

Ваксини

и вирусно антигенно разнообразие при COVID-19

Драгомира Николова

Пандемията разтърси привичния живот като неочаквана и за мнозина непонятна стихия, а това породу нейна особена митология. И желанието за спасение някак неусетно се превърна в нещо като вяра във Ваксината, която ще дойде едва ли не като „Пришествие свише“, за да ни върне към нормалния живот, който гнес, с все по-строгите ограничения, ни изглежда все по-примамлив. Натоварена с подобни очаквания, Ваксината си остава непонятна като самия вирус и може би затова се вярва, че тя е способна да се стовари върху него поне със същата сила, с която той се нахвърли върху хората. Това, разбира се, е интелектуална клопка, в която ни вкарва нашето объркано съзнание. Както и обратният вариант – да смяташ, че ваксината е заговор срещу човечеството и начин за „чипиране“. Всъщност Ваксината не е нито чудотейна, нито всесилна. Тя е продукт на науката, има както своите възможности, така и своите ограничения.

През 1989-а имунологът Чарлз Джейнудей (Charles Janeway) публикува статия за една важна промяна в сферата на имунологията. Дотогава се е смятало, че имунната система реагира на всички „чужди, не-свои частици“ като вируси, бактерии и паразити. Джейнудей разкрива т.нар. „мръсна тайна на имунната система“ – тя не реагира на всички чужди частици. Тя реагира само на онези чужди частици, които **възприема като опасни**.

Имунната система има свойството не само да категоризира антигените на „чужди“ и „свои“, но и да прави разлика между тях. Тя „различава“ вируси от

паразити и респективно активира различни свои клонове за специфична борба с тях. Ваксините работят на принципа на въвеждане в организма на „безопасна“ версия на реалния патоген. При това имунната система „помни“ срещата си с патогена и реагира по-ефективно при повторна среща с него, като така генерира имунна памет. Имунната система реагира само ако детектира наличие на „сигнал за опасност“. Следователно, ролята на ваксината е да „убеди“ имунната система, че **заплахата е реална**.

Ето защо най-важно при създаването на една ваксина е балансът в дизайна, за

да се постигне максимална протекция при минимални странични ефекти. Два от най-дискутираните странични ефекти са анафилаксията (тежка алергична реакция) и синдромът на Гилен-Баре (Guillain-Barré, възпаление на нервите). Те обаче възникват с честота, по-ниска от 1 на 500 000 дози.

Ваксините безспорно са необходими, за да постигнем контрол над коронавирусната пандемия. Затова както науката, така и фармацевтичната индустрия се впуснаха в оспорвана борба за създаване и производство на ваксини. Някои от тях вече са в масова употреба, а в момента се разработват и тестват и други, доста по-различни видове ваксини. Важно е да се знае кои са таргетните молекули за изготвяне на ваксини срещу COVID-19, защо и какво е значението им в протективния имунитет.

SARS-CoV-2 е член на семейство *Coronaviridae*, което включва много вирусентни щамове, засягащи хора и животни, вкл. SARS-CoV и CoV (MERS-CoV). За да се създаде ваксина срещу всеки нов вирус, е необходимо да се познават начините за имунна протекция спрямо него. Данните досега показват роля и на хуморалния (вроген) и на клетъчния (придобит) имунитет спрямо вируса. Доказана е връзка между ваксина-индуцираните неутрализиращи антитела и намаляването на вирусния товар при примати, както и положителният ефект на IgG антитела, изолирани от плазма, за терапия и превенция на инфекция със SARS-CoV-2. В допълнение към антителата, Т-клетките играят критична протективна роля при тази инфекция. При пациенти наличието на вирус-специфични CD4⁺ и CD8⁺ Т клетки се асоциират с по-леко протичане, което показва ролята на протективния имунитет срещу COVID-19. *Следователна идеалната вакси-*



Драгомира Николова е молекулярен биолог със защитена докторантура в областта на онкогенетиката. Преподавател по „Медицинска генетика“ към Медицински университет – София. Специализирала е различни методи на генетичен анализ на човешкия геном в Лаборатория по молекулярна медицина в Токио (Япония), както и биоинформатичен анализ в Лаборатория за анализ на геномни данни в институт Сан Рафаеле, Милано (Италия).

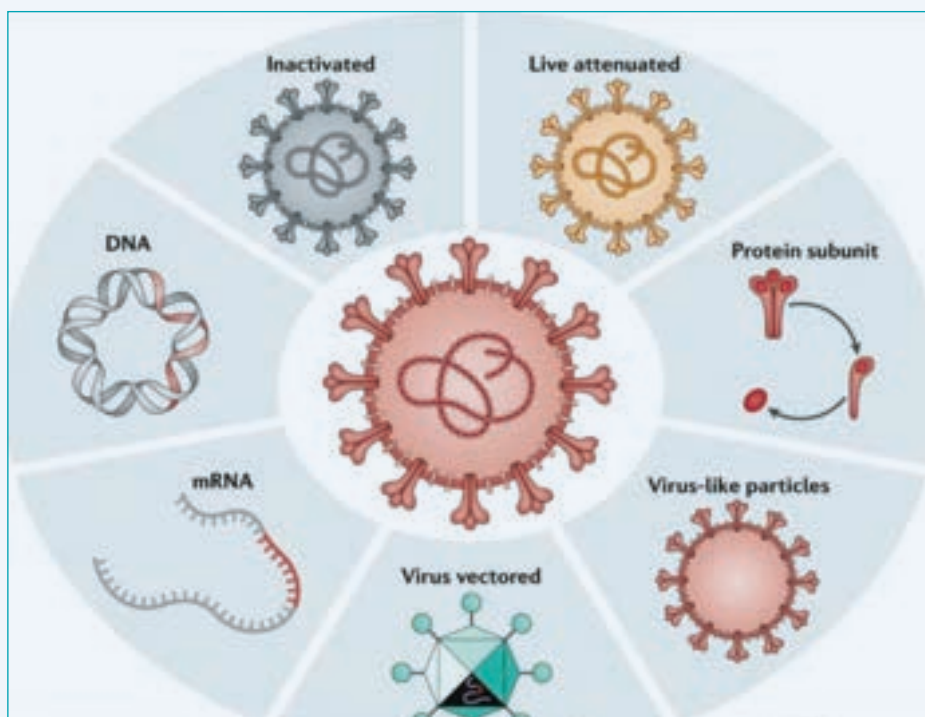
на би била тази, която би активирала и хуморалния и клетъчния клон на имунната система.

Основно, ваксините срещу COVID-19 могат да се разделят в три големи категории:

1. Протеин-базирани ваксини, които генерират таргетни антигени *ин витро* като инактивирани вирусни ваксини, вирус-подобни частици или ваксини, съдържащи вирусни протеинови елементи;
2. Генно-базирани ваксини, които внасят в организма гени, кодиращи вирусни антигени в гостоприемни-ковите клетки като векторни ваксини, ДНК или иРНК ваксини;
3. Комбинация от протеин-базиран и генно-базиран подход за производство на протеинов антиген или антигени *ин витро* или *ин vivo*, напр. живи-атенюирани вирусни ваксини.

Към декември 2020, Световната Здрав-
на Организация (WHO) отчете 214 вакси-
ни в процес на разработка, от които 51

бяха в процес на клинично проследяване,
13 във фаза III на проучвания и няколко вак-
сини бяха вече позволени за производство.



Стратегии за производство на ваксини към SARS-CoV-2.

Инактивирани вирусни ваксини (Inactivated)

Вируси, които са физически или химически инактивирани със запазен интегритет на вирусната частица, която служи като имуноген.

Вирус-подобни частици или ваксини на основата на наночастици (Virus-Like particles)

При тази стратегия, структурните вирусни протеини се ко-експресират и формират неинфекциозни частици, играещи ролята на имуногени. Те наподобяват истински вириони, при които липсва вирусния геном.

Ваксини на основата на протеинови частици (Protein submitted)

Тази стратегия включва само основните вирусни протеини или пептиди, които се произвеждат *ин витро* в бактерии, дрожди, насекоми или бозайникови клетки. По-голяма част от ваксините срещу SARS-CoV-2 се базират на тази стратегия.

Вирус-векторни ваксини (Virus Vectedored)

Гени, кодиращи патогенните антигени, се клонират в не-реплициращи или реплициращи се вирусни вектори (като аденовируси). Антигените се продуцират от трансдуцирани клетки на гостоприемника след имунизацията.

ДНК или иРНК базирани ваксини (DNA mRNA)

ДНК и иРНК ваксините имат преимуществото да се произвеждат бързо. При ДНК ваксините, вирусните антигени се кодират от рекомбинантен ДНК плазмид и се продуцират в гостоприемниковите клетки. За разлика от тях, иРНК ваксини се синтезират чрез *ин витро* транскрипция, а вирусните антигени се произвеждат в цитоплазмата чрез директна протеинова трансляция (синтез) *ин vivo*.

Живи или атенюирани вирусни ваксини (Live attenuated)

При тази стратегия, вирусът се атенюира (намалява се вирулентността) чрез *ин витро* или *ин vivo* пасиране. Вирусът става непатогенен или слабо патогенен, но е все още имуногенен, като мимикрира (наподобява) вирусна инфекция.

Вирусни таргети за ваксини срещу COVID-19

SARS-CoV-2 съдържа четири основни структурни протеини: спайк протеин (S), мембранен (M), протеини на обвивката (envelope, E) и протеин на нуклеокапсид (N).

S протеините са отговорни за разпознаване на клетъчните рецептори и навлизането на вируса. M оформят вирусонната обвивка на вируса. E протеините са малки протеини с ключова роля за заразяването с CoV. N протеините оформят нуклеокапсид и се свързват с вирусния РНК геном.

Освен тези основни белтъци, SARS-CoV-2 кодира 16 неструктурни протеина (nsP1–16) и 9 допълнителни протеина. Някои от тях биха могли също да служат като мишена за вирус-индуцираните имунни отговори.

S протеин

Това е основният протеин, който се използва като таргет на повечето COVID-19 ваксини. В състава на обвивката S съществува като хомотример (три еднакви молекули). В S1 частта на протеина се намира рецептор-свързващия домен (RBD), а S2 е отговорна за



Устройство на SARS-CoV-2 коронавирусната молекула

сливане с мембраната на инвазираната клетка при навлизане на вирусната частица. Теоретично антителата могат да се свържат със S протеина и така да потиснат вирусната инфекция. Най-силно биха действали онези антитела, които се свързват с RBD частта. S протеинът е таргет и на Т клетъчните отговори, т.е. свързва се с $CD4^+$ и $CD8^+$ епитопите (участъци) на Т клетките.

Досега три COVID-19 ваксини на база аеновирус, които експресират в организма S протеина, са навлезли във фаза III на клинични проучвания. Първата от тях е произведена в Китай и се базира на вектор човешки аеновирус тип 5 (Ad5). Втората е произведена в Англия на база рекомбинантен шимпанзе аеновирус ChAdOx1. Третата, руска, комбинира човешки аеновируси Ad26 и Ad5 с въвеждане като единична доза в организма. Фаза II на клиничните проучвания и на трите ваксини досега показва, че те успешно индуцират производство на антитела и T_H1 -медирувани имунни отговори при човека.

Освен аеновирусната векторна стратегия, някои ДНК ваксини също експресират S протеина. Тази ваксина предизвиква антитела като специфични Т

клетъчни отговори спрямо S протеина както при мишки, така и при прасета. Правят се и по-нетрадиционни ваксини с въвеждане на S протеин, свързан към човешки колаген 1 алфа. Тази стратегия има за цел да стабилизира протеина и да повиши образуването на антитела.

Недостатъкът на използването на S протеина е, че когато се продуцира като рекомбинантен, преминава в пространствена конформация, засенчваща S1 субединицата. А именно тя е основният антиген и съдържа неутрализиращи епитопи спрямо RBD. Запазването и стабилизирането на S протеина повишават експресията му и респективно качеството и количеството на антителата, индуцирани от ваксината. Ето защо повечето ваксини индуцират мутации в S протеина – пролинови субституции в остатъци K986 и V987 (при ваксините на Mogerma и BioNTech/Pfizer, както и на Janssen Pharmaceutical) или мутации в местата на разкъсване (cleavage sites) – Janssen Ad26-vectored vaccine и протеин-базираната ваксина на Новавакс (Novavax). Всички тези ваксини показват протективен имунитет в животински модели и влизат във фаза III на клинични проучвания.

RBD (домен във вирусната частица, отговорен за свързване с рецептора на човешките клетки)

Именно рецептор-свързващият домен (RBD) на вируса се свързва с рецепторите на повърхността на гостоприемникова клетка. Повечето антитела се свързват с RBD и блокират свързването с човешкия ACE2 рецептор, потискайки навлизането на вируса. RBD-базирана ваксина е била разработена в Китай и понастоящем е във фаза I на клинични проучвания. Тази ваксина вкарва в организма RBD мотив, обвит с липидни наночастици и индуцира както антитела, така и T_H1 медиран имунен отговор. Използването на такива ваксини обаче не е обещаващо, защото RBD е с ниска молекулна маса и съществува в много и разнообразни форми (мономер, димер или тример). Стратегиите са да се увеличи антигенната маса (напр. чрез сливане на RBD с Fc-домена или RBD мултимеризация (като тримери или мултимери)).

S1 или S2 вирусни субединици

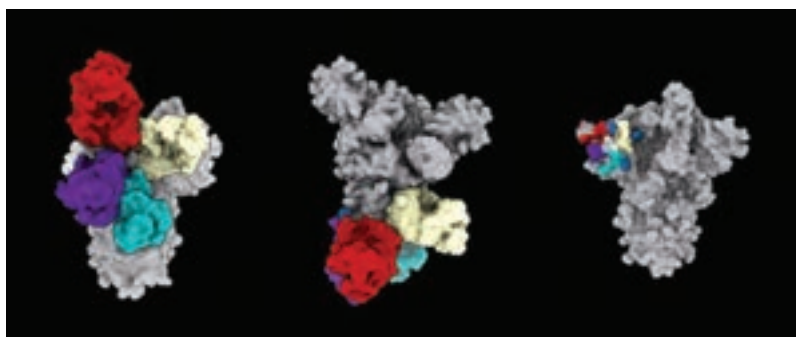
Тези субединици като антигени имат значително по-слаба имуногенност и водят до по-нисък титър на образуваните

антитела. Те имат и по-слаби вирус-неутрализиращи свойства.

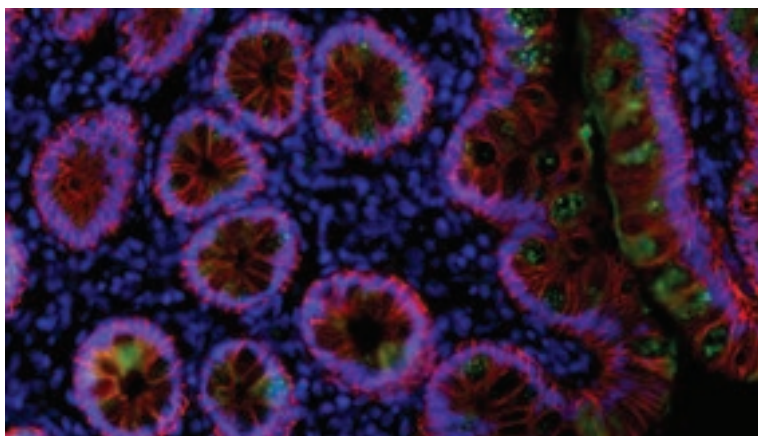
M, E и N протеини

За разлика от S протеина, CoV M и E протеините са слабо имуногенни по отношение на хуморалния отговор (не образуват високи титри антитела), вероятно поради малката си молекулна маса. Така или иначе, съществува идентичност в секвенциите между M и E протеините на вирусите SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, което ги определя като мишени за кръстосана реактивност от страна на T клетките (атакуват части на различни вируси на основание подобие в структурата им). Така че потенциално включването на тези протеини във ваксина би разширила имунния отговор и би било добра кръстосана протекция срещу различни коронавируси.

N протеинът на вируса е в най-голямо количество и е високо имуногенен при CoV инфекция. Последните изследвания обаче показват, че ваксини, експресиращи N протеин, не осигуряват протекция, даже обратно, увеличават вероятността за инфекция чрез белодробна еузинофилна инфилтрация и T_H2 – базирани клетъчни имунни отговори.



Антитела, свързващи се с NTD (N-терминален домен) на вирусния spike протеин



Вирусни частици (SARS-CoV-2) в зелено в интестинални (чревни) клетки 92 дни след началото на клиничните симптоми

Такива ваксини за COVID-19 все още не са изпробвани.

Целият вирус като маргем

Ваксините с инактивиран вирус или жив атенюиран вирус (с намалена вирулентност) съдържат всички структурни протеини (S, N, M и E протеини). Те индуцират по-широк хуморален и Т-клетъчен имунитет в сравнение с всички, разгледани досега. Три такива ваксини, базирани на инактивиран вирус, са произведени в Китай и са във фаза III на клинично проучване, а четвърта е във фаза I/II. Клиничните проучвания до момента показват, че тези ваксини активират успешно хуморалния имунитет, но не и клетъчния. Те не активират T_H1 или T_H2 -асоциирани цитокини във ваксинираните лица. Освен това тези ваксини съдържат алуминий като адювант, който поначало е слаб стимулатор на Т клетъчния имунитет.

Атенюираните вирусни ваксини, от своя страна, генерират антитела, но те са кратковременни – запазват висок титър около 3 месеца. Процесът на вирусното отслабване (атенюиране) е също продължителен. Само три такива ваксини са в процес на клинично проучване.

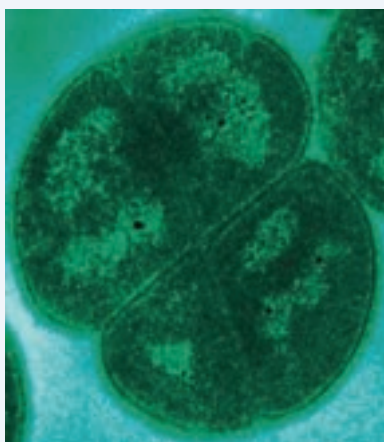
Като цяло идеалната ваксина срещу COVID-19 трябва да индуцира високи титри на антитела, силен T_H1 – и слаб T_H2 -медиран клетъчен отговор, поддържаща дълга имунологична памет и осигуряваща кръстосана протекция при различни коронавируси. ***Засега нито една ваксина не отговаря на всички изисквания.***

Няколко кандидати обаче достигат до финалните етапи за сигурност и ефективност при големи клинични проучвания, като ваксините на BioNTech/Pfizer и Moderna. Трудно е различните ваксини да се сравняват поради липсата на стандартизирани методи за неутрализация. Едва след ваксинацията може да започне оценката на продължителността на протективния имунитет.

Имунизационните програми следва да се наблюдават и оценяват. Напр. повечето ваксини се въвеждат интрамускулно или интрадермално. Не е ясно дали антителата в серума достигат до дихателната система, особено белите дробове и дали действат ефективно. Може да се окаже, че навлизането на ваксината през носната мукоза е по-ефективно и предпазва от предаване на SARS-CoV-2 чрез респираторния тракт. ■

„Най-издръжливата бактерия“, според Книгата на Гинес

Това е бактерията с научно име *Deinococcus radiodurans*, открита за първи път от американския микробиолог Артур Андерсън (Arthur Anderson) през 1956 г. в почви от щата Орегон (САЩ). Тя е наречена от откривателя ѝ с дръзко име, но след по-подробни проучвания и чрез молекулярно биологични методи, е описана под горното име и класифицирана



в науката от микробиолозите Брукс и Мъри (Brooks & Murray) през 1981 г. Следващите изследвания върху биологията и издръжливостта на бактерията към ниски и високи температури, изсушаване, радиация, налягане, вакуум, въздействие на химични вещества и др. показали, че тя е един изключителен полиекстремофилен организъм и с право е включена днес в „Книгата на рекордите на Гинес“ (The Guinness Book of World Records), като „Най-издръжливата позната бактерия в света“ (World's toughest known bacterium).

През месец октомври 2020 г. научното списание *Live Science Essentials* оповести новината, че бактерията *Деинококус радиодюранс* успешно е преживяла и над 1 година престой в открития космос по време на полета на международната космическа мисия *Tanpopo Space Mission*. С това постижение бактерията затвърждава още един път рекорда си за „най-издръжливата бактерия“, позната досега. От рода *Деинококус* са познати и групи 9 вида екстремофилни бактерии, но *Д. радиодюранс* се оказва наистина рекордьор

по издръжливост на йонизираща радиация, надминаваща стотици пъти смъртоносната доза за човека. Установено е, че бактериите остават живи и способни за размножаване при земни условия и след въздействие на йонизиращо лъчение в дози от 5000 грей или 500 000 рада. Ще припомним, че йонизираща радиация от 5 грей е вече смъртоносна доза за човека. Дос-

коро се считаше, че най-устойчивите организми на земята са загадъчните таргуизраги, за които вече сме писали на страниците на сп. „Природа“ (вж. бр. 1, 2020 г.), но тяхната максимално регистрирана издръжливост досега не надминава 4000 грей. Тази необикновена издръжливост на бактериите от вида *Deinococcus radiodurans* е дала основание на колектив от руски и американски учени да публикуват през 2006 г. в сп. *Astrobiology* статия, в която отново застъпват тезата за извънпланетарния произход на живота на земята (т.е. хипотезата за панспермията) и за възможността бактериите да са донесени на Земята с метеорити от Марс? Дали тази смела хипотеза ще се окаже вярна предстои да научим от бъдещите изследвания и експерименти както с бактерията *Д. радиодюранс*, така и с други екстремофилни обитатели на Земята, които вече са редовни участници в космическите полети и изследвания на човека.

По Live Science Essentials