

Гроусова Дарья Михайловна

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ГАМ-КОВИД-ВАК
В ОТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА SARS-COV-2
НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Должикова Инна Вадимовна – кандидат биологических наук, руководитель отдела Государственной коллекции вирусов федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Алешкин Андрей Владимирович - доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор РАН, заместитель директора по медицинской биотехнологии федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Гудима Георгий Олегович – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории физиологии иммунитета и аллергии федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

Защита диссертации состоится «7» февраля 2025 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан «___» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Д.б.н.,

Ермолаева С.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Коронавирусная инфекция 2019 (COVID-19) - тяжелое острое респираторное заболевание, впервые зарегистрированное в Ухане (Китай) в конце декабря 2019 г. [WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic., 2020]. 11 марта 2020 года была объявлена пандемия – массовое распространение заболевания в мировых масштабах [WHO. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19., 2020]. Возбудителем этого заболевания является коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), относящийся к семейству *Coronaviridae* род *Betacoronavirus*. С начала пандемии в мире были введены различные неспецифические меры профилактики COVID-19 – ранняя диагностика, изоляция заболевших, локдаун (самоизоляция). Однако это не позволило предотвратить широкое распространение вируса. По данным Всемирной Организации Здравоохранения на 27 октября 2024 г. лабораторно подтверждено 776 754 317 случаев инфекции, вызванной SARS-CoV-2, из которых 7 073 466 с летальным исходом. Случаи заражения первоначально были обнаружены в Китае, в настоящее время они зарегистрированы в 228 странах. В Российской Федерации было зарегистрировано 24 572 846 случаев заболевания, из которых 403 557 с летальным исходом [WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard., 2024]. Наиболее эффективным методом борьбы с пандемией является вакцинопрофилактика, позволяющая ограничить распространение инфекции и снизить число COVID-ассоциированных летальных случаев.

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана вакцина для профилактики COVID-19 на основе рекомбинантных аденовирусов человека - Гам-КОВИД-Вак [Logunov D.Y. и др., 2020; Logunov D.Y. и др., 2021]. Данный вакцинный препарат состоит из 2 компонентов: компонент 1 – вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, компонент 2 – вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа. Оба вектора несут ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. На сегодняшний день вакцина Гам-КОВИД-Вак широко используется для вакцинации населения.

Внедрение в клиническую практику вакцин в разных странах позволило значительно сократить заболеваемость и тяжесть течения COVID-19 среди вакцинированных. Эпидемиологическая эффективность вакцинации в защите от заболевания в период распространения исходного варианта вируса составляла более 90% [Shao W. и др., 2022]. Однако вирус SARS-CoV-2 активно мутирует, что приводит к появлению новых вариантов вируса. Сегодня известен целый ряд замен в гликопротеине, увеличивающих аффинность связывания с ангиотензин превращающим ферментом 2 (ACE2) и снижающих нейтрализующую активность антител. Появление и распространение новых вариантов вируса привело к новым волнам COVID-19 и снижению эпидемиологической эффективности средств профилактики. В связи с этим в настоящее время существует необходимость в постоянном мониторинге появляющихся мутаций и анализе эффективности вакцин в отношении новых вариантов вируса SARS-CoV-2 с целью выявления вариантов, имеющих пандемический потенциал. В том случае, если защитная эффективность

будет снижена, необходимо создавать новые варианты вакцины, адаптированные под актуальные варианты вируса SARS-CoV-2.

Цель и задачи исследования

Целью работы является оценка эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 по вируснейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных добровольцев и на модели инфекции у животных.

Для достижения цели предстояло решить следующие задачи:

1. Адаптация моделей летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией и у hACE2-трансгенных мышей.

2. Исследование нейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2.

3. Исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 у лабораторных животных.

4. Исследование протективной эффективности вакцин Гам-КОВИД-Вак Дельта, Гам-КОВИД-Вак Омикрон и комбинированной вакцины Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон у лабораторных животных.

Научная новизна

Разработан алгоритм оценки эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак, включающий исследование уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев и исследование протективной эффективности вакцины на модели инфекции у животных, позволяющий своевременно оценивать необходимость смены антигенного состава вакцины в рамках гражданского оборота. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак индуцирует формирование протективного иммунного ответа у животных, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантов Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (B.1.1.28 / P.1), Дельта (B.1.617.2) и Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.2. Показана 100% протективная эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак с измененным антигенным составом, адаптированным под варианты Дельта и Омикрон вируса SARS-CoV-2. Установлено, что комбинированная вакцина Гам-КОВИД-Вак с измененным антигенным составом, адаптированным под варианты Дельта и Омикрон вируса SARS-CoV-2, индуцирует формирование нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 широкого репертуара.

Теоретическая и практическая значимость

В результате проведенных исследований адаптированы модели летальной инфекции COVID-19 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией и трансгенных мышей, несущих ген ангиотензин превращающего фермента 2 человека (hACE2). Данные модели в настоящее время используются для исследования эффективности препаратов для профилактики и терапии COVID-19.

Методология и методы исследования

Работа основана на современных методах разработки моделей вирусных инфекций и исследования эффективности вакцинных препаратов. В работе

применяются современные методы работы с животными, вирусологические, молекулярно-биологические, иммунологические, биоинформатические методы, а также методы прикладной статистики.

Положения, выносимые на защиту:

1. Лабораторная система мониторинга эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак, включающая исследования нейтрализующей активности антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев и исследования протективной эффективности вакцины у животных, позволяет принимать своевременное решение о смене антигенного состава вакцины.

2. Иммунизация препаратом Гам-КОВИД-Вак приводит к формированию напряженного протективного иммунитета в отношении различных вариантов (Альфа (В.1.1.7), Бета (В.1.351), Гамма (В.1.1.28 / Р.1), Дельта (В.1.617.2) и Омикрон (В.1.1.529) сублинии ВА.2) вируса SARS-CoV-2 у hACE2-трансгенных мышей и у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией.

3. Иммунизация комбинированной вакциной Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон приводит к формированию нейтрализующих антител широкого репертуара у животных и защищает животных от инфекции, вызванной вариантами SARS-CoV-2 Дельта и Омикрон (В.1.1.529) сублиний ВА.1, ВА.2 и ВА.5.

Личный вклад автора

Вакцина Гам-КОВИД-Вак была любезно предоставлена Филиалом «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России для исследований протективной эффективности. Размножение трансгенных мышей-гибридов F1 было выполнено совместно с Савиной Д.М. (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Автор непосредственно адаптировал модели инфекции, вызванной разными вариантами вируса SARS-CoV-2, у сирийских хомячков и у hACE2-трансгенных мышей, исследовал напряженность и кросс-реактивность поствакцинального гуморального иммунного ответа, провел исследования протективной активности вакцины на разработанных и охарактеризованных моделях инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у животных, проанализировал и обобщил полученные результаты. Анализ вируснейтрализующей активности сывороток крови человека и животных проведен непосредственно автором совместно с сотрудниками лабораторий Государственной коллекции вирусов и клеточной микробиологии (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Исследование вируснейтрализующей активности сывороток вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении варианта Омикрон проводили совместно с лабораторией вирусологии (руководитель – Dr. Anna Rosa Garbuglia) Национального института инфекционных заболеваний имени Ладзаро Спалланцани (Рим, Италия). Анализ протективной активности вакцины на моделях инфекции, вызванной разными вариантами вируса SARS-CoV-2, проведен непосредственно автором совместно с сотрудниками лаборатории Государственной коллекции вирусов (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Гистологический анализ проведен под руководством к.б.н. Тухватулина А.И. (лаборатория клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) и совместно с Недорубовым А.А. (ФГАОУ ВО

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)).

Степень достоверности результатов

Исследования проведены с достаточным количеством наблюдений. В работе были использованы современные методы исследований и статистического анализа. Проверка статистических гипотез проведена при уровне значимости 0,05. Методы исследований и анализа соответствуют цели и задачам. В обсуждении результатов использованы данные современной медицинской и биологической науки. Научные положения и выводы обоснованы, подтверждены достаточным количеством наблюдений и фактическим материалом. Вышеизложенное позволяет считать полученные результаты достоверными, сделанные выводы обоснованными и вытекающими из результатов проведенных исследований.

Внедрение полученных результатов в практику

В результате проведенных исследований адаптированы модели инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 разных вариантов, у сирийских хомячков и hACE2-трансгенных мышей. Разработанные модели используются специалистами ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России для исследований защитной эффективности различных препаратов для профилактики (вакцины) и терапии (моноклональные антитела, иммуноглобулины и др.) COVID-19.

С использованием адаптированных моделей продемонстрирована 100% эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении вариантов вируса SARS-CoV-2, вызывающих обеспокоенность. На сегодняшний день вакцина Гам-КОВИД-Вак зарегистрирована в 73 странах для экстренного применения и в РФ для постоянного применения. С использованием адаптированных моделей продемонстрирована 100% эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак с обновленным антигенным составом (Дельта-Омикрон) в отношении разных сублиний варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: Международная конференция «Perspective technologies in vaccination and immunotherapy» Октябрь 27-29, 2020, On-line; VII Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» 28-30 октября 2020, Онлайн; 11 Годовой научный форум «COVID-19 Vaccines: Global Challenges and Prospects» 4-5 ноября 2020, Онлайн; 2021 Виртуальный конгресс международного общества вакцин «COVID-19 Vaccine Update» 10 февраля 2021; III Национальный конгресс с международным участием «ЛАБРИН 2021 Инфекции. Год с COVID-19: итоги» 31 марта - 2 апреля 2021; Международное сообщество фармаконадзора, 2021 Симпозиум&Обучение для стран Евразии, Июнь 4-5, 2021, Онлайн; Международный военно-технический форум «АРМИЯ-2021» 22-28 августа 2021, Москва; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» 7-8 октября 2021, Сочи; XXIX научно-практическая конференция Диагностической Медицинской Ассоциации «ДиаМА». «Медицина, экономика, управление. Интеграционные процессы современного консультативно-

диагностического центра в условиях новой коронавирусной инфекции», Москва, 17 октября 2021г; IV Национальный конгресс с международным участием ЛАБриН22 Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: «Цифровая трансформация: современный тренд в лабораторной диагностике», Москва, 28-30 сентября 2022 г.; IX Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания», Сочи, 8-11 ноября 2022 г.

Апробация диссертации состоялась «07» июля 2023 г. на совместной научной конференции отделов медицинской микробиологии, генетики и молекулярной биологии бактерий, иммунологии и Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 01 от 07.07.2023 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведённого исследования соответствуют пунктам 6, 7 и 9 паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работы, в том числе 4 статьи в зарубежных журналах, и 1 в сборнике международной конференции.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 160 страницах, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы и список используемой литературы (258 источника, в том числе 14 отечественных и 244 зарубежных). Работа содержит 11 таблиц, 32 рисунка и 1 приложение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вирусы. Вирусы SARS-CoV-2, используемые для исследования протективной активности вакцины Гам-КОВИД-Вак, были получены из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России: Ухань B.1.1.1 hCoV-19/Russia/Moscow_PMV-1/2020; Альфа B.1.1.7 hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_20432/2020; Бета B.1.351 hCoV-19/Russia/SPE-R11-27029S/2021; Гамма B.1.1.28/P.1 hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_10915/2021; Дельта B.1.617.2 hCoV-19/Russia/SPE-R11-32758S-PMV-1-CS-SPE32758/2021; Омикрон BA.1 B.1.1.529 hCoV-19/Russia/MOW-Moscow_PMV-1-O16/2021; Омикрон BA.2 B.1.1.529 hCoV-19/Russia/MOW-PMV-1-ON402/2022; Омикрон BA.5 B.1.1.529 hCoV-19/Russia/SPE-R11-25357S/2022.

Линии клеток млекопитающих. Культура клеток Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) была получена из лаборатории клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Животные. В исследовании использовали трансгенных мышей F1, полученных от скрещивания трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/J (Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/034860>, статус здоровья SOPF) и

нетрансгенных самок C57BL/6 Gamrc (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, статус здоровья SPF), далее - «hACE2-трансгенные мыши», а также сирийских хомячков (Питомник «Пушино», статус здоровья SPF). В исследовании использовали самок/самцов hACE2-трансгенных мышей массой 18-25 грамм и самок/самцов сирийских хомячков массой 60-80 грамм. Все исследования на животных одобрены Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол №9 от 16 апреля 2021г., Протокол №24 от 21 апреля 2022г.).

Сыворотки крови вакцинированных добровольцев. В исследовании использовали сыворотки крови людей, получивших вакцину Гам-КОВИД-Вак, в рамках гражданского оборота. Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол №17 от 03 декабря 2021г.). Сыворотки крови добровольцев, вакцинированных BNT162b2 (Pfizer/BioNTech, США), были предоставлены Национальным институтом инфекционных заболеваний имени Ладзаро Спалланцани (Рим, Италия).

Иммунобиологические препараты. Вакцины, используемые в работе, были получены из Филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вакцина Гам-КОВИД-Вак состоит из двух компонентов: компонент 1 на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, компонент 2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. В работе использовали 4 антигенных состава вакцины: Ухань (исходный вариант вируса), Дельта, Омикрон и комбинация антигенов Дельта-Омикрон.

Методы. Все исследования с жизнеспособным вирусом SARS-CoV-2 проводили в помещениях класса BSL-3 в присутствии не менее двух сотрудников, согласно санитарным правилам (СанПиН) 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)" и СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

Работа с вирусом. Нарработку различных вариантов вируса SARS-CoV-2 проводили на культуре клеток Vero E6. Титр инфекционного вируса определяли на культуре клеток Vero E6 путем определения 50% инфекционной дозы культуры ткани (TCID₅₀ - tissue culture infectious dose 50). Титр TCID₅₀ рассчитывали по методу Спирмена-Кербера. Выделение РНК из образцов, содержащих вирус SARS-CoV-2 проводили с помощью RNeasy Plus Universal Kits (QIAGEN, Германия) по протоколу фирмы-производителя. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) проводили с помощью набора ПОЛИВИР SARS-CoV-2 «Express» по протоколу фирмы-производителя. ОТ-ПЦР-РВ для специфического обнаружения вируса SARS-CoV-2 вариантов Дельта и Омикрон проводили с помощью набора «Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 генетических вариантов Omicron и Delta на основе определения характерных для них мутаций в S гене методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест SARS-CoV-2 VOC v.3», серия CV017.» по протоколу фирмы-производителя. Для построения калибровочной кривой использовали РНК вируса

SARS-CoV-2 с известной концентрацией геномных эквивалентов в мл (ГЭ/мл).

Реакцию нейтрализации проводили при постоянной дозе вируса с различными разведениями сыворотки крови добровольцев или животных. Оценку результатов проводили через 96 часов после постановки реакции. За титр вируснейтрализующих антител (ВНА) исследуемой сыворотки принимали наибольшее ее разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия.

Работа с животными. Содержание и обслуживание животных осуществляли в соответствии с требованиями по содержанию лабораторных животных [«Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях», 2010]. Лабораторных животных размещали в клетках для конвенционального содержания лабораторных животных на время иммунизации, для проведения экспериментов, связанных с использованием вируса SARS-CoV-2, животных размещали в системе IsoCage N (Tecniplast, Италия). Животные имели свободный доступ к воде и корму. Исследование проводили на мышах линии C57BL/6 Tg(K18-ACE2)2Prlmn и сирийских хомячках. Вакцину Гам-КОВИД-Вак использовали сразу после разморозки. Иммунизацию проводили внутримышечно в объемах, не превышающих допустимые для данного вида животных.

Индукцию иммуносупрессии у сирийских хомячков осуществляли с помощью иммунодепрессантов (дексаметазон (DEX) и циклофосфамид (CPA)) начинали за 7 дней до заражения SARS-CoV-2 - DEX в дозе 10 мг/кг вводили внутривентриально ежедневно в течение 7 дней, за 3 дня до заражения дополнительно вводили CPA в дозе 150 мг/кг внутривентриально. В день заражения SARS-CoV-2 и через каждые 3 дня после заражения CPA вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг. Животных заражали интраназально в дозе 10^6 TCID₅₀ SARS-CoV-2.

Наличие гена hACE2 у мышей линии C57BL/6 Tg(K18-ACE2)2Prlmn поколения F1 определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) по протоколу The Jackson Laboratory для данной линии мышей. Животных заражали интраназально в дозе 3×10^4 или 10^5 TCID₅₀ SARS-CoV-2.

Отбор органов и определение вирусной нагрузки. Проводили эвтаназию животных с помощью передозировки ингаляционным анестетиком с последующей цервикальной дислокацией. Осуществляли вскрытие животных, отбирали легкие. Промывали отобранные органы физиологическим раствором.

10% гомогенат легких готовили с использованием прибора MPbio FastPrep-24, гомогенаты центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин и супернатант использовали для дальнейшего анализа. Для количественного определения вирусной РНК в виде ГЭ/мл использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Определение вирусной нагрузки по количеству ГЭ проводили методом ПЦР-РВ. Инфекционный титр вируса определяли на клетках Vero E6.

Гистологические исследования проводили совместно с к.б.н. Тухватулиным А.И. (лаборатория клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) и совместно с Недорубовым А.А. (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)). Фрагменты

лёгких фиксировали в забуференном стабилизированном формальдегиде 3,7-4.0% (252931, AppliChem, Германия) не менее 14 дней при температуре +4°C. Затем проводили обезвоживание образцов в изопрепе (BioVitrum, Россия) с использованием Microm STP 120 (Thermo Scientific, США) и заливали в HISTOMIX (BioVitrum, Россия) с использованием рабочей станции HistoStar (Thermo Scientific, США). Срезы толщиной 5 мкм делали на микротоме Finesse ME+ (Thermo Scientific, США), окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в VitroGel (все BioVitrum, Россия). Изображения получали с помощью сканера Perfection V600 (Epson, Япония) и с помощью микроскопа Axio Imager.Z1 (ZEISS, Германия) с камерой AxioCam MRc 5 (ZEISS, Германия).

Статистические и биоинформатические методы. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью компьютерной программы «GraphPad Prism 9.0». При анализе данных несвязанных выборок использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна-Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. При анализе данных связанных выборок использовали t-критерий Стьюдента для парных выборок или критерий Вилкоксона в зависимости от нормальности распределения данных [Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.М., 2011]. Для дисперсионного анализа использовали тест ANOVA или критерий Краскела-Уоллиса в зависимости от нормальности распределения данных. Для определения нормальности распределения данных использовали обобщенный тест Дагостино-Пирсона или тест Шапиро-Уилка на нормальность распределения [Авива П., Кэролайн С., 2015]. При анализе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гликопротеина S различных вариантов вируса SARS-CoV-2 были использованы различные онлайн базы данных (<https://www.gisaid.org/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.uniprot.org/>) и программа «Geneious».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе данной диссертационной работы параллельно проводили оценку нейтрализующей активности сывороток вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 и оценку протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 на модели инфекции у животных, включающую предварительную разработку, отработку и характеристику моделей инфекции COVID-19 у животных. Для вариантов вируса, в отношении которых было выявлено снижение эффективности, в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ проводили актуализацию антигенного состава вакцины. Финальным этапом данной диссертационной работы являлась оценка протективной эффективности вакцин Гам-КОВИД-Вак с обновленным антигенным составом в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 на модели инфекции у животных.

Исследование нейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Альфа, Бета, Гамма и Дельта

В исследовании использовали 27 сывороток крови добровольцев, вакцинированных обоими компонентами вакцины Гам-КОВИД-Вак, не имеющих COVID-19 в анамнезе. Сыворотки отбирали через месяц после введения 2 компонента вакцины. Для каждого образца оценивали уровень вируснейтрализующих антител в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1), Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), для 16 образцов также оценивали уровень вируснейтрализующих антител в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Гамма (B.1.1.28/P.1) и Дельта (B.1.617.2). Далее проводили оценку уровня вируснейтрализующих антител в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 в сравнении с исходным вариантом Ухань (B.1.1.1). На рисунке 1 представлены титры вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1), Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (B.1.1.28/P.1) и Дельта (B.1.617.2).

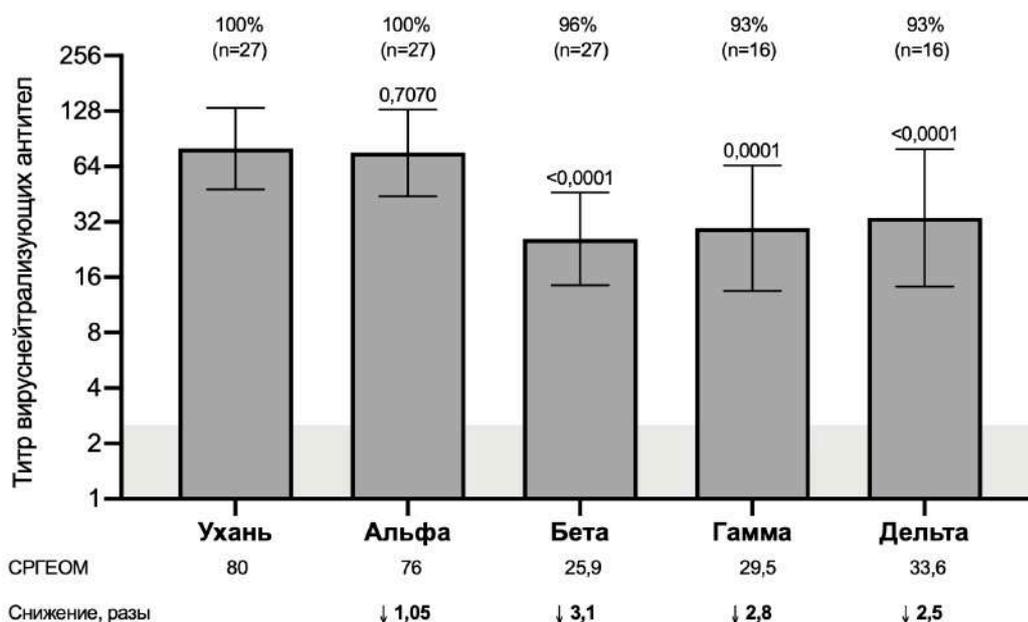


Рисунок 1 – Титры вируснейтрализующих антител в сыворотках крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1), Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (B.1.1.28/P.1) и Дельта (B.1.617.2). Значение уровня значимости (p) определяли с помощью теста Уилкоксона. Серым цветом отмечена область ниже предела обнаружения (значениям ниже предела обнаружения присваивали значение титра 1,25).

В результате исследования не выявили снижения нейтрализующей активности антител в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Альфа (B.1.1.7). Детектировали снижение нейтрализующей активности антител в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Бета (B.1.351) – в 3,1 раза, Гамма (B.1.1.28/P.1) – в 2,7 раза и Дельта (B.1.617.2) – в 2,4 раза.

Исследование нейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон

На первом этапе был проведен анализ уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных и ревакцинированных добровольцев в отношении варианта Омикрон сублиний ВА.1 и ВА.2. В исследовании использовали 15 сывороток крови добровольцев, вакцинированных двумя или тремя дозами вакцины Гам-КОВИД-Вак, не имеющих COVID-19 в анамнезе. На следующем этапе было проведено исследование уровня ВНА в отношении варианта Омикрон сублинии ВА.5. Исследование также проводили с использованием 19 сывороток крови вакцинированных и ревакцинированных добровольцев, доступных на момент проведения исследования. Результаты исследования представлены на рисунке 2.

По результатам проведенного исследования было показано, что в сыворотках крови вакцинированных и ревакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев детектируется снижение уровня ВНА в отношении варианта Омикрон ВА.1 в 9,62 раз, в отношении варианта Омикрон ВА.2 – в 3,82 раза, в отношении варианта Омикрон ВА.5 – в 10,32 раза.

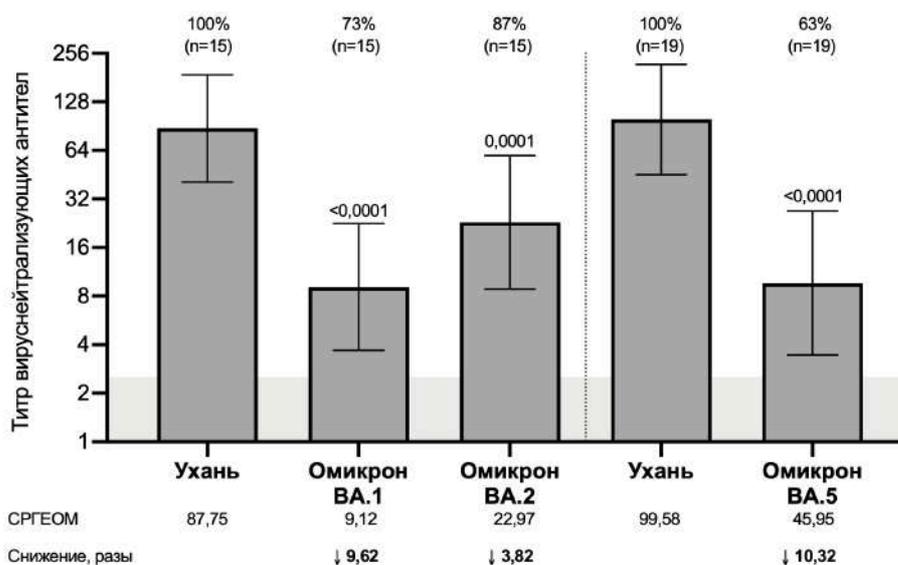


Рисунок 2 - Уровни вируснейтрализующих антител в сыворотках крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1) и Омикрон (B.1.1.529) сублиний ВА.1, ВА.2 и ВА.5. На рисунке отмечено среднее геометрическое титра ВНА, 95% доверительный интервал, снижение относительно варианта Ухань, значение p (критерий Вилкоксона), а также % сывороток с детектируемым уровнем ВНА (титр 5 и более).

Данные результаты были также подтверждены на базе Национального института инфекционных заболеваний имени Ладзаро Спалланцани (Рим, Италия) совместно с лабораторией вирусологии (руководитель – Dr. Anna Rosa Garbuglia). В исследовании использовали 39 сывороток крови добровольцев, вакцинированных обоими компонентами вакцины Гам-КОВИД-Вак, не имеющих

COVID-19 в анамнезе. Сыворотки отбирали через 1-6 месяцев после введения 2 компонента вакцины. Для каждого образца оценивали уровень вируснейтрализующих антител в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1) и Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.1. Далее проводили оценку уровня вируснейтрализующих антител в отношении варианта Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.1 вируса SARS-CoV-2 в сравнении с исходным вариантом Ухань (B.1.1.1). В качестве группы сравнения использовали 68 сывороток крови добровольцев, вакцинированных BNT162b2 (Pfizer/BioNTech, США). На рисунке 3 представлены титры вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1) и Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.1.

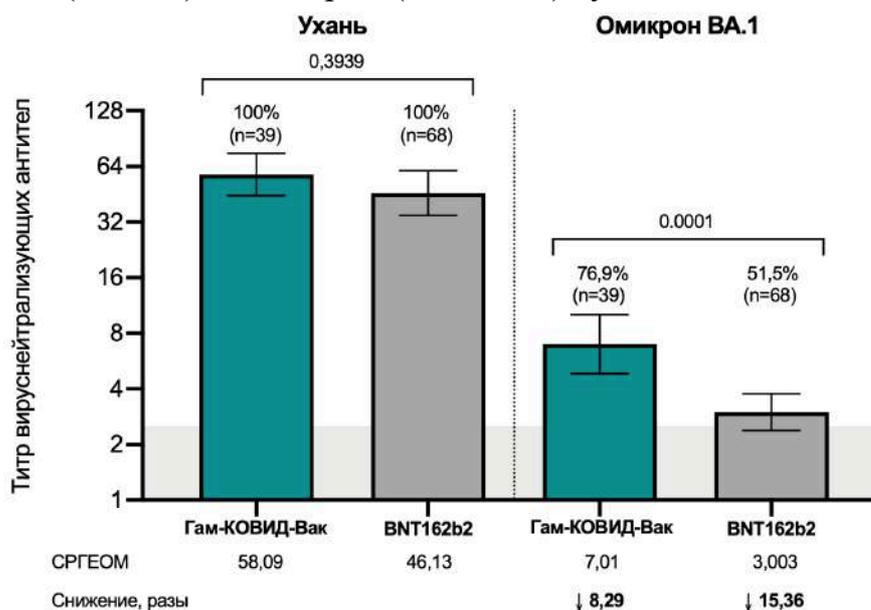


Рисунок 3 – Уровни вируснейтрализующих антител в сыворотках крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак или BNT162b2, в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1) и Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.1. На рисунке отмечено среднее геометрическое титра ВНА, 95% доверительный интервал, снижение относительно варианта Ухань, значение p (критерий Вилкоксона), а также % сывороток с детектируемым уровнем ВНА (титр 2,5 и более).

В результате исследования детектировали снижение нейтрализующей активности антител в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.1 у добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак - в 8,29 раз, при этом у 23,1% образцов не было детектировано вируснейтрализующих антител; у добровольцев, вакцинированных BNT162b2 – в 15,36 раз, при этом у 48,5% образцов не было детектировано вируснейтрализующих антител (рисунок 3).

Таким образом, вакцина Гам-КОВИД-Вак индуцирует формирование антител, способных нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 варианта Омикрон (B.1.1.529) сублиний BA.1, BA.2 и BA.5.

Исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Альфа, Бета, Гамма и Дельта на модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей

Иммунизировали hACE2-трансгенных мышей внутримышечно двукратно вакциной Гам-КОВИД-Вак с интервалом в 21 день и через неделю после второй иммунизации заражали различными вариантами вируса SARS-CoV-2. На 4-й день после заражения вирусом SARS-CoV-2 проводили макроскопический и гистологический анализ повреждения легких, а также анализ вирусной нагрузки в легких в группах вакцинированных и контрольных животных (рисунок 4).

Макроскопический и гистологический анализ, а также анализ вирусной нагрузки показали, что hACE2-трансгенные мыши были высокочувствительны ко всем используемым вариантам SARS-CoV-2. Важно отметить, что макроскопия легких показала множественные повреждения и высокую вирусную нагрузку в легких мышей из контрольных групп, в то время как легкие вакцинированных животных не имели повреждений, и жизнеспособный вирус SARS-CoV-2 не детектировался (рисунок 4).

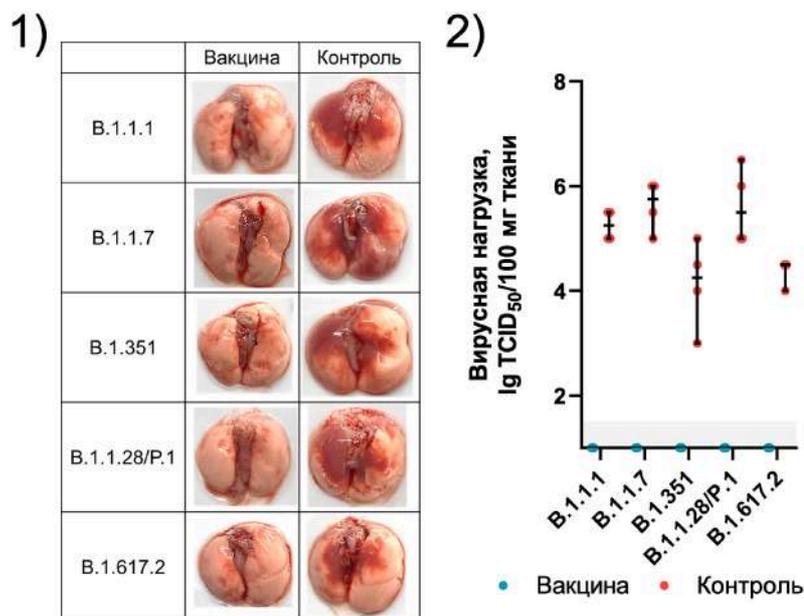


Рисунок 4 - 1) Фотографии легких вакцинированных и контрольных (плацебо) мышей через 4 дня после заражения различными вариантами SARS-CoV-2. 2) Вирусная нагрузка (TCID₅₀/мл) в 10% гомогенатах легких вакцинированных и контрольных животных на 4-й день после заражения (n=4 в каждой группе). Данные представлены в виде индивидуальных значений вирусной нагрузки в легком каждой мыши, медианы и 95% доверительного интервала. Тест Манна-Уитни показал достоверное снижение вирусной нагрузки у всех вакцинированных мышей по сравнению с контрольными мышами (p=0,0286).

Анализ динамики массы тела не показал существенной потери массы тела в группе вакцинированных животных после заражения различными вариантами SARS-CoV-2, в то время как в группах контроля снижение массы тела было отмечено начиная со 2 дня после заражения (рисунок 5). Предварительная

иммунизация Гам-КОВИД-Вак оказала полную 100% защиту вакцинированных hACE2-трансгенных мышей от летального заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантами В.1.1.7, В.1.351, В.1.1.28/P1 и В.1.617.2 (рисунок 5).

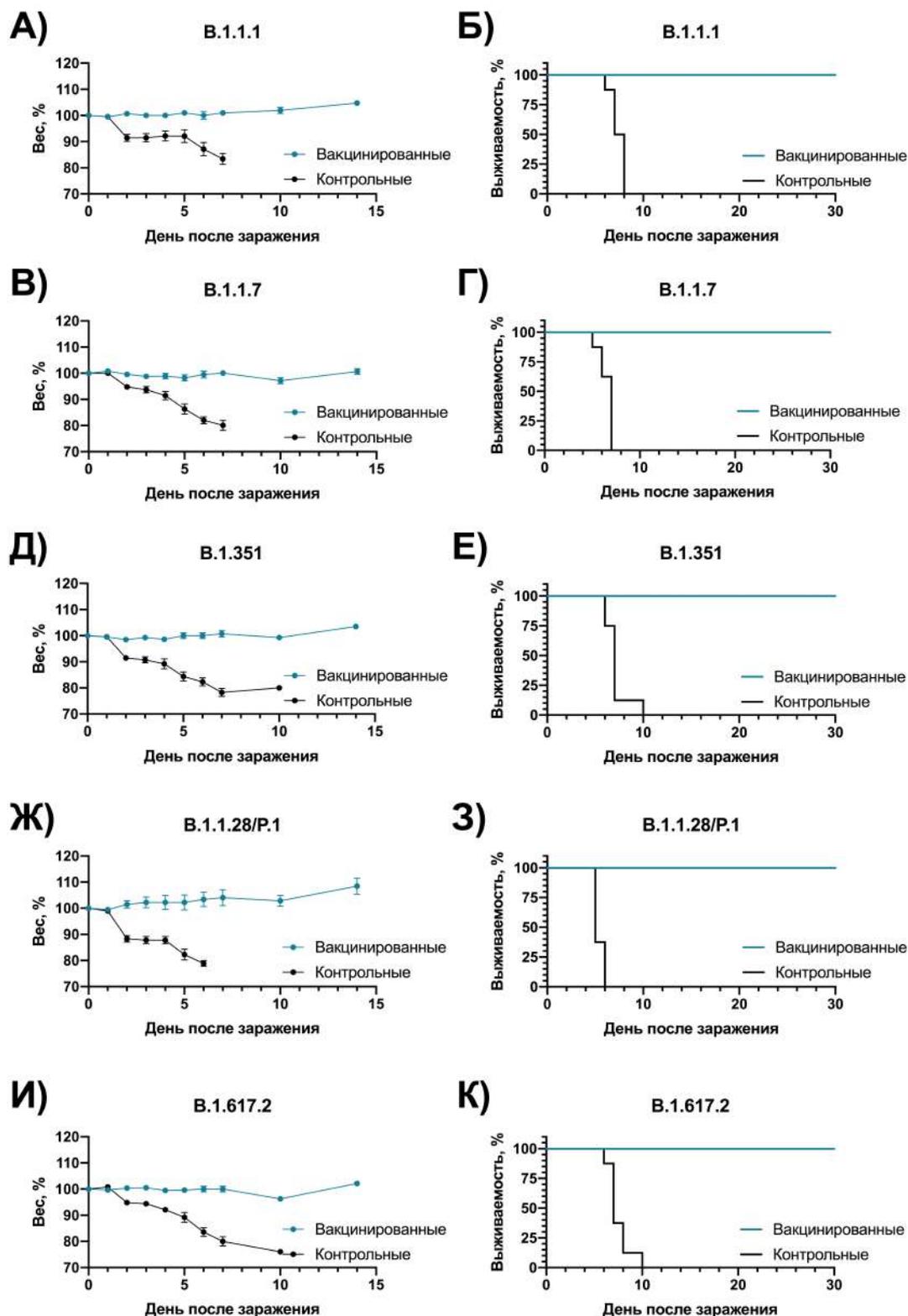


Рисунок 5 – Изменение массы тела (среднее \pm стандартная ошибка среднего) (А, В, Д, Ж, И) и выживаемость (%) (Б, Г, Е, З, К) в группах вакцинированных и контрольных животных после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантами В.1.1.1, В.1.1.7, В.1.351, В.1.1.28/P.1 и В.1.617.2, соответственно.

Таким образом, по результатам проведенного исследования было показано, что вакцинация hACE2-трансгенных мышей препаратом Гам-КОВИД-Вак позволяет защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантами B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28/P1 и B.1.617.2 при заражении через неделю после второй вакцинации.

Исследование протективной эффективности вакцин Гам-КОВИД-Вак Дельта, Омикрон и Дельта-Омикрон на модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей

На первом этапе проводили вакцинацию животных разными антигенными вариантами вакцины (Ухань, Дельта, Омикрон, Дельта-Омикрон) двукратно с интервалом в 21 день. В исследовании использовали hACE2-трансгенных мышей. Через неделю после второй дозы вакцины у животных собирали сыворотки крови и определяли уровень ВНА. Результаты исследования представлены на рисунке 6.

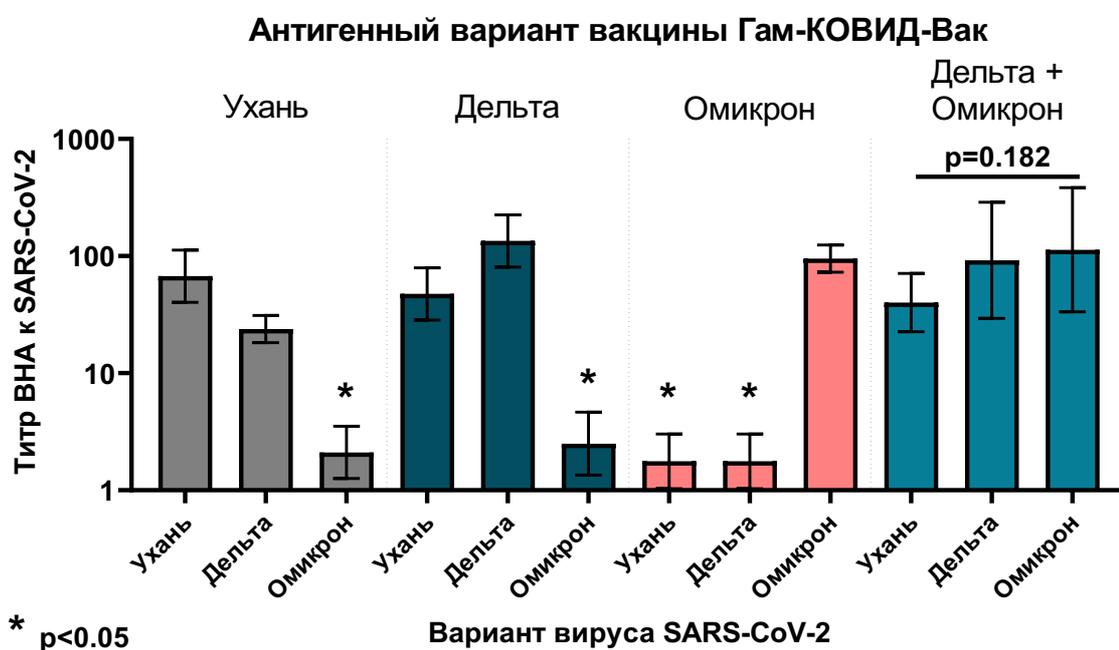


Рисунок 6 - Уровни вируснейтрализующих к различным вариантам вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови мышей, вакцинированных различными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак, через неделю после введения второй дозы вакцины. На рисунке отмечено среднее геометрическое титра ВНА, 95% доверительный интервал, уровни значимости p (критерий Вилкоксона).

По результатам проведенного исследования было показано, что вакцинация животных всеми исследуемыми вариантами вакцины позволяет индуцировать формирование вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. Вакцинация моноантигенными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак (Ухань, Дельта, Омикрон) приводит к формированию ВНА преимущественно к гомологичному варианту вируса SARS-CoV-2 или близкому к гомологичному. Вакцинация же комбинированной вакциной Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон позволяет индуцировать ВНА широкого репертуара – ВНА к вариантам Ухань, Дельта и Омикрон детектируются на сходном уровне (рисунок 6).

На следующем этапе проводили исследование эффективности вакцины на модели инфекции с использованием hACE2-трансгенных мышей. Поскольку вариант Омикрон ВА.1 оказался слабопатогенным для трансгенных мышей (не вызывает снижения веса животных, не вызывает летальности животных), об эффективности препаратов можно судить только по уровню вирусной нагрузки в легких животных после заражения.

Животных вакцинировали двукратно с интервалом в 21 день, через неделю после второй дозы вакцины животных заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 в дозе 10^5 TCID₅₀/мышь. На 4 сутки после заражения часть животных подвергали эвтаназии для определения уровня вирусной нагрузки в легких. Результаты исследования вирусной нагрузки представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Вирусная нагрузка в легких вакцинированных и контрольных hACE2-трансгенных мышей через 4 дня после заражения различными вариантами вируса SARS-CoV-2.

Заражение вирусом SARS-CoV-2	Вирусная нагрузка, lg TCID ₅₀ /мл среднее ±SEM		Снижение вирусной нагрузки, lg TCID ₅₀
	Вакцинированные	Контрольные	
Вариант вакцины Гам-КОВИД-Вак Ухань			
Ухань	0	4,89±0,40	4,89
Омикрон ВА.1	0	3,67±0,44	3,67
Омикрон ВА.2	0	3,67±0,29	3,67
Омикрон ВА.5	3,67±0,07	4,39±0,34	0,72
Вариант вакцины Гам-КОВИД-Вак Дельта			
Ухань	0	4,89±0,40	4,89
Омикрон ВА.1	0	3,67±0,44	3,67
Омикрон ВА.2	0	3,67±0,29	3,67
Омикрон ВА.5	3,39±0,14	4,39±0,34	1,00
Вариант вакцины Гам-КОВИД-Вак Омикрон			
Ухань	0	4,89±0,40	4,89
Омикрон ВА.1	0	3,67±0,44	3,67
Омикрон ВА.2	0	3,67±0,29	3,67
Омикрон ВА.5	3,83±0,12	4,39±0,34	0,56
Вариант вакцины Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон			
Ухань	0	4,89±0,40	4,89
Омикрон ВА.1	0	3,67±0,44	3,67
Омикрон ВА.2	0	3,67±0,29	3,67
Омикрон ВА.5	2,06±0,67	4,39±0,34	2,33

В результате проведенных исследований было показано, что у животных, вакцинированных всеми исследуемыми препаратами и зараженных вирусом SARS-CoV-2 вариантами Ухань, Омикрон ВА.1 и ВА.2, в легких не определяется инфекционно-активный вирус. В то же время у животных, зараженных вирусом

SARS-CoV-2 вариант Омикрон ВА.5, детектируется инфекционно-активный вирус в легких через 4 дня после заражения. При этом, в группе животных, получивших вакцину Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон, наблюдалось значительное снижение вирусной нагрузки (более чем в 200 раз, $p=0,013$) в сравнении с контрольными животными, что свидетельствует об эффективности вакцинации.

Анализ динамики массы тела животных после заражения не выявил значимого снижения веса вакцинированных животных после заражения вариантами Ухань, Омикрон ВА.2 и ВА.5, в то время как у контрольных животных масса тела значительно снижается после заражения (рисунок 7). Так, у животных вакцинированных групп отсутствовала отрицательная динамика изменения массы тела после заражения вирусом SARS-CoV-2.

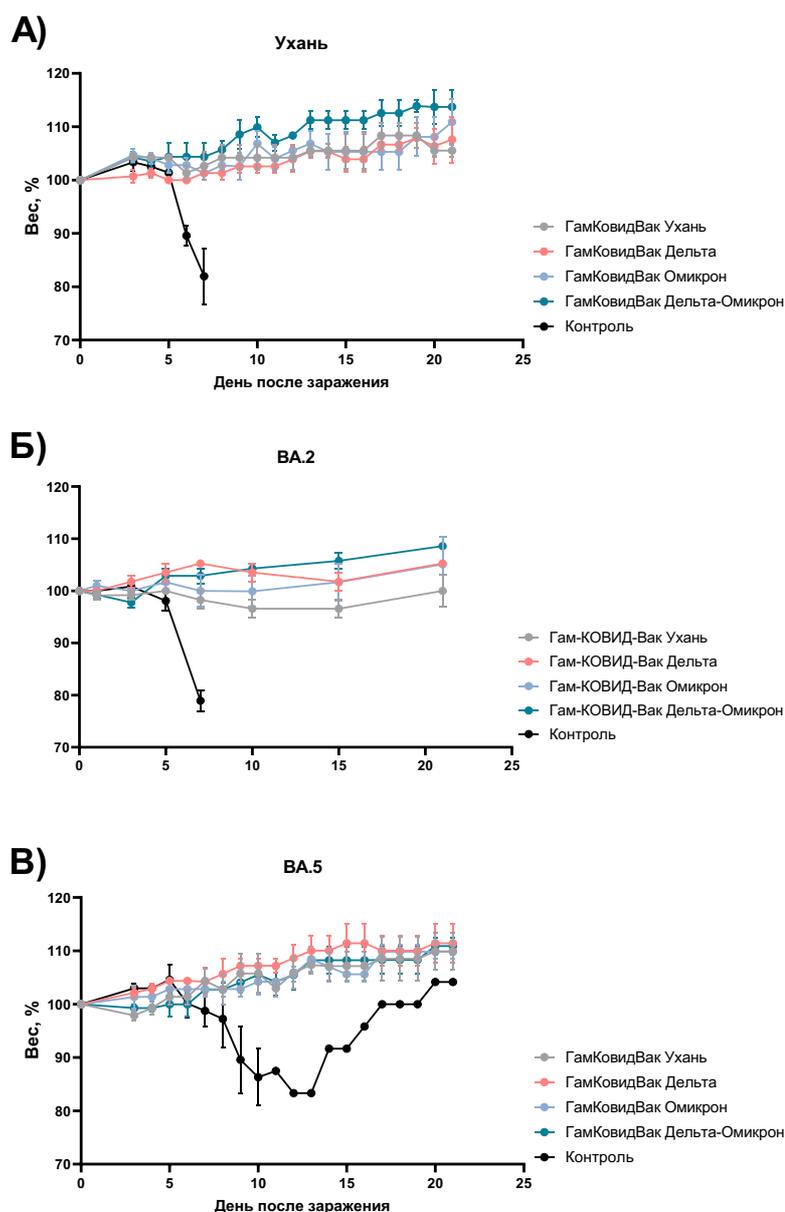


Рисунок 7 - Изменение массы тела животных, вакцинированных различными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак, и контрольных групп после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантом Ухань (А), Омикрон ВА.2 (Б), Омикрон ВА.5 (В). На рисунке представлено среднее \pm SEM значение веса животных по группе.

Исследование выживаемости животных показало, что после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантами Ухань, Омикрон ВА.2 и Омикрон ВА.5 в группах животных, вакцинированных всеми исследуемыми препаратами, отсутствовала гибель животных после заражения (рисунок 8), что свидетельствует об эффективности препаратов.

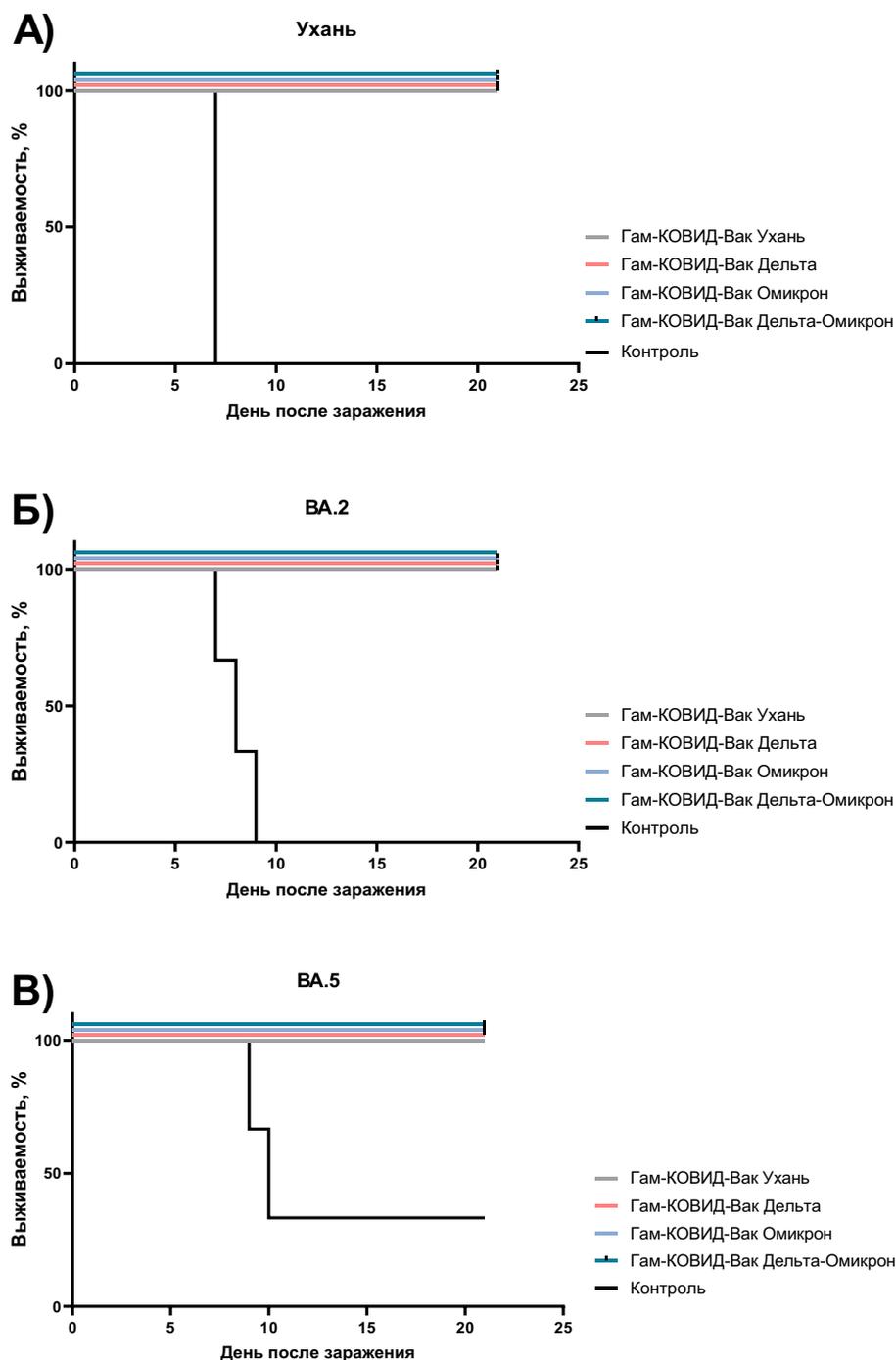


Рисунок 8 - Выживаемость животных, вакцинированных различными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак, и контрольных групп после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантом Ухань (А), Омикрон ВА.2 (Б), Омикрон ВА.5 (В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной диссертационной работы был продемонстрирован алгоритм лабораторного мониторинга протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак, позволяющий своевременно оценивать необходимость смены антигенного состава вакцины в течении продолжающейся пандемии COVID-19. Алгоритм мониторинга состоит из следующих экспериментальных моделей: культура клеток Vero E6, hACE2-трансгенные мыши и сирийские хомячки с индуцированной иммуносупрессией. С использованием данного алгоритма было проведено комплексное исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2, в ходе которого было продемонстрировано снижение эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон. В связи с этим в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана кандидатная комбинированная вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон с измененным антигенным составом, продемонстрировавшая свою эффективность в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Ухань и варианта Омикрон различных сублиний. Таким образом, была продемонстрирована применимость данных экспериментальных моделей для анализа необходимости смены антигенного варианта вакцины Гам-КОВИД-Вак.

ВЫВОДЫ

1. Адаптированы модели летальной инфекции COVID-19 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией и у hACE2-трансгенных мышей.

2. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак защищает 100% hACE2-трансгенных мышей от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантами Альфа, Бета, Гамма, Дельта, Омикрон сублинии BA.2. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак защищает 100% hACE2-трансгенных мышей от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантом Омикрон BA.1. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак защищает 100% hACE2-трансгенных мышей от сублетальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантом Омикрон BA.5, однако снижение вирусной нагрузки в легких вакцинированных животных после заражения составляет менее 2 lg.

3. Показано отсутствие снижения нейтрализующей активности сывороток крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Альфа; детектировано снижение уровня вируснейтрализующих антител в отношении варианта Бета в 3,1 раза, Гамма - в 2,8 раза, Дельта – в 2,5 раза, Омикрон BA.1 – в 9,6 раз, BA.2 – в 3,8 раза, BA.5 – в 10,3 раз.

4. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта индуцирует формирование протективного иммунного ответа у hACE2-трансгенных мышей и сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией, который обеспечивает защиту 100% животных от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантами Омикрон BA.1 и Омикрон BA.2.

5. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак Омикрон индуцирует формирование протективного иммунного ответа у hACE2-трансгенных мышей и сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией, который обеспечивает защиту 100% животных от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантами Омикрон BA.1 и Омикрон BA.2.

6. Показано, что комбинированная вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон индуцирует формирование нейтрализующих антител широкого спектра действия, а также индуцирует формирование протективного иммунного ответа, который обеспечивает защиту 100% животных от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариант Омикрон BA.1, BA.2 и BA.5.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Dolzhikova I.V. Immunogenicity and Protectivity of Sputnik V Vaccine in hACE2-Transgenic Mice against Homologous and Heterologous SARS-CoV-2 Lineages Including Far-Distanced Omicron BA.5. / Dolzhikova I.V., Tukhvatulin A.I., **Grousova D.M.**, Zorkov I.D., Komyakova M.E., Ilyukhina A.A., Kovyrshina A.V., Shelkov A.Y., Botikov A.G., Samokhvalova E.G., Reshetnikov D.A., Siniavin A.E., Savina D.M., Shcheblyakov D.V., Izhaeva F.M., Dzharullaeva A.S., Erokhova A.S., Popova O., Ozharovskaya T.A., Zrelkin D.I., Goldovskaya P.P., Semikhin A.S., Zubkova O.V., Nedorubov A.A., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. // *Vaccines*. – 2024. - №12(10). – С.1152.

2. Tukhvatulin A.I. Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-human primates. / Tukhvatulin A.I., Gordeychuk I.V., Dolzhikova I.V., Dzharullaeva A.S., Krasina M.E., Bayurova E.O., **Grousova D.M.**, Kovyrshina A.V., Kondrashova A.S., Avdoshina D.V., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Illarionova V.V., Zorkov I.D., Iliukhina A.A., Shelkov A.Y., Botikov A.G., Erokhova A.S., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Zubkova O.V., Tokarskaya E.A., Savina D.M., Vereveyko Y.R., Ungur A.S., Naroditsky B.S., Ishmukhametov A.A., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. // *Emerg Microbes Infect.* – 2022. - №11(1). – С.2229-2247.

3. Lapa D., **Grousova D.M.** Retention of Neutralizing Response against SARS-CoV-2 Omicron Variant in Sputnik V-Vaccinated Individuals. / Lapa D., **Grousova D.M.**, Matusali G., Meschi S., Colavita F., Bettini A., Gramigna G., Francalancia M., Garbuglia A.R., Girardi E., Puro V., Antinori A., Kovyrshina A.V., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Gushchin V.A., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Vaia F., Gintsburg A.L. // *Vaccines*. – 2022. - №10(5). – С.817.

4. Gushchin V.A. Neutralizing Activity of Sera from Sputnik V-Vaccinated People against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants. / Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A., Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Burgasova O.A., Kolobukhina L.V., Iliukhina A.A., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Kuzina A.V., **Grousova D.M.**, Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Karpova O.V., Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kunda M.S., Lioznov D.A., Danilenko D.M., Komissarov A.B., Tkachuck A.P., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. // *Vaccines*. – 2021. - №9(7). – С.779.

5. **Гроусова Д.М.** Разработка модели летальной инфекции COVID-19 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией. / **Гроусова Д.М.**, Должикова И.В., Зорков И.Д., Шелков А.Ю., Илюхина А.А., Ковыршина А.В., Ботиков А.Г., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Социально значимые и особо опасные инфекционные заболевания, Тезисы IX Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием 8-11 ноября 2022 г., Сочи, Сборник тезисов и докладов. - 2022. - С. 62-65.