

АННОТАЦИЯ

к диссертации Туысқановой Мөлдір Сержанқызы на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «8D05105 Биотехнология» на тему: «Разработка биологической модели для оценки иммуногенности вакцин против коронавирусной инфекции COVID-19»

Общая характеристика работы

Диссертационная работа посвящена изучению свойств вируса короновирусной инфекции COVID-19, его выделению, изучению чувствительности различных культур клеток животных к вирусу SARS-CoV-2, проявлению патогенеза болезни короновирусной инфекции у различных видов лабораторных животных с целью разработки биологической модели для оценки эффективности препаратов против данной инфекции. А также подбору оптимального метода заражения способный вызывать короновирусную инфекцию у лабораторных животных, и оценке иммуногенности вакцин против короновирусной инфекции.

Актуальность темы исследования

В первой половине прошлого века были открыты первые представители семейства *Coronaviridae*. Данный вирус представлял серьезную проблему в ветеринарии, но научное сообщество не считало особо опасным эпидемические вирусы. Коронавирусы стали проблемой в 2002 году, когда вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV – *Severe acute respiratory syndrome – related coronavirus*) был обнаружен в популяции людей. Природным резервуаром данного вируса являлись летучие мыши (*Chiroptera*, *Microchiroptera*), переносящие вирус инаппарантно, но выделяющие вирус со слюной, мочой и фекалиями. Этим самым заражают мелких млекопитающих, которые широко используются в пищу в странах Юго-Восточной Азии. Эпидемия, вызванная SARS-CoV составляла летальность среди заболевших по всему миру 9,6 %. В начале декабря 2019 года человечество столкнулось с новой проблемой, вызванной коронавирусом. В срединной китайской провинции Хубэй стали развиваться эпидемические события, способным вызывать у людей тяжелые первичные вирусные пневмонии. Изолированный этиологический агент был идентифицирован как представитель *Coronaviridae*. Геном данного агента оказался гомологичен MERS-CoV на 50%, SARS-CoV – 79%, BtRsCoV – 88%. Впоследствии учитывая особенности структуры генома ему дали название острого респираторного синдрома 2 типа (SARS-CoV-2 – *Severe acute respiratory syndrome 2*). Данный вирус вызывает инфекционное заболевание COVID-19. Клиническое проявление вируса довольно широкое. Эта болезнь на данный момент распространилась на все страны мира и является глобальной пандемией с высоким уровнем летальных исходов. Пандемия приносит колоссальный вред мировому здравоохранению и экономике. На этот момент в мире активно разрабатываются вакцины против короновирусной инфекции 2 типа. Для проведения доклинических испытаний

вакцины требуется подходящая биологическая модель животных, которые могут обеспечить последовательные и воспроизводимые результаты.

Цель исследования

Поиск биологической модели и получение контрольного штамма вируса SARS-CoV-2 для оценки иммуногенности и эффективности вакцин против коронавирусной инфекции COVID-19.

Задачи исследования:

- Выделение вируса короновирусной инфекции COVID-19;
- Изучение чувствительности различных культур клеток животных к вирусу SARS-CoV-2;
- Адаптация вируса в культуре клеток;
- Изучение патогенности вируса на различных животных;
- Получение контрольного вируса со стандартной инфекционной активности;
- Поиск биологической модели для оценки иммуногенности вакцин против коронавирусной инфекции COVID-19;
- Подбор оптимального метода заражения способный вызывать коронавирусной инфекции у лабораторных животных;
- Подбор заражающих доз вирулентного вируса, способные вызывать заболевания у зараженных животных;
- Оценка иммуногенности вакцин против коронавирусной инфекции.

Объект исследования

Вирус SARS-CoV-2, различные виды лабораторных животных, вакцина против коронавирусной инфекции.

Методы исследований

Классические и современные вирусологические, биотехнологические и иммунологические методы.

Научная новизна исследования

Выделен и адаптирован в культуре клеток эпидемически актуальный вирус SARS-CoV-2 циркулирующий в Республике Казахстан. Изучены его биологические свойства и депонирован в депозиторий возбудителей особо опасных патогенов Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности для разработки диагностических и профилактических средств против коронавирусной инфекции, а также для использования в качестве контрольного вируса при оценке эффективности биологических и противовирусных препаратов.

Разработана биологическая модель, позволяющая оценить эффективности биологических препаратов, повторяющие патогенез болезни COVID-19, со схожими клиническими признаками проявленными у людей.

Впервые оценена иммуногенность и безопасность первой отечественной инактивированной вакцины «QazVac» против коронавирусной инфекции, на биологической модели разработанной в ходе данных исследований.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость исследований заключается в изучении патогенности вируса SARS-CoV-2 на различных видах животных с

последующей оценкой патогенеза COVID-19. Практическая значимость предусматривает разработку биологической модели для оценки эффективности биологических и противовирусных препаратов против данной болезни. Разработано и утверждено методическое указание по использованию сирийского хомяка в качестве биологической модели при оценке эффективности биологических и противовирусных препаратов против COVID-19.

Основные положения, выносимые на защиту:

Выделен вирус в культуре клеток Vero из клинических образцов, взятых у пациентов Республики Казахстан (г. Алматы), заболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Вирус идентифицирован молекулярно-генетическими методами и подтвержден как коронавирус SARS-CoV-2.

Изучены культуральные свойства вируса SARS-CoV-2 на различных культурах клеток с определением оптимальных параметров культивирования на культуре клеток Vero.

Определены чувствительные животные к вирусу SARS-CoV-2 пригодной для разработки биологической модели с последующим изучением его патогенности на хомяках, хорьках и кошках и определением у них клинических признаков и симптомов схожих у людей.

Протестированы разные методы заражения животных, и установлено что эффективным методом заражения является интраназальное заражение.

Оценена протективная эффективность и безопасность первой отечественной вакцины QazCovid-in® против коронавирусной инфекции на разработанной биологической модели.

Основные результаты исследований и выводы:

На основании анализа экспериментальных данных, полученных за период работы, можно сделать следующие выводы:

1. Выделен вирус в культуре клеток Vero из клинических образцов, взятых у пациентов, заболевших новым коронавирусом. Выделенный вирус был идентифицирован молекулярно-генетическими методами и подтвержден как член семейства коронавирусов, и относится новому коронавирусу SARS-CoV-2. Эпидемический вирус SARS-CoV-2, изолированный от больного пациента, паспортизирован и депонирован в республиканском депозитарии РГП «НИИПББ» в виде штамма под условным наименованием «SARS-CoV-2/KZ_Almaly04.2020».

2. Была изучена чувствительность различных клеточных культур животных к вирусу SARS-CoV-2, и в результате было обнаружено, что клетки, полученные от обезьян и свиней, более восприимчивы и чувствительны к данному вирусу, чем другие клетки.

3. Проведены работы по изучению некоторых биологических и физико-химических свойств изолированного вируса, и в результате адаптирован к выбранной биологической системе путем слепого пассажа, в результате проведенных исследований установлено, что после 5 пассажей цитопатогенность вируса SARS-CoV-2 стабилизируется и при определенной множественности инфицирования вызывает ЦПД через 24 ч., и приводит к

полной дегенерации монослоя клеток в течение 72-96 ч. На всех испытанных пассажных уровнях характер цитопатогенного воздействия возбудителя остается стабильным.

4. Изучена патогенность казахстанского штамма вируса SARS-CoV-2 на различных видах животных (мыши, щенята, морские свинки, крысы, поросята, котята, хорьки и сирийские хомячки), в которых установлено что мыши, щенята, морские свинки, крысы и поросята являются невосприимчивы к изучаемому вирусу. Установлено, что сирийские хомяки, хорьки и котята восприимчивы к коронавирусной инфекции COVID-19. Штамм SARS-CoV-2/KZ_Almaty04.2020 при интраназальном заражении у сирийских хомяков, котят и хорьков вызывает короновирусную инфекцию с клиническими проявлениями болезни (отсутствие аппетита, истощение, зуд, кожная сыпь, диарея и температурная реакция – гипо- и гипертермия), поддерживают репликации вируса и вызывает воспалительную реакцию в легких.

5. Подобрана модель для контроля иммуногенности вакцин. Установлено, что сирийские хомяки наиболее восприимчивы к коронавирусной инфекции COVID-19. Штамм SARS-CoV-2/KZ_Almaty04.2020 при интраназальном заражении у сирийских хомяков вызывает короновирусную инфекцию с клиническими проявлениями болезни (отсутствие аппетита, истощение, зуд, кожная сыпь, диарея и температурная реакция – гипо- и гипертермия).

6. С целью стандартизации и получения вирулентного штамма вируса SARS-CoV-2 было выполнено серийных 20 пассажей через лёгкие сирийских хомяков. По результатам пассирования вируса на хомяках установлено постепенное увеличение титра вируса до $5,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на 9 пассаже, далее пассирование возбудителя COVID-19 через организм восприимчивой биологической модели привело к уменьшению титра вируса. На 17 пассаже вирусовыделение на культуре клеток уже не показывало активных вирусов.

7. Подобран оптимальный метод заражения способный вызывать короновирусную инфекцию у хомяков. Хомяки были заражены тремя наиболее популярными способами: интраназально, внутривенно и подкожно. В результате проведенных исследований установлено, что среди трех испытанных методов заражения, интраназальные введения с большей вероятностью вызывают короновирусную инфекцию у животных, чем другие методы. Подобраны заражающие дозы вирулентного вируса, способные вызывать заболевания у зараженных животных. На хомяках испытаны 7 разных доз вируса, оптимальной из них является средняя инфицирующая доза в 6200 ТЦД.

8. Хомяки использованы в качестве биологической модели для оценки протективности разработанной казахстанской вакцины QazCovid-in®. Результаты исследований показали абсолютную безопасность вакцины у сирийских хомяков. При изучении защитной эффективности разработанная вакцина с иммунизирующей дозой 5 мкг/доза специфического антигена защищала животных от вирулентного вируса в дозе $10^{4.5} \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

В ходе выполнения цели диссертационной работы были успешно решены все поставленные задачи. Представленные в работе экспериментальные

данные подтверждаются статистически и имеют высокую значимость, превышающую первый критериальный порог ($p < 0,05$).

Связь с планом основных научных работ

Диссертационная работа была выполнена в рамках научно-технической программы на тему: «Разработка вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19» (ИРН № 64356/ПЦФ-МОН-РК-ОТ-20) по целевому финансированию на 2020 – 2022 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендуемых списком ККСОН, 3 работы в журналах, включенных в базу данных Web of Science и Scopus (Q1, Q4), 1 статья в других изданиях, 4 докладов и тезисов на международных конференциях. Подана заявка на патент изобретение.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, заключения, списка использованных источников из 202 наименований. Работа изложена на 114 страницах, содержит 18 таблиц, 25 рисунков и 3 приложения.