Виросомы



- **Виросомы** – это вирусоподобные частицы, имеющие размер около 150 нм, состоящие из двухслойной фосфолипидной мембраны и мембранных белков вируса гриппа – гемагглютинаина и нейроминидазы.
- **Виросомы** не содержат генетического материала вируса гриппа и не способны к размножению в клетках человека.
- Виросомы с целевым антигеном обладают высоким адьювантным эффектом, благодаря чему **отсутствует необходимость внесения дополнительных адьювантов**.
- Антигены могут располагаться **внутри** виросомы, адсорбироваться **на поверхности** частицы или **встраиваться** в виросомальную липидную мембрану.
  - **В настоящее время применяются виросомальные вакцины против гепатита В, вируса папилломы, гриппа.**

Kaneda Y. Advanced Drug Delivery Reviews. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. 2000

# Полимерные частицы как адъюванты

- Метод подкожного введения является наиболее предпочтительным способом для доставки антигена во вторичные лимфоидные органы и, в частности, в лимфатические узлы, что вызывает стимуляцию адаптивного иммунитета. Наиболее эффективными адъювантами для вакцинных препаратов в этом случае будут являться частицы, имеющие размер от **1 нм до 1 мкм – наночастицы**, т.к. они способны проникать в лимфатические сосуды и стимулировать мощный иммунный ответ.
- Пример полимерных частиц, используемых в настоящее время:
  - **Полиметил метакрилат** — **ПММА**, poly(methyl metacrylate);
  - **Полилактид-ко-гликолид** — **ПЛГ**, poly(D,L-lactide-co-glycolide);
  - **Полиалкил цианакрилат** — **ПАЦА**, poly(alkyl cyanoacrylate).



## Использование протокола «прайм-буст» на примере новых туберкулёзных вакцин

- В связи с низкой эффективностью защиты от туберкулеза (0-80%) в настоящее время рекомендуется разработка рекомбинантных штаммов БЦЖ, а также вакцинация по протоколу «прайм-буст» (prime-boost vaccination).
- Протокол «прайм-буст» - комбинированная стратегия вакцинации, согласно которой проводятся две или более иммунизации с использованием разных типов вакцинирующих препаратов.
- Международная группа AERAS, созданная для разработки новых туберкулёзных вакцин, предлагает несколько возможных вакцинных кандидатов на основе рекомбинантных штаммов БЦЖ.
- При прайм-буст вакцинации значительно увеличивается сила и продолжительность иммунного ответа.

Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. Immunol Today, 2000  
Stover CK, Bansal GP, Hanson MS, Burlein JE, Palaszynski SR, Young JF, Koenig S, Young DB, Sadziene A, Barbour AG. Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. J Exp Med. 1993  
Stover CK, Bansal GP, Langerman S, Hanson MS. Protective immunity elicited by rBCG vaccines. Dev Biol Stand. 1994  
Walton CB, Inos AB, Andres OA, Jube S, Couet HG, Douglas JT, Patek PQ, Borthakur D. Immunization with hybrid recombinant Mycobacterium tuberculosis H(37)Rv proteins increases the TH1 cytokine response in mice following a pulmonary instillation of irradiated mycobacteria. Vaccine. 2008

# Применение протокола «прайм-буст»

Пример применения протокола вакцинации «прайм-буст» на примере туберкулёзной вакцины:

–Для первичной вакцинации («прайм») рекомендуются либо **БЦЖ-вакцина**, либо рекомбинантный штамм **AERAS-407 rBCG**.

–Для проведения вторичной вакцинации («буст») также рекомендованы несколько штаммов:

- **AERAS-402 / Crucell Ad35** (аденовирусная система доставки, содержащая антигены *M. tuberculosis* 85A, 85B, и TB10.4);
- **GSK M72** (белок слияния M72 вместе с новейшими адъювантами компании ГлаксоСмитКляйн, завершена первая стадия клинических испытаний);
- **HuVac4 (AERAS-404)** (белок слияния HuVac4 вместе с адъювантом IC31 компании Sanofi Pasteur);
- **AERAS 485/Oxford MVA85A** (система доставки на основе рекомбинантного вируса коровьей оспы (вакцинии), проведена первая фаза клинических испытаний);
- **AERAS-405 Oral Shigella** (оральная вакцина на основе высокоаттенуированных микроорганизмов *Shigella*, действующих как система доставки нуклеокапсидов, содержащих двухцепочечную РНК; первая фаза клинических испытаний запланирована на 2009 год).

По материалам сайта <http://aeras.org/our-approach/dev-portfolio.html#top>

# Идеальный адъювант

- По современным представлениям идеальный адъювант должен обладать следующими свойствами:
  - *Высокой стабильностью и длительным сроком хранения.*
  - *Биодеградируемостью (способностью легко подвергаться биодеградации в организме).*
  - *Дешевизной производства.*
  - *Иммунологической инертностью.*
  - *Инициировать адекватный и сбалансированный клеточный и гуморальный иммунный ответ.*
- Как компонент вакцины, **идеальный адъювант должен обладать иммуностимуляторными свойствами при отсутствии токсичности, локальных и системных реакций.**

J.C. Aguilar, E.G. Rodriguez. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine, 2007

# Перспективные направления конструирования вакцин



## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СИСТЕМЫ КАЧЕСТВА МПБП ФГУП НПО «МИКРОГЕН» МЗ РФ

<b>НАЦИОНАЛЬНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ</b> <b>National Requirements</b>	<b>МЕЖДУНАРОДНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ</b> <b>International Requirements</b>
ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств»	WHO TRS # 908, 2003, Annex 4 “GMP for pharmaceutical products: main principles.”  WHO TRS # 823 1992, Annex 1 “GMP for pharmaceutical products.”
ГОСТ Р ИСО 9001-2001 «Системы менеджмента качества. Требования.»	ISO 9001-2000 “Quality management systems. Requirements.”
СП 3.3.2.1288-03 «Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов»	WHO TRS # 822 1992, Annex 1 “GMP for biological products.”

**Спасибо за внимание**

**МИКРО****ГЕН**