



КОМБИНИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ИСКУССТВЕННЫХ ПОЛИЭПИТОПНЫХ ИММУНОГЕНОВ: РЕЗУЛЬТАТЫ I ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ¹

© 2016 г. Л. И. Карпенко*, #, С. И. Бажан*, М. П. Богрянцева*, Н. Н. Рындюк**, З. И. Гинько**, В. И. Кузубов**, Л. Р. Лебедев*, О. Н. Каплина*, А. Ю. Регужева*, А. Б. Рыжиков*, С. В. Усова*, С. Ф. Орешкова*, Е. А. Нечаева*, Е. Д. Даниленко*, А. А. Ильичев*

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”,
630559, Кольцово, Новосибирской области, Россия

**ФГУЗ Медико-санитарная часть № 163 ФМБА России,
630559, Кольцово, Новосибирской области, Россия

Поступила 20.04.2014 г. Принята к печати 03.07.2015 г.

Описывается кандидатная вакцина против ВИЧ-1/СПИД КомбиВИЧвак, в состав которой вошли два искусственных полиэпитопных иммуногена ТВ1 и ТС1 для стимуляции гуморального и клеточного ответов. Рекомбинантный белок ТВ1 сконструирован в виде полипептида с заранее заданной третичной структурой и содержит эпитопы из белков Env и Gag ВИЧ-1. В состав ТС1 были включены эпитопы (как CD8⁺ CTL, так и CD4⁺ Th) из основных вирусных белков Env, Gag, Pol и Nef, которые являются высоко консервативными для 3 субтипов ВИЧ-1 (А, В и С). Ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген ТС1, был встроен в векторную плазмиду рсDNA-3.1. Вакцина КомбиВИЧвак представляет собой искусственные мицеллоподобные частицы, в центре которых находится плазида рсDNA-ТС1 (ДНК-вакцина), а на поверхности – белок ТВ1, конъюгированный с полиглиукином. В ходе доклинических испытаний, проведенных на нескольких видах животных, была продемонстрирована иммуногенность и безопасность КомбиВИЧвак. Завершена I фаза клинических испытаний вакцины. Результаты испытаний на добровольцах подтверждают, что кандидатная вакцина КомбиВИЧвак является безопасной, не вызывает побочных эффектов и индуцирует ВИЧ-специфический гуморальный и клеточный иммунные ответы. Получено разрешение Минздравсоцразвития РФ на проведение расширенных (II фаза) клинических исследований.

Ключевые слова: вакцина против ВИЧ-1, искусственные полиэпитопные иммуногены, ДНК-вакцина, мицеллоподобные наночастицы, клинические испытания I фазы.

DOI: 10.7868/S0132342316020068

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня, 34 года спустя после регистрации первых случаев СПИДа в 1981 г., можно с уверенностью констатировать, что масштабные нацио-

нальные и международные программы по профилактике и лечению СПИДа недостаточно эффективны, поскольку эпидемия в ряде регионов не только не снижается, а имеет тенденцию к росту. По данным ВОЗ, в настоящий период в мире насчитывается около 35 млн человек, живущих с ВИЧ-1. В России зарегистрировано более 900 тыс. инфицированных, при этом с каждым годом отмечается прирост новых случаев [1].

В связи с этим совершенно очевидно, что назрела острая необходимость новых профилактических подходов и технологий, которые позволили бы повысить эффективность контроля над распространением эпидемии СПИДа. Несомненно, ключевым звеном профилактики эпидемии могла бы быть вакцина [2–6].

Проблемы, которые сдерживают прогресс в разработке вакцины против ВИЧ-1, хорошо из-

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VII Российском симпозиуме “Белки и пептиды”; Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.

Сокращения: ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита первого типа; ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа; ЕЭ – единицы эндотоксина; ИРИ – иммунорегуляторный индекс; ЛАЛ – лизат амебоцитов; ЛПС – липополисахарид (эндотоксин); СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; ФСП – фармакопейная статья предприятия; ЭКГ – электрокардиограмма; НЛА – человеческий лейкоцитарный антиген (Human Leucocyte Antigen); МНС – главный комплекс гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex); ТВ1 – Т- и В-клеточный иммуноген (T and B cell immunogen); ТС1 – Т-клеточный иммуноген (T cell immunogen); CTL – цитотоксические лимфоциты.

Автор для связи (эл. почта: karpenko@vector.nsc.ru).

вестны. Во-первых, ВИЧ-1 обладает высокой изменчивостью, в результате чего патоген меняет антигенную структуру быстрее, чем иммунная система переключается на новые антигенные варианты вируса. Во-вторых, до настоящего времени не ясно, какой тип иммунного ответа является более важным в предотвращении инфекции. В-третьих, вирусные белки содержат районы, которые обладают патогенными свойствами вследствие молекулярной мимикрии физиологически важных функций и индукции аутоиммунного ответа, который может способствовать развитию иммунодефицита. Наконец, для изучения ВИЧ-инфекции практически отсутствуют адекватные модели на животных [2, 7].

Известные стратегии создания вакцины против ВИЧ-1 основаны на использовании различных форм вирусного антигена, включая инактивированный вирус, модифицированный или аттенуированный вирус, нативные и генно-инженерные белки, пептиды [2, 8]. Кандидаты вакцины первого поколения были сконструированы с целью стимуляции гуморального иммунитета, т.е. выработки антител, нейтрализующих вирус. Создание подобных вакцин основывалось на использовании полноразмерных белков оболочки ВИЧ, либо их фрагментов. Вакцины второго поколения были направлены на стимуляцию клеточного ответа и выработку цитотоксических лимфоцитов (CTL), способных эффективно распознавать и элиминировать ВИЧ-инфицированные клетки. Многие кандидаты были опробованы на человеке или животных, однако положительных результатов при испытаниях на добровольцах достигнуто не было [8].

Первые обнадеживающие и статистически значимые результаты были получены в клинических испытаниях вакцины RV144, которая стимулировала как гуморальный, так и клеточный звенья иммунитета. Она представляет собой комбинацию двух ранее созданных вакцин ALVAC-HIV (Sanofi Pasteur) и AIDSVAX B/E gp120 (VAXGEN) [9]. Несмотря на относительно невысокую эффективность защиты (31.2%), клинические испытания RV144 позволили сделать ряд важных выводов: (i) вакцина против ВИЧ-1 это не миф, а реальность; (ii) эффективная вакцина должна индуцировать как гуморальный, так и клеточный ответы против ВИЧ-1; (iii) для повышения эффективности вакцин необходимы новые подходы к их созданию [5, 6, 10]. Одним из таких подходов является конструирование полностью искусственных полиэпитопных (мозаичных) анти-ВИЧ-1-иммуногенов, включающих широкий спектр протективных Т- и В-клеточных эпитопов из основных вирусных антигенов, способных индуцировать образование нейтрализующих антител широкого спектра действия и ответы цитотоксических (CD8⁺ CTL) и хелперных (CD4⁺ Th) Т-лимфоцитов. Данный подход пред-

ставляется весьма привлекательным для создания нового поколения ВИЧ-вакцин. Теоретически он позволяет преодолеть антигенную изменчивость ВИЧ-1, фокусирует иммунные ответы на протективные детерминанты и позволяет исключить из состава вакцины нежелательные детерминанты, которые способны индуцировать аутоантитела или антитела, увеличивающие инфекционность вируса [4, 6, 11–17].

В настоящее время опубликовано достаточно много работ, посвященных конструированию и исследованию активности искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов [18–21]. Ряд полиэпитопных Т-клеточных вакцин прошли I фазу клинических испытаний [18].

В ФБУН Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии “Вектор” создана вакцина против ВИЧ-1 КомбиВИЧвак, в состав которой вошли как Т-клеточный, так и В-клеточный полиэпитопные иммуногены. В отличие от существующих вакцин КомбиВИЧвак создана на основе уникальной платформы. Суть платформы – объединение в рамках одной конструкции, в виде мицеллоподобных наночастиц, двух разных иммуногенов: полиэпитопного белка ТВ1, и ДНК-вакцины рсDNA-ТС1, кодирующей полиэпитопный белок ТС1 [22–33]. При этом оба иммуногена – это не природные структуры ВИЧ-1, а полностью искусственные молекулы, спроектированные с помощью методов молекулярного дизайна.

Технология сборки наночастиц вакцины также является оригинальной. Их оболочка состоит из конъюгата (декстран-спермидин-ТВ1). Входящий в состав вакцины спермидин обеспечивает конъюгату положительный заряд и, связываясь с ДНК-вакциной, обеспечивает самосборку наночастиц, размер которых 40–100 нм близок к размерам вириона ВИЧ-1.

Преимущество данной технологии состоит в том, что доставка в рамках в одной наночастицы одновременно двух вакцинных компонентов, одним из которых является белок, а другим – ДНК, подобна естественным вирусным инфекциям. ДНК-вакцина обеспечивает наиболее естественный путь для стимуляции Т-клеточного ответа, так как при вакцинации ДНК процессинг синтезируемого внутри клетки целевого иммуногена ТС1 и презентация освободившихся CTL-эпитопов CD8⁺ Т-лимфоцитам происходит по пути МНС I класса. В то же время, белок ТВ1, экспонированный на поверхности наночастиц, будет узнаваться рецепторами В-клеток и стимулировать выработку антител. При этом структура и размер наночастиц будут обеспечивать вакцине высокую иммуногенность без использования дополнительных адьювантов.

В процессе исследований по созданию Комби-ВИЧвак были разработаны методы получения экспериментальных серий вакцины стандартного

качества согласно рекомендациям ВОЗ. Проведены доклинические исследования, которые свидетельствовали о безопасности разработанной вакцины при испытаниях на животных. В рамках доклинического изучения вакцины КомбиВИЧвак было проведено изучение острой и хронической токсичности на мышках и морских свинках, которые показали отсутствие отклонений в состоянии жизненно важных органов животных, отсутствие изменений гематологических и морфологических показателей, отсутствие иммунотоксичности и алергизирующей активности, как при однократном, так и при десятикратном введении вакцины. Оценку специфической активности проводили по показателям гуморального и клеточного иммунитета у мышей линии BALB/c при двукратной иммунизации. Было показано, что вакцина КомбиВИЧвак индуцирует формирование ВИЧ-специфических антигенов и СТЛ [22, 34, 35]. Вакцина не вызвала пирогенной реакции у кроликов, не оказывала влияния на ЦНС и детоксицирующую функцию печени мышей. Оценка длительности персистенции вакцины в организме лабораторных животных показала, что плазмидная ДНК, компонент вакцины, полностью элиминировалась из органов и тканей мышей через 2 мес. после вакцинации [22].

В данной статье описываются состав и функциональные компоненты вакцины КомбиВИЧвак, ее структурная организация, а также представлены результаты по оценке безвредности и специфической активности вакцины в рамках первой фазы клинических испытаний на добровольцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вакцина против ВИЧ КомбиВИЧвак объединяет в одной конструкции два полиэпитопных ВИЧ-специфических иммуногена. Один из них является искусственным рекомбинантным белком ТВ1, а другой – плазмидой рсDNA-ТС1 с геном, кодирующим поли-СТЛ-эпитопный белок ТС1.

Иммуноген ТВ1 (T and B cell epitopes containing Immunogen) представляет собой искусственный белок, состоящий из 4 α -спиралей; аминокислотная последовательность белка включает четыре Т-клеточных и пять В-клеточных эпитопов из белков ВИЧ-1 Env и Gag (рис. 1) [36, 37]. У мышей и обезьян, иммунизированных белком ТВ1, выявляются антитела, обладающие способностью нейтрализовать вирус [36, 37].

Второй компонент вакцины – плазида рсDNA-ТС1 – обеспечивает синтез в клетках человека белка ТС1, состоящего из 392 а.о. [27, 28, 38] (рис. 2). ТС1 включает в себя более восьмидесяти эпитопов как CD8⁺ СТЛ, так и CD4⁺ Th из основных антигенов ВИЧ-1 gp120, gp41, p17, p24, Pol и Nef. Для проектирования ТС1-иммуногена были

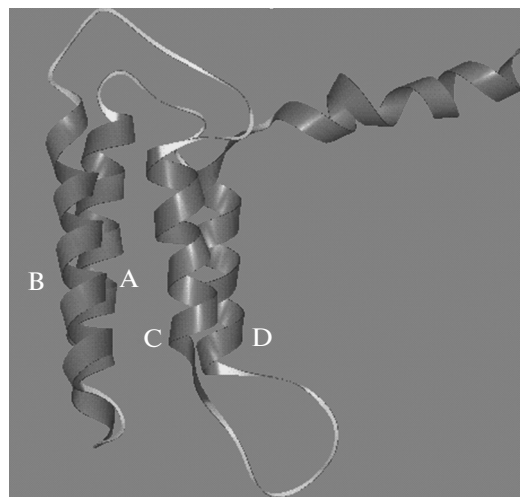


Рис. 1. Модель третичной структуры белка ТВ1. Т-клеточные эпитопы (А, В, С, D) располагаются в области α -спиралей, В-клеточные – в петлевых участках [30].

взяты эпитопы, удовлетворяющие следующим критериям.

1) Были выбраны эпитопы, представленные в *Los Alamos HIV Molecular Immunology Database*, которые являются высоко консервативными среди подтипов А, В и С ВИЧ-1.

2) Эпитопы выбирали из основных вирусных белков-антигенов Env, Gag, Pol и Nef, которые индуцируют СТЛ-ответы, являющиеся важными компонентами защиты от ВИЧ.

3) Учтены CD8⁺ СТЛ-эпитопы, которые в совокупности рестриктированы десятью различными оптимально подобранными аллелями класса HLA I, более чем на 95% покрывающими генетическое разнообразие антигенов класса MHC I в популяции практически любого географического района.

4) Чтобы исключить нежелательные эпитопы, которые могут перекрестно реагировать с нормальными клеточными белками, в последовательностях белков ВИЧ-1 были идентифицированы и удалены районы, которые имеют локальное сходство с белками человека [27].

Таким образом, вакцина КомбиВИЧвак спроектирована так, чтобы индуцировать оба звена иммунного ответа – специфические антитела и цитотоксические Т-лимфоциты. Для этого В-клеточный иммуноген ТВ1 спроектирован в виде белка, а Т-клеточный иммуноген ТС1 – в виде ДНК-вакцины (рсDNA-ТС1).

В собранном виде вакцина КомбиВИЧвак представляет собой мицеллоподобные частицы размером от 40 до 100 нм, в центре которых находится ДНК-вакцина рсDNA-ТС1, покрытая оболочкой

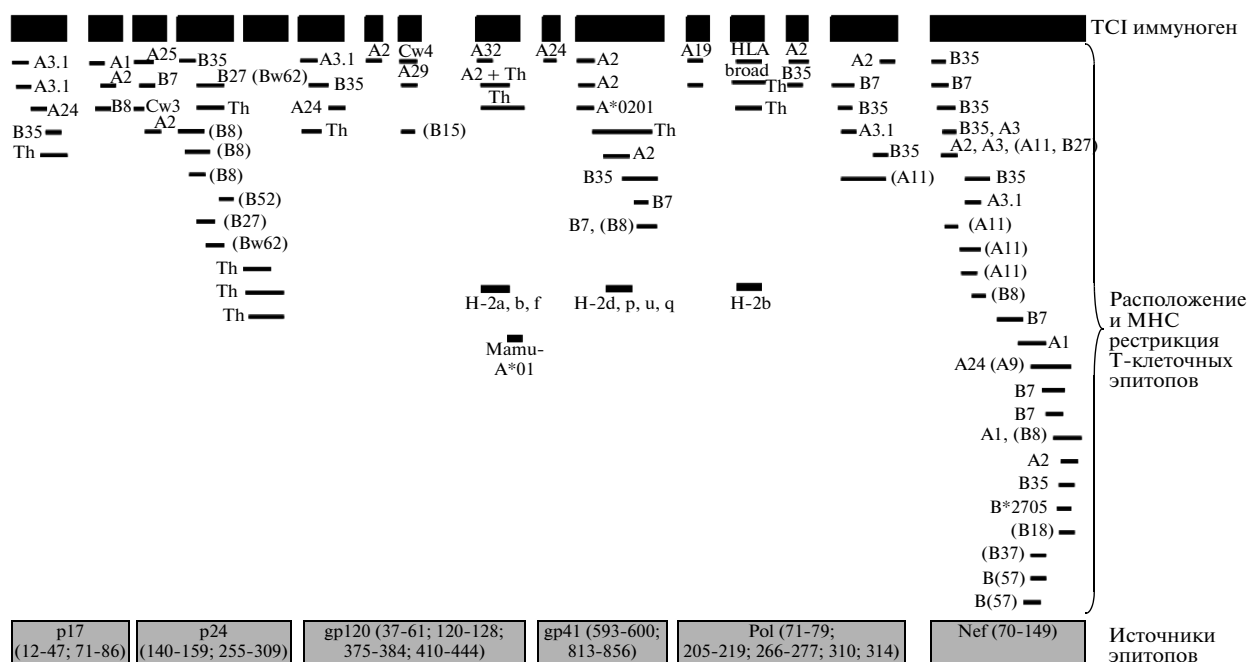


Рис. 2. Общий дизайн ТСИ-иммуногена. Прямоугольниками обозначены последовательности белков ВИЧ-1, содержащие выбранные эпитопы. Позиции индивидуальных эпитопов обозначены линиями. Рестрикция эпитопов по антигенам главного комплекса гистосовместимости человека, мышей и обезьян имеют следующие обозначения: HLA-A, B, Cw – для человека, H-2a, b, d, f, k, p, u, q – для мыши, Mamu-A*01 – для обезьян *Macaca mulatta*. Th – Т-хелперные эпитопы.

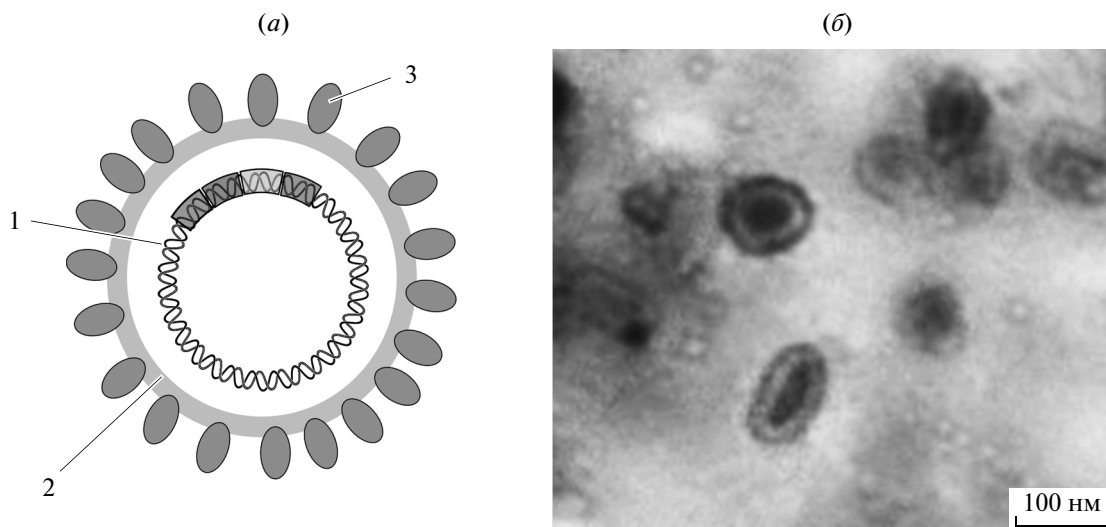


Рис. 3. Конструкция вакцины КомбиВИЧвак (а) и ее электронная фотография (б), полученная с помощью электронного просвечивающего микроскопа Libra 120 с Омега-фильтром (ZEISS, Germany): 1 – плазмидная ДНК, несущая ген ТСИ; 2 – конъюгат полиглюкин-спермидин; 3 – рекомбинантный белок ТФИ.

из конъюгата спермидин-полиглюкин-белок ТФИ (рис. 3) [22, 23, 39, 40].

На основе технологии получения рекомбинантной вакцины, включающей два полиэпитопных ВИЧ-специфических иммуногена, нами был отработан экспериментально-производственный ре-

гламент, позволивший приступить к выпуску опытных серий препарата КомбиВИЧвак. Разработанный проект фармацевтической статьи предприятия (ФСП), удовлетворял требованиям международной нормативной документации. Полученные нами серии препаратов вакцины анализировали на соот-

ветствие требованиям проекта ФСП по следующим показателям: внешний вид, подлинность, время растворения, прозрачность, цветность, механические включения восстановленного препарата, герметичность упаковки, рН восстановленного препарата, потеря массы при высушивании, количество белка по Лоури, содержание реополиглобулина, токсичность, стерильность, отсутствие микоплазм, пирогенность на кроликах, специфическая активность, содержание посторонних примесей (эндотоксинов, РНК штамма-продуцента, геномной ДНК штамма-продуцента).

Характеристика подлинности, кроме определения специфической активности препарата, включала рестрикционный анализ и секвенирование плазмидной ДНК – компонента вакцины. Наличие фрагментов плазмиды рсDNA-ТС1 с молекулярными массами, соответствующими теоретически рассчитанным, и совпадение нуклеотидных последовательностей в ДНК-вакцине, заложенных при ее проектировании, свидетельствовало о подлинности вакцины (рис. 4).

Высокая специфическая активность, отсутствие пирогенности и токсичности и соответствие другим требованиям ФСП позволили рекомендовать препарат вакцины для проведения клинических испытаний.

Клинические исследования

В соответствии с Протоколом клинического исследования “Испытание реактогенности, безопасности и иммуногенной активности вакцины “КомбиВИЧвак” на здоровых добровольцах” были проведены клинические исследования вакцины на базе ФГБУЗ МСЧ № 163 ФМБА России в соответствии с Разрешением Росздравнадзора РФ № 133 от 30 марта 2010 г. Дизайн исследования описан в разделе экспериментальная часть. Одна группа добровольцев (15 человек) была вакцинирована КомбиВИЧвак однократно, другая группа (15 добровольцев) (15 человек) – двукратно с интервалом 28 дней. Препарат вводился внутримышечно в дозе 50 мкг белка ТВ1/75 мкг ДНК рсDNA-ТС1, в объеме 0,2 мл.

Выбор количества рекомбинантного белка в одной дозе вакцины КомбиВИЧвак основывался на следующих данных. В процессе доклинического исследования для определения специфической активности вакцины было использовано несколько видов животных (мыши, кролики, приматы). Для адекватной оценки напряженности иммунитета при иммунизации животных проведены исследования с использованием нескольких доз рекомбинантного белка ТВ1. Анализ результатов, полученных в ходе проведенных исследований, свидетельствует о том, что при однократной иммунизации животных рекомбинантным

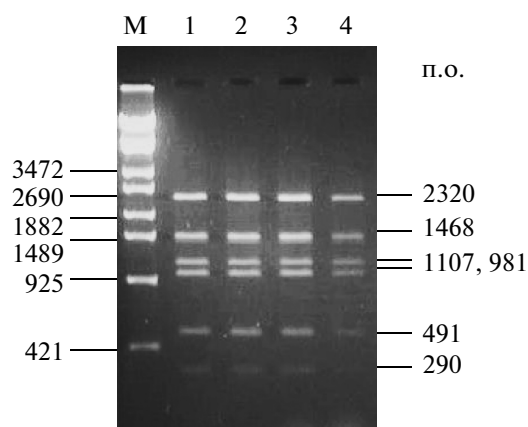


Рис. 4. Рестрикционный анализ (электрофореграмма ПААГ-электрофореза в 1% геле). Фрагменты ДНК после гидролиза плазмиды рсDNA-ТС1 эндонуклеазами рестрикции BglII–PstI. Цифрами слева указаны размеры фрагментов рестрикции плазмиды. М – маркеры λ ДНК/BssT11 (StyI). Фрагменты: 19329, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 421, 74. 1 – плаزمида рсDNA-ТС1 [27]; 2 – плазмида рсDNA-ТС1, коллекционный № Р-46; 3 – плазмида рсDNA-ТС1 (субстанция); 4 – вакцина КомбиВИЧвак.

белком ТВ1 наиболее оптимальная доза вакцины составляет 50 мкг/дозу. Результаты проведенных токсикологических доклинических исследований свидетельствовали о слабой реактогенности препарата в дозе 50 мкг. Эта доза была согласована с Национальным органом контроля (ГИСК им. Л.А. Тарасевича) и Министерством здравоохранения РФ.

Результаты клинических испытаний показали, что вакцина КомбиВИЧвак хорошо переносима и безопасна. Ни однократное, ни двукратное (с интервалом 28 дней) внутримышечное введение вакцины не вызывает существенных изменений биохимических и физиологических показателей в сравнении с фоновыми значениями. Местные реакции на введение вакцины отсутствовали. За все время наблюдения у добровольцев не было выявлено патологических изменений. Средние величины исследованных биохимических и общеклинических показателей либо находились в пределах физиологической нормы, либо имели пограничные с нормой значения. Какой-либо закономерности изменения показателей в зависимости от времени, прошедшего с момента иммунизации, не выявлено.

Иммунный статус добровольцев оценивали по содержанию различных популяций Т- (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺) и В- (CD20⁺) лимфоцитов и натуральных киллеров (CD16), а также иммунорегуляторному индексу (ИРИ) (отношению CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций лимфоцитов). Кроме того, оценивали активность клеточных эффекторных функций, включая индекс миграции (ИМ), индекс торможения миграции (ИТМ), показатель эффек-

Таблица 1. Иммунограмма однократно вакцинированных добровольцев

Показатели иммунного статуса	Медианное значение показателей (в скобках указан интервал значений)*	
	До вакцинации (контроль) <i>n</i> = 15	Через 12 месяцев после вакцинации <i>n</i> = 15
CD3 ⁺ -клетки (%)	67.0 (45.0–77.0)	66.0 (52.0–78.0)
CD4 ⁺ -клетки (%)	37.0 (25.0–50.0)	38.0 (27.0–48.0)
CD8 ⁺ -клетки (%)	29.0 (19.0–35.0)	25.0 (20.0–42.0)
ИРИ (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	1.30 (0.90–2.50)	1.5 (0.8–2.40)
CD16 ⁺ -клетки (%)	17.0 (12.0–38.0)	18.0 (7.0–33.0)
CD20 ⁺ -клетки (%)	10.0 (7.0–23.0)	13.0 (4.0–18.0)
Фагоцитирующие гранулоциты (от общего числа гранулоцитов) (%)	63.0 (47.0–84.0)	68.0 (31.0–77.0)
Фагоцитирующие моноциты (от общего числа моноцитов) (%)	46.0 (33.0–57.0)	38.0 (23.0–48.0)
ИМ	1.0 (0.57–1.4)	1.09 (0.83–1.30)
ИТМ	0.19 (0.09–1.03)	0.31 (0.16–4.0)
ПЭФ	6.1 (2.5–11.0)	3.0 (1.9–7.9)
ПАМ	2.7 (1.70–4.80)	2.1 (1.6–3.3)

* – Отличия значений иммунного статуса по всем показателям у добровольцев до и после вакцинации были недостоверны (значимость отличий определяли с помощью парного теста Уилкоксона).

торных клеток (ПЭФ) и показатель активации моноцитов (ПАМ). Показатель ИМ характеризует подвижность иммунокомпетентных клеток в ответ на стимулирующую дозу фитогемагглютинаина (ФГА), показатель ИТМ характеризует потенциальную активность лимфоцитов – продуцентов факторов торможения миграции (эффекторов гиперчувствительности замедленного типа – ГЗТ). ПЭФ – интегральный показатель активности ГЗТ-эффекторов (лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов). Показатели активации нейтрофилов (ПАН) и моноцитов (ПАМ) определяют состояние антибактериальной реактивности. Данные по фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов (содержание клеток, фагоцитировавших бактерии с флуоресцентной меткой при инкубации) позволяют оценить резервные возможности этих клеток по поглощению и перевариванию чужеродных агентов.

В группах как однократно, так и двукратно вакцинированных добровольцев значения исследуемых параметров не зависели от возраста и пола, что позволило объединить всех добровольцев независимо от пола и возраста в две испытываемые группы. Значения исследованных параметров иммунограммы двух групп тестируемых добровольцев полученные до начала вакцинации и через 12 мес. после вакцинации, представлены в табл. 1 и 2.

В течение периода наблюдений эти показатели претерпевали вполне закономерные изменения. Так, в группе однократно вакцинированных относительное содержание В-клеток (CD20⁺) достовер-

но возрастает с 10 до 15% ($p = 0.016$) к 3-му мес., а затем постепенно снижается до 13% к концу периода наблюдений. В группе двукратно вакцинированных количество В-клеток через две недели после второй вакцинации их количество сначала резко снижается с 14 до 9%, а потом увеличивается, достигая максимального значения 23% к 6-му мес. К концу периода наблюдений количество CD20-клеток снова снижается до 17%, оставаясь выше, чем исходный уровень (до начала вакцинации).

Важно отметить, что к концу наблюдений (12 мес.) все исследуемые показатели иммунного статуса возвращались к исходному уровню, регистрируемому до вакцинации (табл. 1 и 2).

При проведении первой фазы клинических исследований кроме безвредности вакцины КомбиВИЧвак оценивалась также ее специфическая активность. Проведенные исследования продемонстрировали, что вакцина КомбиВИЧвак индуцирует как гуморальный, так и клеточный ВИЧ-специфический иммунный ответ. Это было показано с помощью ряда методов, в том числе иммуноблоттинга, иммуноферментного анализа (ИФА), метода оценки способности сывороток нейтрализовать вирус с использованием псевдовирюсов, методами IFN- γ ELISpot и пептид-МНС-пентамеров с использованием проточной цитофлуориметрии.

С помощью ИФА специфический иммунный ответ был зарегистрирован начиная с 14-го дня после первой иммунизации, вторая иммунизация стимулировала иммунный ответ. В ИФА макси-

Таблица 2. Иммунограмма двукратно вакцинированных добровольцев

Показатели иммунного статуса	Медианное значение показателей (в скобках указан интервал значений)*	
	До вакцинации (контроль) n = 15	Через 12 месяцев после вакцинации n = 15
CD3 ⁺ -клетки (%)	68.0 (63.0–76.0)	62.0 (48.0–72.0)
CD4 ⁺ -клетки (%)	44.0 (38.0–60.0)	34.0 (26.0–51.0)
CD8 ⁺ -клетки (%)	23.0 (17.0–35.0)	23.0 (20.0–35.0)
ИРИ (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	2.0 (1.1–3.2)	1.4 (0.940–2.6)
CD16 ⁺ -клетки (%)	13.0 (8.0–22.0)	18.0 (7.0–31.0)
CD20 ⁺ -клетки (%)	14.0 (6.0–20.0)	17.0 (12.0–24.0)
Фагоцитирующие гранулоциты (от общего числа гранулоцитов), %	69.0 (55.0–88.0)	68.0 (56.0–85.0)
Фагоцитирующие моноциты (от общего числа моноцитов) (%)	55.0 (48.0–73.0)	43.0 (22.0–56.0)
ИМ	1.0 (0.5–1.3)	1.1 (0.96–1.3)
ИТМ	0.2 (0.11–0.75)	0.35 (0.19–0.6)
ПЭФ	4.80 (1.60–10.80)	3.2 (2.1–5.3)
ПАМ	1.90 (1.3–3.1)	1.9 (1.6–3.5)

* – Отличия значений иммунного статуса по всем показателям у добровольцев до и после вакцинации были недостоверны (значимость отличий определяли с помощью парного теста Уилкоксона).

мальный иммунный ответ наблюдали на 14-й день после второго введения вакцины. К концу срока наблюдения (один год) антитела детектировали у 29% добровольцев.

Для доказательства того, что при введении КомбиВИЧвак формируются антитела, способные узнавать нативный ВИЧ-1, мы использовали набор “New Lav blot” (Bio Rad), на стрипах которого сорбированы отдельные белки лизата вируса (рис. 5). С помощью иммуноблот-анализа было показано наличие антител к белкам ВИЧ-1 p17, p24, p55, p68, gp120, т.е. к тем белкам, эпитопы которых входят в состав В-клеточного компонента вакцины – белка ТВ1. Выраженность ответа среди добровольцев внутри одной группы была разной. При этом в течение одного года после второй иммунизации антитела хотя бы к одному из этих белков выявлялись у 100% добровольцев. Наиболее часто регистрировались антитела к белкам Gag – p55, p17, p24, причем раньше других появлялись антитела к белкам p17 и p24, затем антитела к белку p55, последними появлялись антитела к белкам p68 и gp120.

Очевидно, что для анализа эффективности вакцины наиболее важным показателем является не просто регистрация антител, которые узнают вирусные белки, а оценка способности этих антител нейтрализовать вирус.

Результаты нейтрализации вирусов, полученные с использованием панели псевдовирюсов, указывают на способность вакцины КомбиВИЧвак индуцировать антитела, способные нейтрали-

зовать ВИЧ-1 как субтипа А, так и субтипа В (табл. 3). Данные, представленные в табл. 3, показывают, что антитела, нейтрализующие клоны псевдовирюсов субтипов А (А/392 и А/SP2010), выявляются у большинства двукратно вакцинированных добровольцев. Меньше всего добровольцев имеют нейтрализующие антитела к клону PVO4 субтипа В, что соответствует данным литературы, согласно которым этот клон относится к группе трудно нейтрализуемых псевдовирюсов [41]. Как следует из таблицы 3, количество добровольцев, имеющих антитела, способные нейтрализовать вирус, сохраняется на постоянном уровне в первые три месяца после второй иммунизации. Далее количество добровольцев, имеющих антитела, нейтрализующие вирус, снижается, и к концу периода наблюдений (1 год) такие антитела не выявлялись ни у одного из добровольцев ни к одному из изученных клонов. Одной из задач последующих клинических испытаний будет совершенствование протокола иммунизации с целью усиления формирования пула антител, способных нейтрализовать вирус.

Результаты исследования Т-клеточного ответа методом IFN- γ ELISpot у двукратно вакцинированных добровольцев (табл. 3) показали, что ВИЧ-специфический ответ Т-лимфоцитов регистрируется у всех участников испытания (100%) с 14-го дня после первой вакцинации и остается достаточно высоким в течение шести месяцев после второй вакцинации. С использованием МНС-пентамеров в комплексе с пептидом ВИЧ-1 Env

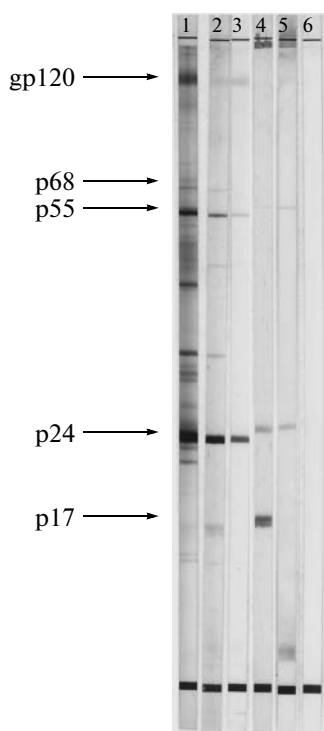


Рис. 5. Анализ с использованием набора New Lav Blot (Bio-Rad, Франция) сывороток, полученных на 14 день после второй вакцинации от добровольцев: 2/20 (2); 2/21 (3), 2/26 (4), 2/27 (5). 6 – сыворотка добровольца 2/26, полученная до начала вакцинации (отрицательный контроль); 1 – К+ (положительный контроль) из набора.

(KLTPLCVTL aa 120–128) у всех добровольцев (100%) было показано наличие KLTPLCVTL⁺ CD8⁺ Т-лимфоцитов вплоть до шести месяцев после второй вакцинации (табл. 3). Затем ВИЧ-специфический Т-клеточный ответ постепенно снижался до конца периода наблюдений (один год). Выпадающее значение на 90-е сутки связано с однократной невяжкой одного добровольца на тестирование.

Таким образом, в ходе проведения клинических испытаний было установлено, что вакцина КомбиВИЧвак является хорошо переносимой и безопасной (не вызывает существенных изменений биохимических и физиологических показателей в сравнении с фоновыми значениями), обладает низкой реактогенностью (местные реакции на введение вакцины отсутствуют), и главное – препарат вакцины способен вызывать формирование специфического гуморального и клеточного иммунного ответа.

Полученные результаты дали основание Минздравсоцразвития РФ рекомендовать вакцину для расширенных (II фаза) клинических исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали плазмиду рТВ1 и штамм-продуцент *E. coli* JM103/рТВ1 [34, 35], плазмиду рсDNA-ТС1 (ДНК-вакцина) и штамм-продуцент *E. coli* DH5αF'/рсDNA-ТС1 [26].

Работа проведена с применением реактивов BioRad и Sigma (США), Химпром (Россия), компонентов сред для культивирования бактерий фирмы “Sigma”. Все растворы готовили на деионизированной воде MilliQ. При проведении клинических испытаний вакцины были использованы стандартные клинические и лабораторные методы исследования на гематологическом анализаторе “Sysmex XS-1000i” (Sysmex Corporation, Япония) и автоматическом биохимическом анализаторе Cobas с 311 (Roche Diagnostics, Швейцария) с использованием стандартного набора реагентов (Roche Diagnostics, Швейцария).

Технологический процесс изготовления готовой формы вакцины включал следующие стадии: получение и аттестацию производственных штаммов-продуцентов, получение биомассы штаммов-продуцентов белка ТВ1 и плазмиды рсDNA-ТС1, выделение и очистку белка ТВ1 и плазмиды рсDNA-ТС1 из биомассы, получение конъюгата спермидин-полиглокин-ТВ1, сборка вакцины, розлив, лиофилизация, ампулирование, маркировку, контроль качества вакцины. Экспертный контроль нарабатываемых серий вакцины на соответствие ФСП и инструкции по изготовлению и контролю были проведены с учетом требований и рекомендаций ВОЗ. При этом показатели качества определяли как для готового продукта (вакцина КомбиВИЧвак), так и для ее компонентов (рекомбинантного белка ТВ1 и ДНК-плазмиды рсDNA-ТС1). В доклинических и клинических исследованиях были использованы серии вакцины, прошедшие контроль и экспертизу и удовлетворяющие необходимым показателям качества.

Очистка белка ТВ1

Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* JM 103/р ТВ1 проводили, как описано в работе [42]. Содержание белка ТВ1 в биомассе составляло 8–10% от суммы белков бактериальной клетки. Белок в клетке накапливался в виде телец включения. Белок экстрагировали из телец включения раствором 6 М мочевины и очищали с помощью двух последовательных хроматографий на DEAE-целлюлозе, как описано в [43]. Электрофоретическая чистота белка ТВ1 была не менее 97%, молекулярная масса 20–21 кДа. Наличие бактериальных эндотоксинов в препаратах белка определяли с помощью набора фирмы Associate of Cape Cod Inc., США в модификации гель-тромбо-метода (ЛАЛ-тест) по протоколу, рекомендованному производителем. Результаты ЛАЛ-теста полу-

Таблица 3. Оценка ответа ВИЧ-специфических Т-лимфоцитов и нейтрализующей вирус активности антител двукратно вакцинированных добровольцев

Вид анализа		Процент вакцинированных добровольцев, показавших положительные ответы							
		время после первой вакцинации (сутки)		время после второй вакцинации (сутки)					
		14	28	14	28	90	180	270	360
Нейтрализация вируса ¹⁾	B/SF162	–	–	71	71	71	64	57	0
	B/PVO4	–	–	36	36	29	29	15	0
	A/392	–	–	86	86	86	71	57	0
	A/SP2010	–	–	79	79	79	64	7	0
IFN- γ ELISpot ²⁾		71	79	100	93	86	79	50	43
МНС-пентамеры ³⁾		100	100	100	100	80	100	80	60

¹⁾ Нейтрализация вируса оценивалась в виде IC₅₀ при нейтрализации сыворотками крови добровольцев, вакцинированных КомбиВИЧвак, псевдовиральных клонов двух субтипов: субтипа А (SP-2010 и SP-392) и субтипа В (SF162 и PVO4). Реакция считалась положительной, если титр нейтрализации был выше или равен 1 : 100. На 14 и 28 день после начала иммунизации нейтрализующая активность сывороток была ниже, чем 1 : 100.

²⁾ Ответы в ELISpot считались положительными, если значения IFN- γ -продуцирующих клеток у вакцинированных добровольцев превышали значения в контроле в два раза.

³⁾ Представлены результаты определения ВИЧ-специфических CD8⁺-Т-лимфоцитов с использованием МНС-пентамеров в комплексе с пептидом ВИЧ-1 Env (KLTPLCVTL) у HLA-A*0201-позитивных добровольцев, двукратно вакцинированных КомбиВИЧвак.

ченных образцов белка удовлетворяли требованиям по содержанию липополисахаридов (ЛПС) – менее 25 единиц эндотоксина (ЕЭ)/мг) [43].

Очистка плазмидной ДНК pcDNA-TCI

Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* DH5 α F'/pcDNA-TCI проводили в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C в ферментере (Ультроферм, Швеция) с рабочим объемом 10 л. Содержание плазмиды pcDNA-TCI составляло около 1 мг на 1 г биомассы.

Выделение и очистку плазмиды pcDNA-TCI из биомассы проводили согласно разработанному нами протоколу [44], который включал стадии щелочного лизиса, удаления РНК и дробное фракционирование спиртом. Последовательное осаждение плазмидной ДНК этанолом приводит практически к полному удалению из раствора примесей геномной ДНК *E. coli* и белков, а также более 99% ЛПС. Очищенные препараты плазмиды pcDNA-TCI характеризовали спектрофотометрически, ПААГ-электрофорезом в 1% геле, рестрикционным анализом и секвенированием.

Полученные образцы плазмидной ДНК анализировали на наличие примесей геномной ДНК *E. coli* с помощью количественной ПЦР, используя праймеры для гена 23S рибосомальной ДНК *E. coli* (прямой, 5'tgccaagcaggtcatagtg3' и обратный, 5'acactactcagccccaggat3'). Белковые примеси в плазмиде выявляли флуоресцентным методом

на флуориметре VersaFluor™ (Fluorometer, Bio-Rad, США) с использованием набора "NanoOrange Protein Quantitation Kit" согласно инструкции производителя. Наличие бактериальных эндотоксинов в препаратах ДНК определяли с помощью LAL-теста, результаты которого показали, что содержание ЛПС в одной дозе вакцины – менее 25 ЕЭ.

Сборка вакцины КомбиВИЧвак

Центральным ядром кандидатной вакцины КомбиВИЧвак является ДНК плазмиды pcDNA-TCI, а оболочкой является конъюгат декстрана с белком ТВИ и спермидином. Для получения конъюгата к 60 мг декстрана (*M* 60 кДа), растворенного в 0.8 мл воды добавляли 10.7 мг периодата натрия, растворенного в 0.2 мл воды. Полученный раствор инкубировали (22°C, 30 мин), затем активированный декстран отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, используя карбонатный буфер (25 мМ, рН 8.6). К раствору активированного декстрана (1.5 мл) добавляли 20 мл карбонатного буфера, содержащего 21 мг (1 мкмоль) белка ТВИ и 1.45 мг (10 мкмоль) спермидина. Смесь инкубировали при перемешивании в течение 5 ч, затем добавляли 10 мг боргидрида натрия, растворенного в 0.2 мл воды, перемешивали еще 2 ч и образовавшийся конъюгат отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, используя изотонический раствор

NaCl (ФР). Для сборки вакцины КомбиВИЧвак к раствору, содержащему 32 мг ДНК рсDNA-TCl (7.2 нмоль) в ФР, добавляли синтезированный конъюгат (23 мл), смесь инкубировали 2 ч при 4°C. Полученную конструкцию отделяли от несвязавшихся компонентов гель-фильтрацией на колонке (200 мл) с сефарозой CL-6B, в ФР. Полученный раствор разбавляли ФР из расчета, чтобы одна доза вакцины объемом 0.2 мл содержала 75 мкг рекомбинантной плазмидной ДНК рсDNA-TCl и 50 мкг рекомбинантного белка ТВ1.

Эксперименты по выбору дозы вакцины были проведены ранее на модели лабораторных животных и представлены в Отчете о доклиническом изучении (специфическая активность) вакцины КомбиВИЧвак, вошедшим в досье и пакет документов, представленных в Минздравсоцразвития России в ходе получения разрешения на клинические испытания.

Контроль качества вакцины КомбиВИЧвак

В процессе отработки технологии производства компонентов вакцины, готовой лекарственной формы, проводили контроль серий вакцины и экспертизы нормативной документации: (ФСП, инструкции по изготовлению и контролю и др.). В результате проведенной совместной работы с Национальным органом контроля – ГИСК им. Л.А. Тарасевича были разработаны требования к вакцине и методы контроля, которые вошли в проект ФСП. Каждую изготовленную серию вакцины, которая была использована в доклинических и клинических испытаниях, подвергали контролю качества согласно требованиям, заложенным в ФСП.

Вакцина представляет собой однородную пористую массу белого цвета со слабо желтым оттенком, при растворении в воде образуется слабо опалесцирующая жидкость. Вакцина индуцирует формирование специфических антител к ВИЧ-1, которые определяются в ИФА и иммуноблоттинге, согласно методикам, описанным ранее в руководстве [43].

Подлинность ДНК-вакцины рсDNA-TCl подтверждали с помощью рестрикционного анализа и секвенирования на секвенаторе ABI 3730XL Genetic Analyser, Applied Biosystems в Центре коллективного пользования “Геномика” СО РАН (г. Новосибирск).

Количественная характеристика рекомбинантного белка ТВ1 включала определение его содержания. Согласно требованиям проекта ФСП значение белка в сериях препарата составляло от 45 до 55 мкг/доза.

Важными показателями качества, влияющими на свойства препарата, являются pH восстановленного препарата; потеря массы при высушивании, стерильность; отсутствие микоплазм и пи-

рогенности; наличие эндотоксинов, токсичность для животных. Значения pH всех изготовленных серий, использованных для проведения доклинических и первой фазы клинических исследований, укладывалось в интервале от 6.8 до 7.8. Потеря массы при высушивании вакцины не превышала 3%. Вакцина была стерильна, не содержала микоплазм; была апиrogenной при введении одной прививочной дозы одному кролику и не токсична для мышей и морских свинок. Содержание эндотоксинов в ЛАЛ-тесте соответствовало ФСП и не превышало 25 ЕЭ/на дозу вакцины.

Также важными являются требования к составу вспомогательных веществ. Так, содержание вспомогательного вещества реополиглобулина составляло 8–12 мг/дозу, что соответствовало требованиям проекта ФСП.

Одним из важных показателей качества рекомбинантных препаратов является содержание посторонних примесей: оценивали содержание РНК-штамма-производителя методом электрофореза в 1% агарозном геле, и в соответствии с требованиями ФСП отсутствовала диффузная полоса в геле в области 200–500 пар нуклеотидов, соответствующая по подвижности РНК. Содержание в препарате вакцины геномной ДНК-штамма-производителя, определяемое методом количественной ПЦР, не превышало 1%.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Этические вопросы и разрешение контролирующих органов

Одобрение клинического исследования было получено от Комитета по медицинской этике при ГИСК им. Л.А. Тарасевича (протокол № 66 от 04.12.2009), от Комитета по Этике при Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ (протокол № 58 от 10.03.2010) и от Совета по этике при Минздравсоцразвитии Российской Федерации (внесение дополнений в протокол № 15 от 20.05.2011).

Протокол клинического исследования был также согласован с Комитетом медицинских иммунобиологических препаратов Минздравсоцразвития России (протокол № 6 от 24.12.2009), одобрен Ученым советом ГИСК им. Л.А. Тарасевича (протокол № 16 от 11.12.2009) и Федеральным государственным учреждением “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” (ФГУ “НЦЭСМП”), выписка из заседания Бюро от 4.03.2010.

Исследование проводили в соответствии с Правилами клинической практики в РФ, утвержденными Приказом Министерства Здравоохранения РФ № 266 от 19.06.2003 г. ГОСТ-Р 552379-2005 “Надлежащая клиническая практика”; разрешением Федеральной службы по надзору в сфере здраво-

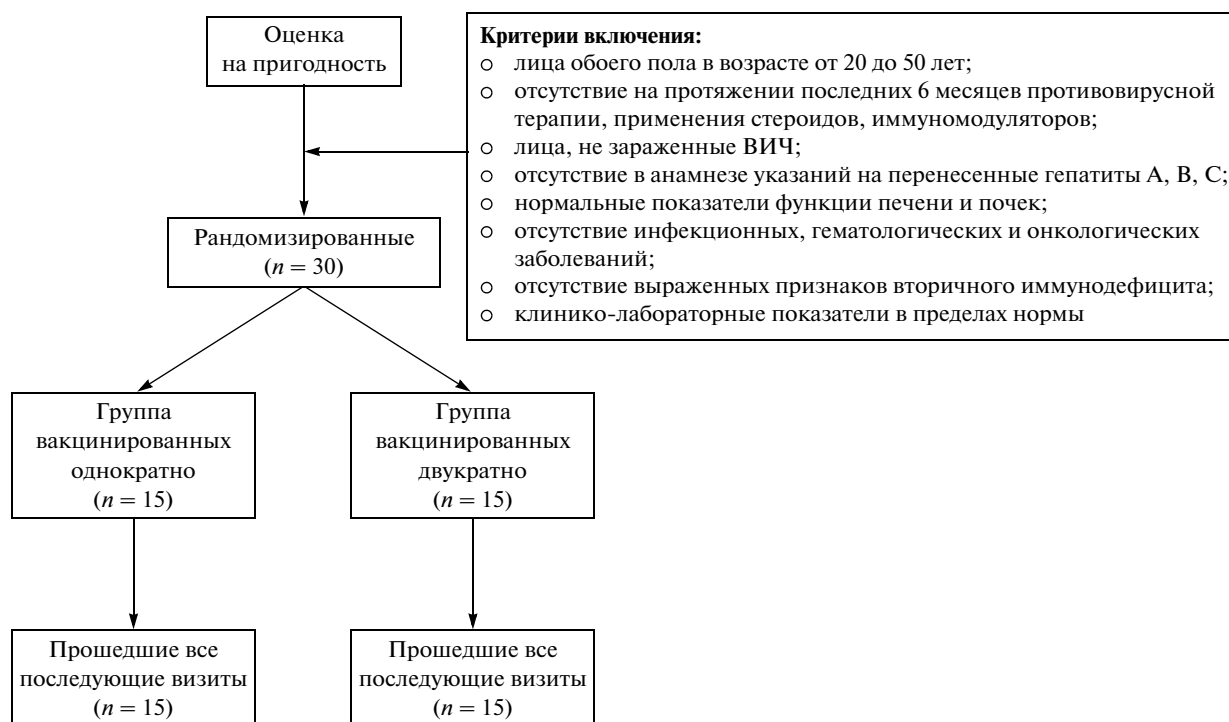


Рис. 6. Профиль испытаний. Схема, характеризующая группы добровольцев – участников клинического испытания. Критерии включения и формирование групп добровольцев.

охранения и социального развития Минздравсоцразвития РФ № 133 от 30 марта 2010 г. и всеми применимыми в данном случае правилами, включая Хельсинскую декларацию, принятую в июне 1964 г. с поправками, внесенными 48-ой конференцией Всемирной Медицинской ассоциации, ЮАР, 1996 г.). Исследование было зарегистрировано в реестре клинических исследований Минздравсоцразвития РФ.

Дизайн исследования

В исследовании приняли участие 30 здоровых добровольцев мужского (20 человек) и женского (10 человек) пола в возрасте от 18 до 49 лет. Включение добровольцев в клиническое исследование осуществляли согласно критериям включения (рис. 6). Допущенные до клинических исследований добровольцы методом случайного выбора были разделены на две опытные группы. Одну группу (15 добровольцев) составили участники, получившие препарат КомбиВИЧвак однократно, в другую группу (15 добровольцев) вошли участники, вакцинированные двукратно с интервалом 28 сут. Препарат вводился внутримышечно в дозе 50 мкг белка ТВ1/75 мкг ДНК рсDNA-ТС в объеме 0.2 мл.

Показатели местной реакции на введение вакцины оценивали по возникновению отека, боли и

зуда, гиперемии, увеличению региональных лимфатических узлов, их болезненности.

Безопасность и переносимость. Для оценки переносимости у добровольцев регистрировали следующие показатели: температуру тела; артериальное давление, частоту пульса, ЭКГ; реакции кожи и слизистых; наличие или отсутствие головной боли, тошноты, рвоты; общий анализ мочи (содержание белка, глюкозы, удельный вес); общий анализ крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитов, лейкоцитарная формула, скорость свертывания крови); клинический биохимический анализ крови (аланинаминотрансфераза; аспартатаминотрансфераза, содержание белка, глюкозы, креатинина, холестерина, билирубина).

Оценка состояния иммунной системы. Клеточное звено иммунитета оценивали по относительному (в процентах) содержанию $CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ -лимфоцитов, ИРИ, равному соотношению $CD4^{+}/CD8^{+}$, а также относительному содержанию натуральных киллеров ($CD16^{+}$ -клетки) и В-лимфоцитов ($CD20^{+}$). Для этого использовали соответствующие моноклональные антитела фирмы “Becton Dickinson” (США). Окрашенные клетки анализировали на проточном цитофлуориметре “FACScan” (Becton Dickinson).

Оценку активности клеточных эффекторных функций проводили с помощью следующих по-

казателей: индекса миграции (ИМ), индекса торможения миграции (ИТМ) и показателя эффекторных клеток (ПЭФ), показателю активации моноцитов (ПАМ).

Показатель ИМ характеризует подвижность иммунокомпетентных клеток в ответ на стимулирующую дозу ФГА. Определение ИТМ основано на оценке способности сенсibilизированных Т-лимфоцитов в реакциях с ФГА *in vitro* выделять лимфокины, ингибирующие миграцию лейкоцитов. ПЭФ – интегральный показатель активности ГЗТ-эффекторов (лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов), его высчитывают по формуле $PЭФ = A/B$, где А – отношение количества клеток со стимулирующей дозой ФГА к таковому в контроле; В – отношение количества клеток с ингибирующей дозой ФГА к таковому в контроле. Функциональную активность фагоцитарных клеток оценивали по показателю активации моноцитов (ПАМ), определяемому по продукции перекиси водорода клетками после стимуляции зимозаном [45].

Гуморальный иммунный ответ оценивали с помощью методов иммуноблот-анализа, ИФА [45] и по способности сывороток нейтрализовать вирус с использованием технологии ВИЧ-псевдовирусов. Выявление антител к индивидуальным белкам ВИЧ-1 в иммуноблоттинге проводили с использованием тест-системы “New-Lav-Blot1” (Bio-Rad, Франция) согласно инструкции фирмы-изготовителя. Антигенной основой тест-системы являются белки культурального вируса ВИЧ-1, сорбированные на нитроцеллюлозе. Реакцию учитывали, сравнивая расположение полосок на стрипе с образцом, приложенным к тест-системе (рис. 5).

ИФА осуществляли по методике, описанной ранее [45], в качестве антигена использовали рекомбинантный белок ТВ1 в концентрации 1 мкг/мл. Способность сывороток крови добровольцев нейтрализовать вирус оценивали с применением четырех Env-клонов псевдовирусов ВИЧ-1 на основе двух вирусных субтипов: субтипа А (SP-2010 и SP-392) и субтипа В (SF162 и PVO4) [34]. Постановку реакции проводили в соответствии с рекомендациями, описанными в руководстве [41].

Т-клеточный иммунный ответ у вакцинированных добровольцев исследовали с помощью методов IFN- γ ELISpot и пептид-МНС-пентамеров с использованием свежeweделенных мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) [45]. Анализ IFN- γ ELISpot проводили с применением наборов фирмы “Veston Dickinson” согласно инструкции производителя. Результаты учитывали на ELISpot-анализаторе фирмы Carl Zeiss (Германия). Для стимуляции клеток использовали смесь пяти пептидов из белков ВИЧ-1, входящих в последовательность белка ТС1: EPFRDYVDRF, СТЕМЕКЕКГKISKIGP, DRVIEVVQGAYRAIR,

KLTPLCVTL и SLYNTVATL (ООО “Синтез”, Россия) в концентрации 10 мкг/мл каждого пептида. Уровень ответа считали положительным, если среднее значение стимулированного ответа минимум в два раза превышало уровень фона. Для определения количества ВИЧ-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов у вакцинированных добровольцев проводили окрашивание РВМС моноклональными анти-CD8 антителами, меченными FITC (ProImmune, Великобритания), и Pro5 рекомбинантными МНС-пентамерами, меченными PE в комплексе с пептидом Env ВИЧ-1 KLTPLCVTL (ProImmune). Перед этим предварительно проводили HLA-генотипирование добровольцев при помощи метода ПЦР, так как пептид-МНС-пентамерные комплексы являются специфичными к аллелю HLA A*0201. В группе добровольцев, вакцинированных однократно, генотипом HLA A*02 обладали 6 человек, и в группе добровольцев, вакцинированных двукратно, также 6 человек. Процедуру окрашивания РВМС осуществляли согласно рекомендации производителя (ProImmune). Окрашенные клетки регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSAria (США), сигнал обрабатывали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva (США). Фоновый уровень KLTPLCVTL-специфичных CD8⁺-Т-клеток у исследуемых участников испытаний составил $\leq 0.1\%$ от общего количества CD8⁺-Т-лимфоцитов перед началом вакцинации.

Статистическая обработка результатов иммуногенности вакцины включала в себя вычисление средних значений в каждой группе добровольцев и среднестатистических отклонений ($M \pm m$) с использованием пакета программ для статобработки Microsoft Excel.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Распоряжения правительства Российской Федерации № 1905; часть работы, связанной со статистической обработкой результатов была проведена при поддержке гранта РНФ 14-14-00660.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. Справка “ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2014 г.”. М., 2013. 4 с. URL: <http://hivrussia.ru>
2. Girard M.P., Osmanov S., Assossou O.M., Kieny M. // Vaccine. 2011. V. 29. P. 6191–6218.
3. O’Connell R.J., Kim J.H., Corey L., Michael N.L. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. V. 2. P. a007351.
4. Haynes B.F., Moody M.A., Alam M., Bonsignori M., Verkoczy L., Ferrari G., Gao F., Tomaras G.D., Liao H.X.,

- Kelsoe G.* // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. V. 134. P. 3–10.
5. *Esparza J.* // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 124.
 6. *Hanke T.* // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2014. V. 5. P. 601–616.
 7. *Thakur A., Pedersen L.E., Jungersen G.* // *Vaccine.* 2012. V. 30. P. 4907–4920.
 8. *Esparza J.* // *Vaccine.* 2013. V. 31. P. 3502–3518.
 9. *Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., Kaewkungwal J., Chiu J., Paris R., Premisri N., Namwat C., de Souza M., Adams E., et al.* // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 361. P. 2209–2220.
 10. *McMichael A.J., Haynes B.F.* // *Nat. Immunol.* 2012. V. 13. P. 423–427.
 11. *Koup R.A., Douek D.C.* // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011. V. 1. P. a007252.
 12. *Karpenko L.I., Bazhan S.I., Antonets D.V., Belyakov I.M.* // *Expert Rev. Vaccines.* 2014. V. 13. P. 155–173.
 13. *Mann J.K., Ndung'u T.* // *J. Virol.* 2015. V. 12. P. 3.
 14. *Bazhan S.I., Karpenko L.I., Ilyicheva T.N., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Antonets D.V., Ilyichev A.A.* // *Mol. Immunol.* 2010. V. 47. P. 1507–1515.
 15. *Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Zaitsev B.N., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Bazhan S.I.* // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 1692–1699.
 16. *Reguzova A.Y., Karpenko L.I., Mechetina L.V., Belyakov I.M.* // *Expert Rev. Vaccines.* 2015. V. 14. P. 69–84.
 17. *Karpenko L.I., Scherbakova N.S., Chikaev A.N., Tumanova O.Y., Lebedev L.R., Shalotova L.A., Pyankova O.G., Ryzhikov A.B., Ilyichev A.A.* // *Mol. Immunol.* 2012. V. 50. P. 193–199.
 18. *McMichael A.J., Haynes B.F.* // *Nature Immunology.* 2012. V. 13. P. 423–427.
 19. *Rosario M., Bridgeman A., Quakkelaar E.D., Quigley M.F., Hill B.J., Knudsen M.L., Ammendola V., Ljungberg K., Borthwick N., Im E.J., et al.* // *Eur. J. Immunol.* 2010. V. 40. P. 1973–1984.
 20. *Fischer W., Perkins S., Theiler J., Bhattacharya T., Yusim K., Funkhouser R., Kuiken C., Haynes B., Letvin N.L., Walker B.D., Hahn B.H., Korber B.T.* // *Nature Medicine.* 2007. V. 13. P. 100–106.
 21. *Sandstrom E., Nilsson C., Hejdeman B., Brave A., Bratt G., Robb M., Cox J., VanCott T., Marovich M., Stout R., et al.* // *J. Infectious Diseases.* 2008. V. 198. P. 1482–1490.
 22. *Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K. et al.* // *Vaccine.* 2007. V. 25. P. 4312–4323.
 23. *Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ерошкин А.М., Лебедев Л.Р., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Плясунова О.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К. и др.* // Докл. Акад. наук. 2007. Т. 413. С. 553–556. (*Karpenko L.I., Bazhan S.I., Eroshkin A.M., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Nekrasova N.A., Plyasunova O.A., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K. et al.* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007. V. 413. P. 65–67.)
 24. *Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Некрасова Н.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Ерошкин А.М., Ильичев А.А.* Рекомбинантная вакцина против вируса иммунодефицита человека 1 типа. Приоритет на патент от 10.01.06, № 20610808. Патент РФ № 2317107 от 20.02.08 г.
 25. *Каплина О.Н., Карпенко Л.И., Орешкова С.Ф., Богрянцева М.П., Гамидова И.С., Фрумузаки О.С., Ильичев А.А.* // *Вестн. Урал. мед. академич. науки.* 2011. № 3/1. С. 83–84.
 26. *Bazhan S.I., Karpenko L.I., Lebedev L.R., Uzhachenko R.V., Belavin P.A., Eroshkin A.M., Ilyichev A.A.* // *Mol. Immunol.* 2008. V. 45. P. 661–669.
 27. *Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A.* // *Vaccine.* 2004. V. 22. P. 1672–1682.
 28. *Бажан С.И., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Бабкина И.Н., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Агафонов А.П., Игнатъев Г.М., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С.* // Докл. Акад. наук. 2004. Т. 395. С. 825–827. (*Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Agafonov A.P., Ignat'ev G.M., I'ichev A.A., Sandakhchiev L.S.* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2004. V. 395 P. 108–110.)
 29. *Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Игнатъев Г.М., Агафонов А.П., Белавин П.А., Серегин С.С., Данилюк Н.К., Бажан С.И.* // *Вестн. РАМН.* 2005. Т. 1. С. 41–44.
 30. *Карпенко Л.И., Богрянцева М.П., Бажан С.И., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Костылева Р.Н., Плясунова О.А., Ильичев А.А.* // *Российский иммунологический журнал.* 2008. Т. 2. С. 267.
 31. *Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Терещенко Т.А., Даниленко Е.Д., Левагина Г.М., Веремейко Т.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К. и др.* // *Физиология и патология иммун. системы.* 2006. Т. 9. С. 3–9.
 32. *Карпенко Л.И., Бажан С.И., Ужаченко Р.В., Некрасова Н.А., Лебедев Л.Р., Агафонов А.П., Веремейко Т.А., Левагина Г.М., Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Богрянцева М.П., Плясунова О.А., Ильичев А.А.* // *Биопрепараты.* 2006. № 4. С. 8–11.
 33. *Карпенко Л.И., Бажан С.И., Некрасова Н.А., Юдина О.С., Ключ Б.П., Веремейко Т.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Лебедев Л.Р. и др.* // *Физиология и патология иммун. системы.* 2005. Т. 9. С. 90–95.
 34. *Рыжиков А.Б., Саркисян К.А., Карпенко Л.И., Пьянкова О.Г., Шаламова Л.А., Борисевич И.В., Воробьева М.С., Богрянцева М.П., Ильичев А.А., Монтефиори Д.С., Нечаева Е.А.* // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012. № 2. С. 70–75.
 35. *Саркисян К.А., Воробьева М.С., Борисевич И.В., Карпенко Л.И., Богрянцева М.П., Каплина О.Н., Ильичев А.А.* // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012. № 1. С. 64–68.
 36. *Eroshkin A.M., Zhilkin P.A., Shamin V.V., Korolev S., Fedorov V.B.* // *Protein Eng.* 1993. V. 6. P. 997–1001.

37. Eroshkin A.M., Karginova E.A., Gileva I.P., Lomakin A.S., Lebedev L.R., Kamyinina T.P., Pereboev A.V., Ignat'ev G.M. // Protein Eng. 1995. V. 8. P. 167–173.
38. Бажан С.И., Белавин П.А., Серегин С.В., Бабкина И.Н., Данилюк Н.К., Сандахчиев Л.С. Искусственный белок-иммуноген TCI, содержащий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, искусственный ген TCI, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген TCI. Приоритет на патент от 22.04.02, № 20211080. Патент РФ № 2238946 от 27.10.04 г.
39. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Лебедев Л.Р., Некрасова Н.А., Белавин П.А., Серегин С.В., Данилюк Н.К., Ерошкин А.М., Ильичев А.А. Рекомбинантная вакцина против вируса иммунодефицита человека 1 типа. Патент РФ № 2317107; МПК А61К39/21, опубл. 20.02.2008 г. Бюл. № 5. 12 с.
40. Karpenko L.I., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Pronyaeva T.R., Ryabchikova E.I., Pokrovsky A.G., Ilyichev A.A. // Vaccine. 2003. V. 21. P. 386–392.
41. Montefiori D.C. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 485. P. 395–405.
42. Akulova N.I., Kashperova T.A., Volosnikova E.A., Lebedev L.R. Biochemistry and Biotechnology: Research and Development / Eds. Varfolomeev S.D., Zaikov G.E., Krylova L.P. (Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia). New York: Nova Science Publishers, 2012. P. 25–34.
43. Волосникова Е.А., Лебедев Л.Р., Акулова Н.И. // Биотехнология. 2010. № 4. С. 65–68.
44. Лактионов П.П., Ильичев А.А., Бондарь А.А., Черпанова А.В., Скворцова Т.Э., Карпенко Л.И., Черноусова В.С., Морозкин Е.С., Бажан С.И., Орешкова С.Ф., Нечаева Е.А., Дроздов И.Г., Власов В.В. Способ получения плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Патент РФ № 2408729; МПК C12N15/10, опубл. 10.01.2011 г. Бюл. № 1. 8 с.
45. Миронов А.Н., Меркулов В.А. и др. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К, 2013. 212 с.

Combined Vaccine Against Hiv-1 Based on Artificial Polyepitope Immunogens: Results of the Phase I Clinical Trials

L. I. Karpenko^{*,#}, S. I. Bazhan^{*}, M. P. Bogryantseva^{*}, N. N. Ryndyuk^{**}, Z. I. Ginko, V. I. Kuzubov^{**}, L. R. Lebedev^{*}, O. N. Kaplina^{*}, A. Yu. Reguzova^{*}, A. B. Ryzhikov^{*}, S. V. Usova^{*}, S. F. Oreshkova^{*}, E. A. Nechaeva^{*}, E. D. Danilenko^{*}, A. A. Ilyichev^{*}

[#]E-mail: karpenko@vector.nsc.ru

^{*}Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

^{**}163 Medical Unit of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630090 Russia

Candidate vaccine CombiHIVvac against HIV-1/AIDS is described comprising two artificial polyepitope immunogens TBI and TCI for stimulating humoral and cell responses. Recombinant protein TBI is constructed in the form of polypeptide with previously fixed tertiary structure and contains epitopes from HIV-1 proteins Env and Gag. In the compound of TCI epitopes (both CD8⁺ CTL and CD4⁺ Th) were included from the basic proteins Env, Gag, Pol, and Nef that are highly conservative for three HIV-1 subtypes (A, B, and C). Gene encoding polyepitope immunogen TCI was inserted into vector plasmid pcDNA-3.1. Vaccine CombiHIVvac is made as artificial virus-like particles with plasmid pcDNA-TCI in their center (DNA-vaccine) and TBI protein conjugated with polyglucin on their surface. During preclinical studies conducted in several animal species CombiHIVvac immunogenicity and safety was demonstrated. The phase I clinical trials of vaccine has been completed. Results of the studies confirm a fact that candidate vaccine CombiHIVvac is safety and does not cause side effects and induces HIV-specific humoral and cell responses. Phase II clinical trial has been approved by Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation.

Keywords: HIV vaccine, artificial polyepitope immunogens, DNA-vaccine, HIV-1 virus like particles, phase I clinical trials