

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Гроусова Дарья Михайловна

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

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
И.В. Должикова

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Коронавирусная инфекция COVID-19.....	15
1.2 Структура вируса SARS-CoV-2.....	17
1.3 Жизненный цикл вируса SARS-CoV-2	19
1.4 Функции белков вируса SARS-CoV-2 и возможность их использования при создании профилактических препаратов	22
1.4.1 Гликопротеин S.....	22
1.4.2 Оболочечный белок E.....	25
1.4.3 Нуклеокапсидный белок N	25
1.4.4 Основная протеаза MPro и папаин-подобная протеаза PLPro	26
1.4.5 Другие неструктурные белки.....	27
1.4.6 Белки открытой рамки считывания (ORF)	29
1.5 Особенности иммунного ответа в отношении вируса SARS-CoV-2	30
1.6 Генетические особенности разных вариантов вируса SARS-CoV-2	32
1.7 Модели COVID-19 у животных для оценки эффективности профилактических и терапевтических средств.....	38
1.8 Разработка вакцин для профилактики COVID-19	43
1.9 Заключение	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1 Материалы.....	51
2.1.1 Оборудование.....	51
2.1.2 Вирусы	52
2.1.3 Линии клеток млекопитающих	52
2.1.4 Животные	52
2.1.5 Сыворотки крови вакцинированных добровольцев	53
2.1.6 Среды для культивирования эукариотических клеток	53
2.1.7 Наборы	54

2.1.8 Иммунобиологические препараты	54
2.2 Методы.....	56
2.2.1 Работа с вирусом SARS-CoV-2.....	56
2.2.2 Нарботка и анализ инфекционной активности SARS-CoV-2	56
2.2.2.1 Нарботка SARS-CoV-2	56
2.2.2.2 Определение титра вируса SARS-CoV-2 по TCID ₅₀	57
2.2.2.3 Определение количества вирусных частиц методом ОТ-ПЦР-РВ	57
2.2.3 Анализ уровня вируснейтрализующих антител	57
2.2.4 Исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак	58
2.2.4.1 Содержание животных	58
2.2.4.2 Иммунизация животных	59
2.2.4.3 Получение сыворотки крови животных	59
2.2.4.5 Исследование протективной активности вакцины при интраназальном заражении сирийских хомячков вирусом SARS-CoV-2	60
2.2.4.6 Исследование протективной активности вакцины при интраназальном заражении трансгенных мышей вирусом SARS-CoV-2.....	60
2.2.4.7 Определение вирусной нагрузки в легких	61
2.2.5 Гистологический анализ	62
2.2.6 Статистические и биоинформатические методы.....	63
2.2.6.1 Статистическая обработка результатов исследований	63
2.2.7.2 Биоинформатические методы.....	63
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	64
3.1 Общая схема исследования.....	64
3.2 Исследование нейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении различных вариантов вируса SARS- CoV-2.....	65
3.2.1 Исследование нейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении вируса SARS- CoV-2 вариантов Альфа, Бета, Гамма и Дельта.....	65

3.2.2 Исследование нейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон.....	67
3.3 Адаптация модели COVID-19 у лабораторных животных.....	70
3.3.1 Адаптация модели COVID-19 у сирийских хомячков.....	70
3.3.2 Адаптация модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей.....	79
3.4 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.....	82
3.5 Адаптация модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей для исследования протективной эффективности в отношении вируса SARS-CoV-2 вариант Омикрон В.1.1.529.....	88
3.6 Исследование протективной эффективности различных антигенных вариантов вакцины Гам-КОВИД-Вак на моделях COVID-19 у лабораторных животных.....	91
3.6.1 Исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак Дельта на модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей.....	91
3.6.2 Исследование протективной эффективности вакцин Гам-КОВИД-Вак Дельта, Омикрон и Дельта-Омикрон на модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей.....	93
3.6.3 Исследование протективной эффективности вакцин Гам-КОВИД-Вак Омикрон и Дельта-Омикрон на модели COVID-19 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией.....	100
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	115
ВЫВОДЫ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	122
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	150

БЛАГОДАРНОСТИ 159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

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 вирус SARS-CoV-2, относящийся к семейству *Coronaviridae* род *Betacoronavirus*. Известны различные пути передачи вируса: воздушно-капельный (при кашле, чихании, разговоре), воздушно-пылевой и контактный. COVID-19 в основном проявляется в виде респираторного заболевания, течение заболевания от легкого до тяжелого и летального исхода. Также известны случаи бессимптомного носительства [WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic., 2020].

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 (ВОЗ) 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.

По данным ВОЗ, на 30 марта 2023 г. имеется множество вакцин-кандидатов на различных платформах: 183 кандидатных вакцины на стадии клинических испытаний и 199 – на стадии доклинических испытаний [WHO. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. 2023]. 50 вакцин одобрены как минимум одним национальным регулирующим органом для экстренного применения: 9 - на основе рекомбинантных вирусных векторов, 9 – на основе РНК, 1 – на основе ДНК, 11 - инактивированных вакцин, 19 - на основе рекомбинантного белка и 1 - на основе вирусоподобных частиц. Двенадцать вакцин одобрены ВОЗ для экстренного применения.

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. Появление мутаций обусловлено несколькими факторами: недостаточная точность вирусной полимеразы, приспособляемость, возможность хронизации инфекции у лиц с ослабленным иммунитетом и наличие иммунной прослойки. На сегодняшний день более 15 миллионов последовательностей SARS-CoV-2 доступны в международной базе данных GISAID. Секвенирование позволяет идентифицировать появляющиеся варианты SARS-CoV-2 и наборы мутаций, потенциально связанные с изменениями свойств вируса. Эволюционно важные мутации и делеции появились в генах SARS-

CoV-2, кодирующих белки, которые взаимодействуют с иммунной системой хозяина. Первая критичная мутация привела к замене аминокислотного остатка в положении D614G гликопротеина вируса, что привело к значительному повышению его трансмиссивности [Korber В. и др., 2020]. Сегодня известен целый ряд замен в гликопротеине, увеличивающих аффинность связывания с рецептором 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. Оценку эпидемиологической эффективности вакцин проводят в ходе длительных клинических исследований или в ходе ретроспективного анализа, что не позволяет использовать данный метод для своевременного обновления антигенного состава вакцин. Для принятия решения о смене антигенного состава необходимо разрабатывать подходы для оценки эффективности вакцины в лабораторных условиях за короткие сроки.

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 трансгенных мышей, несущих ген ангиотензин превращающего фермента 2 человека (hACE2).
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 вакцины 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 hACE2-трансгенных мышей. 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 хомяков 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 проведенного 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Коронавирусная инфекция COVID-19

В декабре 2019 года появились первые сведения о вспышке пневмонии неизвестной этиологии в Ухане (провинция Хубэй, Китай). По данным эпидемиологического анализа первые случаи заболевания связаны с оптовым рынком Хуанань [Li Q. и др., 2020]. С помощью секвенирования нового поколения в образцах нижних дыхательных путей заболевших пациентов обнаружили неизвестный бета-коронавирус, который в дальнейшем был выделен с использованием культуры клеток. Вирус назвали новым коронавирусом 2019 года (2019-nCoV) [Zhu N. и др., 2020]. Вирус имеет диаметр от 60 до 140 нм с характерными для семейства *Coronaviridae* шипами от 9 до 12 нм [Zhu N. и др., 2020]. Было обнаружено, что филогенетически новый коронавирус имеет большее сходство с двумя штаммами коронавируса летучих мышей (сходство ~88%), чем с коронавирусами людей, включая SARS-CoV (сходство ~79%) и MERS-CoV (сходство ~50%) [Lu R. и др., 2020]. На основании филогенетического и таксономического анализа 11 февраля 2020 года исследовательская группа *Coronaviridae* Международного комитета по таксономии вирусов назвала новый вирус SARS-CoV-2 [Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses *Nature Microbiology*, 2020]. ВОЗ назвала возникшую болезнь коронавирусной инфекцией 2019 (COVID-19) [WHO. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it., 2020]. 11 марта 2020 г. ВОЗ объявила пандемию COVID-19.

С момента начала вспышки в Китае заболевание быстро распространялось и число случаев увеличивалось в геометрической прогрессии. 11 января 2020 года был зарегистрирован первый случай заболевания за пределами материкового Китая - в Таиланде, и в течение нескольких месяцев болезнь распространилась на все

континенты кроме Антарктиды [WHO. WHO statement on novel coronavirus in Thailand., 2020; Dhar Chowdhury S., Oommen A.M., 2020].

По состоянию на 27 октября 2024 г. зарегистрировано 776 754 317 лабораторно-подтвержденных случаев заболевания COVID-19, включая 7 073 466 летальных исходов [WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard., 2024].

Основным путем передачи SARS-CoV-2 является воздушно-капельный путь от пациентов с COVID-19 [Cascella M. и др., 2022]. Передача вируса через fomites хорошо описана на основании многих исследований, сообщающих о жизнеспособности SARS-CoV-2 на различных пористых и непористых поверхностях [van Doremalen N. и др., 2020; Riddell S. и др., 2020; Guo Z.D. и др., 2020]. Было показано, что жизнеспособный вирус SARS-CoV-2 в виде аэрозоля сохраняется 1-2 часа, на предметах из нержавеющей стали и пластика – 5-7 часов [van Doremalen N. и др., 2020]. Эпидемиологические данные нескольких исследований показали, что у пациентов с COVID-19 живой вирус присутствует в фекалиях, что указывает на возможную фекально-оральную передачу [Yeo C. и др., 2020]. Метаанализ, в который были включены 936 новорожденных от матерей с COVID-19, показал, что вертикальная передача возможна, но встречается лишь в 3,2% случаев [Kotlyar A.M. и др., 2021].

Средний инкубационный период для SARS-CoV-2 в начале пандемии составлял 5-6 дней, и у большинства пациентов симптомы развивались в течение 11-12 дней после заражения [Lauer S.A. и др., 2020]. Клинические проявления COVID-19 варьируются от бессимптомных форм до острой дыхательной недостаточности (требующей искусственной вентиляции легких), септического шока и полиорганной недостаточности. По оценкам исследователей, от 17,9% до 33,3% инфицированных пациентов являются бессимптомными носителями вируса SARS-CoV-2 [Mizumoto K. и др., 2020; Nishiura H. и др., 2020]. У подавляющего большинства пациентов с симптомами обычно наблюдаются лихорадка, кашель и одышка, реже — боль в горле, аносмия, дисгевзия, анорексия, тошнота, недомогание, миалгии и диарея. Среди 373 883 подтвержденных случаев симптоматического COVID-19 в США 70% пациентов испытывали лихорадку,

кашель, одышку, 36% - миалгию и 34% - головную боль [Stokes E.K. и др., 2020]. Метаанализ оценки клинико-патологических характеристик 8697 пациентов с COVID-19 в Китае, показал следующие отклонения в лабораторных показателях: лимфопению (47,6%), повышенный уровень С-реактивного белка (65,9%), повышенный уровень сердечных ферментов (49,4%) и аномальные функциональные тесты печени (26,4%) [Guo T. и др., 2020]. Другие лабораторные отклонения включали повышение уровня D-димера (20,4%), повышение скорости оседания эритроцитов (20,4%), лейкоцитоз (9,9%), повышение уровня прокальцитонина (16,7%) и нарушение функции почек (10,9%) [Zhu J. и др., 2020]. Метаанализ 212 опубликованных исследований с участием 281 461 человека из 11 регионов показал, что тяжелое течение COVID-19 было отмечено примерно у 23% пациентов, а число COVID-ассоциированных летальных исходов составило около 6% [Li J. и др., 2021]. Повышенное отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR), производное отношение NLR (d-NLR) [количество нейтрофилов, деленное на результат количества лейкоцитов минус количество нейтрофилов] и соотношение тромбоцитов к лимфоцитам свидетельствует о цитокин-индуцированном воспалительном шторме [Yang A.P. и др., 2020].

1.2 Структура вируса SARS-CoV-2

Знание структуры вируса и его вирусных компонентов имеет решающее значение для разработки новых методов терапии, профилактики и диагностики COVID-19.

SARS-CoV-2 относится к одноцепочечным (+)РНК-содержащим вирусам подрода *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae* порядка *Nidovirales*. Размер генома SARS-CoV-2 варьирует от 29,8 до 29,9 тысяч пар нуклеотидов, а структура его генома соответствует известным ранее бетакоронавирусам [Hu D. и др., 2018].

Несколько групп ученых использовали современные методы криоэлектронной томографии (криоЭТ) и усреднения субтомограмм (УСТ) для

визуализации интактных вирионов SARS-CoV-2, что позволило получить представление об их молекулярной структуре и организации. Вирионы SARS-CoV-2 имеют сферическую или эллипсоидальную форму со средним диаметром 108 ± 8 нм. Внешняя поверхность вириона покрыта поверхностными шиповидными белками (S) (рисунок 1Б). Белок S выглядит как гибкая головка на ножке, способная наклоняться до 90° по отношению к мембране (рисунок 1Б). Эта гибкость обеспечивается шарнирами в области стебля (рисунок 1Б) [Ke Z. и др., 2020; Yao H. и др., 2020; Liu C. и др., 2020; Turoňová V. и др., 2020]. Поверхность тримера S сильно гликозилирована, причем каждый мономер S содержит 22 гликозилированных сайта [Osipiuk J. и др., 2021]. Эта гликановая оболочка в сочетании с гибкостью белка S вируса SARS-CoV-2 позволяет ему связываться с клеточным рецептором ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) [Ke Z. и др., 2020; Turoňová V. и др., 2020].

Наружная мембрана вируса содержит мембранный белок (M) и оболочечный белок (E). В просвете вириона находится рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из нуклеокапсидного белка (N) и вирусного генома, ответственные за упаковку РНК-генома вируса (рисунок 1Б) [Ke Z. и др., 2020]. Неструктурные белки (Nsps) Nsp1-16 продуцируются в результате саморасщепления полипротеинов-предшественников Pp1a и Pp1ab вирусными протеазами. PLPro (Nsp3) расщепляет три сайта, в результате чего образуются свободные Nsp1-3, тогда как MPro (Nsp5) отвечает за оставшиеся 11 сайтов расщепления. Это позволяет Nsps выполнять следующие функции: РНК-зависимой РНК полимеразы RdRp (Nsp12), хеликазы (Nsp13), репликации вирусного генома, транскрипции и транспорт РНК (рисунок 1А) [Osipiuk J. и др., 2021].

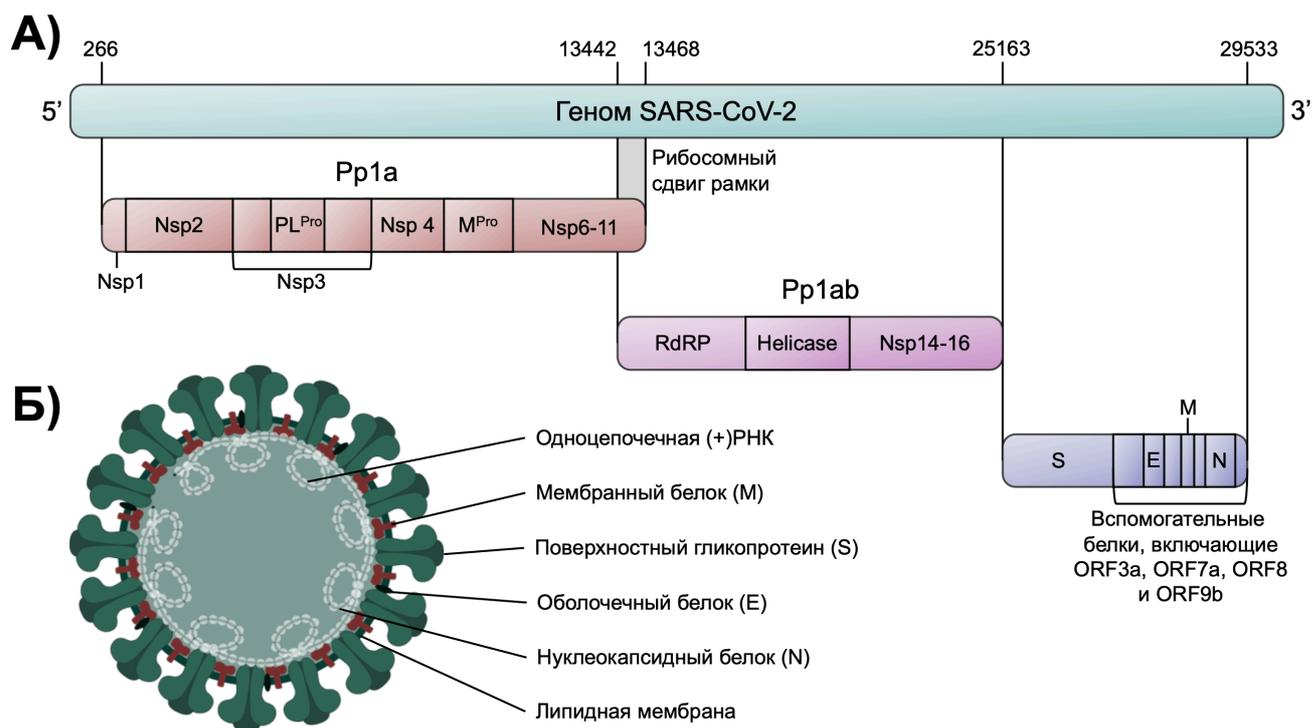


Рисунок 1 – Структурная организация SARS-CoV-2. А) Общая геномная организация SARS-CoV-2. Неструктурные белки Nsp1-16 экспрессируются в виде полипротеинов Pp1a и Pp1ab и расщепляются внутренними протеазами M^{Pro} и PL^{Pro}. Структурные белки S, E, M и N кодируются соответствующими генами, расположенными между дополнительными белками, которые включают ORF3a. Б) Схематическая модель вириона SARS-CoV-2 с указанными структурными белками.

1.3 Жизненный цикл вируса SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 может проникать в клетку различными путями. Наиболее изученным путем является проникновение в клетку через рецептор ACE2 за счет рецептор-связывающего домена (RBD) белка S (рисунок 2(1)) [Hoffmann M. и др., 2020; Letko M. и др., 2020; Ou X. и др., 2020]. Для интернализации необходимо расщепление белка S трансмембранной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2), что позволяет ему высвободить пептид слияния, содержащийся в домене S2, и значительно увеличивает шанс проникновения SARS-CoV-2 в клетку [Hoffmann M. и др., 2020; Letko M. и др., 2020; Walls A.C. и др., 2020].

Помимо расщепления с помощью TMPRSS2, также возможно расщепление белка S катепсином L во время эндоцитоза. Интересно, что подобно классическому сайту расщепления, известному в S-белке SARS-CoV, S-белок SARS-CoV-2 имеет фуриноподобный сайт расщепления, часто наблюдаемый у высоковирулентных вирусов гриппа. Это делает возможным расщепление белка в аппарате Гольджи во время биосинтеза и расширяет тропизм и трансмиссивность из-за почти повсеместной экспрессии фуриноподобной протеазы [Walls A.C. и др., 2020]. В различных литературных источниках продемонстрировано связывание ACE2/RBD, но недавно был обнаружен новый путь проникновения вируса в клетку - через CD147 (басигин), мембранный белок, внеклеточная металлопротеиназа матрикса [Wang K. и др., 2020].

Процесс проникновения и слияния приводит к высвобождению содержимого вириона внутрь клетки-мишени (рисунок 2(2)). Следующим шагом в вирусном цикле является трансляция комплекса репликаза-транскриптаза непосредственно с геномной РНК (рисунок 2(3)) - процесс, требующий рибосомного сдвига рамки считывания [Knipe D.M., Howley P.M., 2013; Baranov P.V. и др., 2005]. Данный процесс может являться средством уклонения от иммунного ответа [Knoops K. и др., 2008; Ogando N.S. и др., 2020].

После этого генерируются промежуточные РНК с отрицательной полярностью, которые служат матрицами для синтеза геномной РНК, с одной стороны, и субгеномной РНК, с другой стороны, которые будут кодировать структурные белки и несколько вспомогательных белков (рисунок 2(4,5)) [Sethna P.V. и др., 1989].

После трансляции белки М, S и E встраиваются в мембрану эндоплазматического ретикула (ER) (рисунок 2(6)). Оттуда они транспортируются через секреторный путь к месту сборки – кластеру, состоящему из эндоплазматического ретикула и аппарата Гольджи (ERGIC) [Knipe D.M., Howley P.M., 2013; Masters P.S. и др., 2006]. Сборка требует сложного взаимодействия между белком М и другими структурными белками, особенно белком Е [Knipe D.M., Howley P.M., 2013; Masters P.S. и др., 2006; Mousavizadeh L.,

Ghasemi S., 2020; Fischer F. и др., 1998], Белковые комплексы N с вновь синтезированной геномной РНК в цитоплазме образуют нуклеокапсид N, который затем достигает ERGIC, в котором образуется дочерний вирус путем слияния N с компонентами оболочки (рисунок 2(7)).

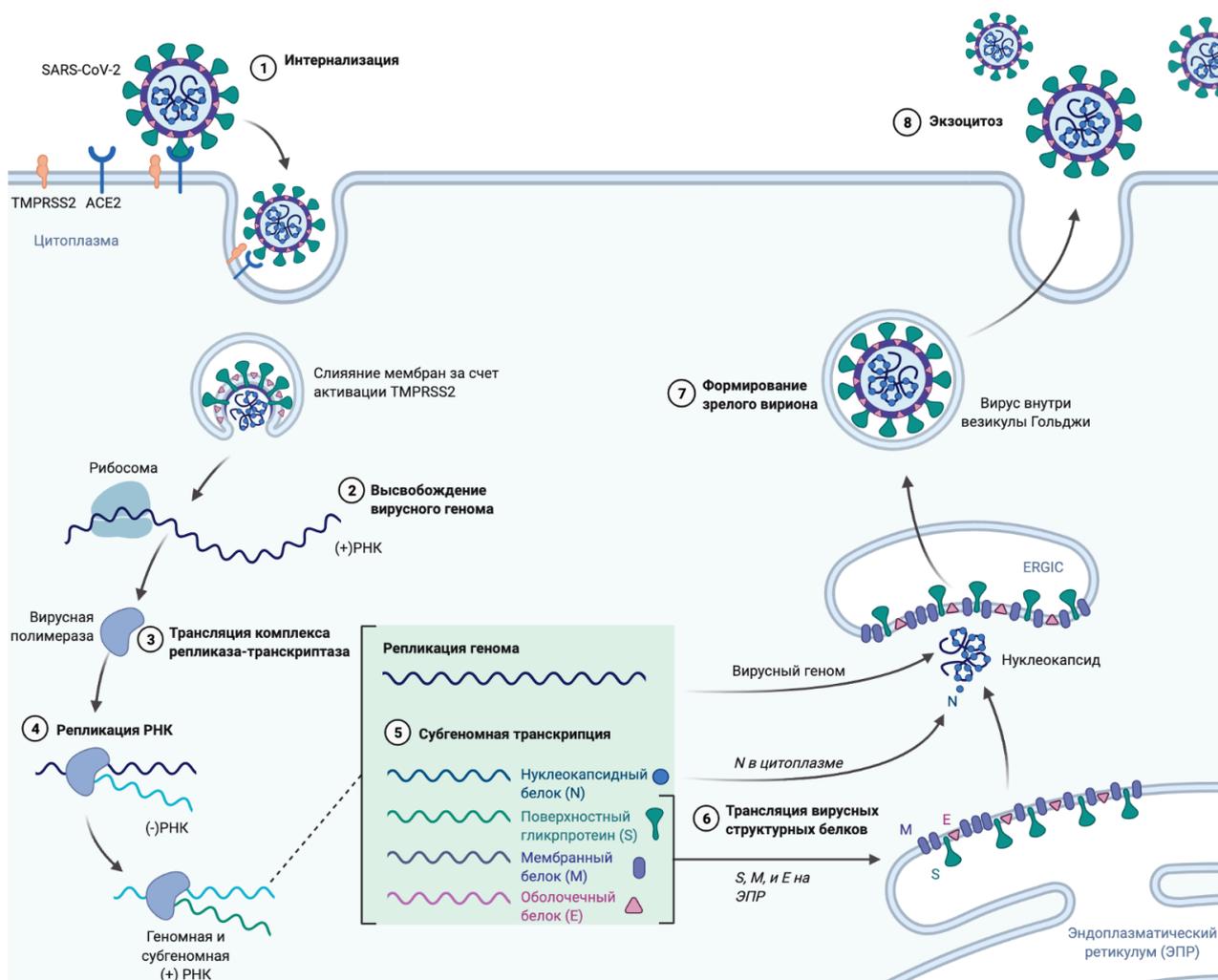


Рисунок 2 - Жизненный цикл SARS-CoV-2. (1) Проникновение SARS-CoV-2 в клетку-мишень, экспрессирующую ACE2 (или CD147). (2) Высвобождение одноцепочечного (+)-РНК-генома SARS-CoV-2. (3) Трансляция комплекса репликаза-транскриптаза. (4) Репликация генома РНК с помощью матричной (-) РНК. (5) Синтез субгеномной РНК, кодирующей структурные белки. (6) Трансляция вирусных S, E и M на эндоплазматическом ретикулуме, и N в цитоплазме. (7) Нуклеокапсид, связанный с геномом, объединяясь с S, E и M, образует зрелый вирион. (8) Экзоцитоз SARS-CoV-2 [Изображение создано с помощью biorender.com].

Последним этапом в жизненном цикле вируса является экзоцитоз вириона (рисунок 2(8)). Почкование вируса происходит вблизи аппарата Гольджи, предположительно в гладких мембранах ERGIC [Ogando N.S. и др., 2020]. Это приводит к двум явлениям: трансмиссии и распространению вируса в другие органы. Передача вируса от инфицированного человека осуществляется в основном воздушно-капельным или контактным путем [Ghinai I. и др., 2020; Han Y., Yang H., 2020; Chan J.F.W. и др., 2020]. Однако не исключен и фекально-оральный путь передачи, поскольку вирус обнаруживают в пищеварительном тракте и кале [Yeо C. и др., 2020; Gu J. и др., 2020]. Помимо этого, вирус был обнаружен и на поверхности глаза, где также экспрессируется ACE2 [Naroli P.E. и др., 2020].

1.4 Функции белков вируса SARS-CoV-2 и возможность их использования при создании профилактических препаратов

1.4.1 Гликопротеин S

Поверхностный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2 представляет собой тример с молекулярной массой около 600 кДа. Расположенный на внешней оболочке вириона, он играет критическую роль в вирусной инфекции благодаря распознаванию рецепторов и опосредованию слияния мембран вируса и клетки-хозяина. Также было показано, что S вызывает сильный иммунный ответ, что делает его основной мишенью для разработки вакцин для профилактики COVID-19 [Letko M. и др., 2020; Du S. и др., 2020; Zost S.J. и др., 2020; Robbiani D.F. и др., 2020]. Ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 кодирует белок-предшественник (~1300 аминокислот), который затем расщепляется путем протеолиза на 2 субъединицы: S1 (~700 аминокислот) и S2 (~600 аминокислот), в состав которой входит трансмембранный (ТМ) домен (рисунок 3). Субъединицы S1 и S2 образуют гетеродимер, который, в свою очередь, олигомеризуется в тример, что приводит к образованию шипа на поверхности вириона (рисунок 4) [Cai Y. и др., 2020].

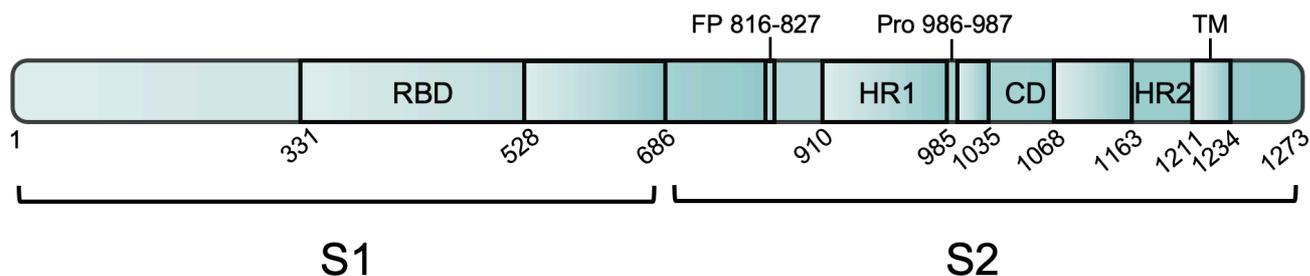


Рисунок 3 - Структура гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. Схематическое изображение S-доменов SARS-CoV-2, показывающее субъединицу S1, субъединицу S2, рецептор-связывающий домен (RBD), слитый пептид (FP), гептадный повтор 1 (HR1), соединительный домен (CD), гептадный повтор 2 (HR2) и трансмембранную область (TM).

S-тримеры SARS-CoV-2 связываются с рецептором ACE2 на поверхности клеток. При этом S претерпевает существенную структурную перестройку от формы «до слияния» к форме «после слияния». В форме «до слияния» рецептор-связывающий домен (RBD) находится на вершине широкого тримерного шипа над ядром слияния. Три копии RBD окружены тремя копиями N-концевого домена (NTD), которые демонстрируют некоторую подвижность. В закрытой конформации «до слияния» все три копии RBD лежат плоско на поверхности шипа, в значительной степени перекрывая сайт связывания рецептора, тогда как в открытой конформации «до слияния» один или два RBD приподнимаются, обнажая сайт связывания рецептора. Поверхность тримера сильно гликозилирована с 22 потенциальными N-связанными сайтами гликозилирования на мономер. После связывания с рецептором структурный переход формы «до слияния» в форму «после слияния» объединяет слитый пептид и трансмембранный домен на одном конце длинной игольчатой структуры, центрированной вокруг пучка из трех спиралей. Пять N-сцепленных гликанов располагаются по длине S «после слияния». В целом примерно 97% тримеров S находятся в форме «до слияния» и 3% — в форме «после слияния» (рисунок 4) [Ке Z. и др., 2020].

Конформации гликопротеина S

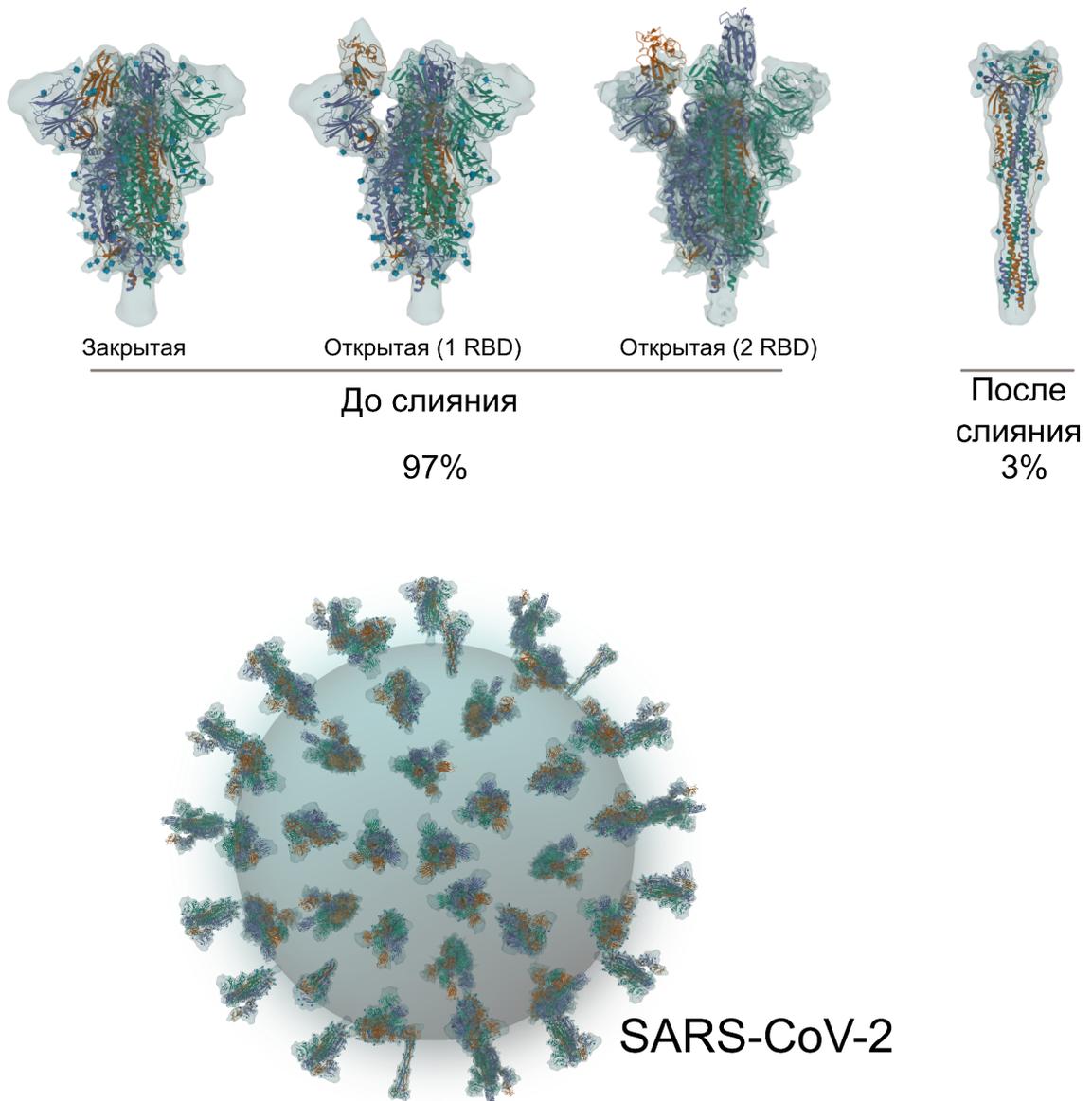


Рисунок 4 - Трехмерная структура вируса SARS-CoV-2 с различными конформациями S гликопротеина [изображения структуры гликопротеина построено с помощью rcsb.org].

Субъединица S1 состоит в основном из N-концевого домена (NTD) и рецептор-связывающего домена (RBD) (рисунок 3). S2 состоит из пептида слияния, гептадного повтора 1 (HR1), области центральной спирали, соединительного домена (CD), гептадного повтора 2 (HR2) и трансмембранной области (рисунок 3А) [Sutton G. и др., 2020]. Во время инфекции RBD SARS-CoV-2 связывается с ACE2 на поверхности клеток-мишеней, прежде чем проникнуть в клетку [Zhu X. и др.,

2021; Xu C. и др., 2021; Yan R. и др., 2020; Lan J. и др., 2020; Shang J. и др., 2020]. Было показано, что сайт RBD играет важную роль в нейтрализации SARS-CoV-2 [Gu J. и др., 2020; Lv Z. и др., 2020; Zhou D. и др., 2020; Dejnirattisai W. и др., 2021; Huo J., Le Bas A. и др., 2020; Huo J., Zhao Y. и др., 2020; Starr T.N. и др., 2021; Barnes C.O. и др., 2020; Sun D. и др., 2021, Yang Z. и др., 2021; Banach B.B. и др., 2021; Ahmad J. и др., 2021; Errico J.M. и др., 2021; Kramer K. J. и др., 2021; Cerutti G. и др., 2021]. Предыдущие исследования SARS-CoV-2 показали, что две замены пролина в остатках 986 и 987 стабилизируют S в его закрытой форме («до слияния»), что вызывает сильный иммунный ответ [Walls A.C. и др., 2020; Wrapp D. и др., 2020]. Гликопротеин S, стабилизированный такой двухпролиновой заменой, использовался при разработке мРНК-вакцин компаний Moderna и Pfizer/BioNTech [Corbett K.S. и др., 2020; Polack F.P. и др., 2020].

1.4.2 Оболочечный белок E

Оболочечный белок E является одним из основных компонентов мембраны вируса SARS-CoV-2 и представляет собой небольшой белок массой 8,5 кДа, состоящий из 75 аминокислотных остатков. В коронавирусах белок E представляет собой катионный селективный виropорин, образующий канал через ERGIC. В случае SARS-CoV-2 белок E опосредует почкование и высвобождение вирусов [Mandala V.S. и др., 2020]. Это позволяет использовать белок E в качестве целевого антигена при разработке противовирусных препаратов, а также кандидатных вакцин для профилактики SARS-CoV-2.

1.4.3 Нуклеокапсидный белок N

Основным белковым компонентом SARS-CoV-2 внутри вириона является нуклеокапсидный белок N. Белок N отвечает за связывание геномной РНК внутри вириона и упаковку ее в рибонуклеопротеидный комплекс (RNP-комплекс). N-

белки выполняют множество функций помимо упаковки: было обнаружено, что N-белок SARS-CoV-2 препятствует РНК-интерференции [Mu J. и др., 2020].

Белок N состоит из трех изначально неупорядоченных областей: N-плеча, центральной линкерной области (LKR) и С-хвоста, а также двух структурных доменов: NTD и CTD [Peng Y. и др., 2020]. Было показано, что NTD служит РНК-связывающим доменом, а CTD функционирует как домен димеризации [Chang C.K. и др., 2009].

N-белки образуют RNP-комплексы с вирусным геномом. Считается, что эти RNP связаны с соседними по типу «бусинок на нитке» [Klein S. и др., 2020]. Остается неясным, как отдельные N белки и РНК организованы внутри RNP [Yao H. и др., 2020]. Сопоставление ранее определенных структур доменов NTD и CTD от SARS-CoV, по-видимому, указывает на декамер из N белков, образующих базовую единицу RNP, с электростатическим потенциалом на поверхности декамера, предполагая, что РНК обвивается вокруг димеров белка N [Yao H. и др., 2020]. Этот механизм упаковки генома «бусинки на нитке» поддерживает высокую стерическую гибкость RNP, необходимую для того, чтобы позволить большому геному эффективно упаковываться в почкующиеся вирионы [Klein S. и др., 2020].

1.4.4 Основная протеаза MPro и папаин-подобная протеаза PLPro

Одной из мишеней препаратов для терапии COVID-19 является неструктурный белок 5 (Nsp5), основная протеаза (MPro). MPro — это 3С-подобная протеаза, отвечающая за процессинг 11 MPro-специфических сайтов на двух полипротеинах Pp1a и Pp1ab вируса SARS-CoV-2 в 16 неструктурных белков (Nsp1-16) [Ullrich S., Nitsche C., 2020; Lee J. и др., 2020]. Недавно была определена кристаллическая структура MPro [Zhang L. и др., 2020; Jin Z. и др., 2020]. MPro состоит из трех доменов: химотрипсиноподобного домена I и пиконавирус-3С-протеазоподобного домена II, а также домена III, состоящего из 5 антипараллельных α -спиралей, регулирующих димеризацию [Zhang L. и др., 2020]. MPro нацеливается на последовательность узнавания Leu-Gln ↓ (Ser, Ala, Gly) (где

↓ обозначает сайт расщепления) [Zhang L. и др., 2020]. Поскольку ни одна известная протеаза человека не обладает такой же специфичностью, как MPro, MPro представляется хорошей мишенью для разработки терапевтических средств [Zhang L. и др., 2020; Jin Z. и др., 2020].

Вторая, папаиноподобная протеаза (PLPro), кодируемая в Nsp3, является протеазой, ответственной за расщепление оставшихся трех полипротеинов [Klemm T. и др., 2020]. Изучение кристаллической структуры PLPro [Osipiuk J. и др., 2021; Shin D. и др., 2020] показало, что PLPro содержит два домена: небольшой N-концевой убиквитин-подобный домен и каталитический домен с архитектурой «большой палец-ладонь-пальцы». Каталитически активный сайт расположен между доменами «большого пальца» и «ладони» и содержит каноническую каталитическую триаду цистеиновых протеаз, распознающую последовательность Leu-X-Gly-Gly ↓ [Ullrich S., Nitsche C., 2020]. PLPro может распознавать C-концевую последовательность убиквитина. Это делает разработку ингибитора PLPro более сложной задачей, поскольку необходимо соблюдать осторожность, чтобы ингибиторы не мешали работе деубиквитиназ хозяина [Ullrich S., Nitsche C., 2020].

1.4.5 Другие неструктурные белки

Известно, что структуры нескольких других неструктурных белков SARS-CoV-2 являются потенциальными мишенями для терапевтических средств [Jahirul Islam M. и др., 2023]. Nsp1 действует как ингибитор трансляционной системы клетки-хозяина, связывая входной канал мРНК рибосомных комплексов. На криоЭМ-структуре белка Nsp1 показано, что его C-конец образует две α -спирали, связывающиеся во входном канале 40S-субъединицы [Schubert K. и др., 2020; Thoms M. и др., 2020; Yuan S. и др., 2020]. Спираль 1 (остатки 153–160) взаимодействует со спиралью 18 посредством гидрофобных взаимодействий, тогда как спираль 2 (остатки 166–178) взаимодействует с фосфатным остовом спирали 18 посредством консервативных остатков аргинина R171 и R175, что позволяет

Nsp1 ингибировать трансляцию мРНК клетки-хозяина [Schubert K. и др., 2020; Thoms M. и др., 2020; Yuan S. и др., 2020].

Наряду с PLPro, Nsp3 содержит макромолекулу, ответственный за удаление АДФ-рибозы из сайтов АДФ-рибозилирования во время инфекции, потенциально играющий важную роль в нарушении АДФ-рибозилирования хозяина [Lin M.H. и др., 2020; Michalska K. и др., 2020; Frick D.N. и др., 2020]. Поскольку АДФ-рибозилирование связано с врожденным иммунным ответом, этот макромолекула может стать хорошей мишенью для разработки лекарственных средств. Этот макромолекула имеет структуру, похожую на бейсбольную перчатку, с карманом для связывания АДФ-рибозы [Lin M.H. и др., 2020; Michalska K. и др., 2020; Frick D.N. и др., 2020]. Структурное сравнение сайта связывания, кристаллизованного с различными субстратами, свидетельствует о высокой структурной пластичности сайта связывания, что дает возможность для рационального нацеливания на низкомолекулярные ингибиторы [Ni X. и др., 2021]. Было показано, что этот карман связывает GS-441524, метаболит ремдесивира, подтверждая гипотезу о том, что макромолекула представляет собой хорошую мишень для создания лекарств [Ni X. и др., 2021].

Nsp12 необходим для синтеза вирусной РНК и является основной мишенью для терапевтических аналогов РНК, таких как ремдесивир [Peng Q. и др., 2021; Wang Q. и др., 2020]. Сам по себе Nsp12 обладает низкой полимеразной активностью. При добавлении кофакторов Nsp7 и Nsp8 и образовании комплекса holo-RdRp:RNA полимеразная активность Nsp12 значительно повышается [Gao Y. и др., 2020]. Комплекс holo-RdRp:RNA состоит из одного гетеродимера Nsp7/Nsp8, связанного с Nsp12, а также включает Nsp8 в отдельном сайте связывания Nsp12. Nsp8 содержит спиральные N-концевые удлинения, которые взаимодействуют с РНК, когда она выходит из комплекса, потенциально способствуя полимеразной активности путем стабилизации выходящей РНК [Wang Q. и др., 2020].

Nsp13 представляет собой хеликазу, которая взаимодействует с комплексом holo-RdRp:RNA, образуя комплекс Nsp13-RTC, необходимый для репликации и транскрипции [Chen J. и др., 2020; Yan L. и др., 2020; Yan L. и др. 2021; Malone B.

и др., 2021]. Nsp13 содержит два канонических домена RecA-АТФазы, а также три домена, уникальных для хеликаз нидовирусов. Комплекс Nsp13-RTC может существовать в двух изоформах, либо с одним Nsp13, либо с двумя связанными белками Nsp13 [Chen J. и др., 2020; Yan L. и др., 2020; Yan L. и др. 2021; Malone B. и др., 2021]. Общая архитектура комплекса Nsp13-RTC помещает РНК-связывающий канал Nsp13 непосредственно на путь цепи РНК. Комплекс *holo-RdRp* перемещается в направлении 3'-5', в то время как геликаза Nsp13 расположена так, чтобы перемещаться по цепи РНК в направлении 5'-3', противоположном *RdRp*. Считается, что это обеспечивает возврат вдоль РНК и играет роль в поддержании точности транскрипции-репликации [Chen J. и др., 2020; Malone B. и др., 2021].

1.4.6 Белки открытой рамки считывания (ORF)

ORF3а вируса SARS-CoV-2 представляет собой консервативный белок для различных вирусов подрода *Sarbecovirus*. ORF3а участвует в апоптозе и ингибировании аутофагии. Предполагается, что ORF3а образует ионный канал. ORF3а состоит из ТМ из трех спиралей ТМ1, ТМ2 и ТМ3, которые соединяются с цитозольным доменом (CD). В то время как большинство ионных каналов содержат центральную пору, в случае ORF3а внеклеточная область ТМ образует гидрофобное уплотнение [Kern D.M. и др., 2021]. ORF3а содержит отчетливую обращенную к мембране гидрофильную бороздку между ТМ2 и ТМ3, соединенную с верхним туннелем. Мутации в этой области изменяют ионную проницаемость, подтверждая гипотезу о том, что эти внешние бороздки участвуют в транспорте ионов [Kern D.M. и др., 2021]. Поскольку делеции ORF3а снижают титр вируса и смертность у мышей, этот белок может стать мишенью для разработки новых терапевтических средств.

1.5 Особенности иммунного ответа в отношении вируса SARS-CoV-2

Как только вирус проникает в организм, иммунная система распознает весь вирус или его поверхностные эпитопы, активируя врожденный или адаптивный иммунный ответ. Паттерн-распознающие рецепторы, присутствующие на иммунных клетках (в основном Toll-подобные рецепторы 3, 7 и 8), первыми идентифицируют РНК вируса, что приводит к активации NF-κB и высвобождению цитокинов и хемокинов. Достаточное высвобождение таких цитокинов, как интерфероны I и III типов имеет решающее значение в контроле репликации вируса и инициации вирус-индуцированного воспаления [Park A., Iwasaki A., 2020]. Инфицированные эпителиальные клетки производят значительные количества интерферонов I и III типа и цитокинов IL-6 и IL-1β, что приводит к активации гранулоцитов, дендритных клеток и макрофагов в легких, стимулируя иммунопатогенез вируса SARS-CoV-2 [Luo W. и др., 2020; Zhang F. и др., 2020]. Помимо прямой стимуляции миелоидных клеток инфицированными альвеолярными эпителиальными клетками, недавно было показано, что SARS-CoV-2 стимулирует моноциты периферической крови, вызывая воспалительные реакции путем высвобождения TNF-α, IL-1β и IL-6 [Codo A.C. и др., 2020; Boumaza A.L. и др., 2020], в то время как репликация вируса в этих клетках отсутствует.

Резидентные лимфоидные клетки легких, такие как естественные киллеры (NK), играют важную роль в ограничении вирусной инфекции за счет опосредованной интерфероном I типа (IFNα/β) продукции интерферона-γ (в дополнение к IL-12 и IL-18), которая приводит к стимуляции Т-хелперов [Lee J.S. и др., 2020; Victorino F. и др., 2015]. В ряде исследований было продемонстрировано снижение популяции NK-клеток в периферической крови пациентов с COVID-19 [Zheng M. и др., 2020; Wang W. и др., 2020]. Кроме того, за счет повышенной экспрессии ингибирующих молекул LAG3, TIM3 и NKG2A в NK-клетках периферической крови пациентов с COVID-19, последние обладали меньшей цитотоксической активностью и в меньших количествах продуцировали хемокины/цитокины [Wilk A.J. и др., 2020].

Адаптивный иммунитет играет важную роль в иммунопатогенезе вируса SARS-CoV-2. У пациентов с COVID-19 наблюдается лимфопения, и ее степень коррелирует с тяжестью заболевания [Vabret N. и др., 2020]. Активированные вирусом SARS-CoV-2 CD4 и CD8 Т-клетки были обнаружены в бронхоальвеолярных лаважах и в периферической крови пациентов с COVID-19 [Liao M. и др., 2020; Weiskopf D. и др., 2020; Ni L. и др., 2020]. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 популяция регуляторных Т-клеток и $\gamma\delta$ -Т-клеток снижена [Weiskopf D. и др., 2020; Chen G. и др., 2020; Lei L. и др., 2020], что свидетельствует об отсутствии достаточной иммунной регуляции и защиты от вируса. Точно так же периферические CD8⁺ Т-клетки у пациентов с тяжелым течением COVID-19 имеют сниженную цитотоксичность, более низкую экспрессию CD107a и гранзима В [Zheng M. и др., 2020]. Следует отметить, что фенотип и функции CD8⁺ Т-клеток в тканях легких отличаются от тех, которые наблюдаются в периферической крови, поскольку Т-клетки бронхоальвеолярного лаважа экспрессируют более высокие уровни цитотоксических генов [Liao M. и др., 2020]. Помимо Т-клеток, В-клетки важны для продукции нейтрализующих антител и защиты от вирусной инфекции. Действительно, специфичные к SARS-CoV-2 антитела, а также плазматические клетки и В-клетки памяти были обнаружены у большинства пациентов с COVID-19, при этом не установлено корреляции титров антител с тяжестью заболевания [Wolfel R. и др., 2020; Ju В. и др., 2020]. При COVID-19 наблюдается увеличение вирус-специфических IgM в острой фазе с последующим увеличением вирус-специфических IgG на более поздних стадиях заболевания. Повышение уровня вирус-специфических антител IgG или IgM к нуклеопротеину (NP) или рецептор-связывающему домену (RBD) вируса SARS-CoV-2 было отмечено у большинства пациентов через 10 дней или позже после появления симптомов [Qin С. и др., 2020]. В другом исследовании специфические для вируса SARS-CoV-2 IgG и IgM достигли пиковых уровней через 17-19 дней и 20-22 дня после появления симптомов соответственно [Long Q.X. и др., 2020]. Показано, что плазма крови от переболевших людей (реконвалесцентов), содержащая вирус-специфические антитела, эффективно применяется для лечения

тяжелого течения COVID-19. При такой терапии улучшается функция легких, оксигенация, уменьшается воспаление и вирусная нагрузка [Casadevall A., Pirofski L.A., 2020]. Было показано, что уровень вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированных или переболевших людей коррелирует с уровнем защиты от COVID-19. Авторы проанализировали данные протективной эффективности клинических исследований фазы 3 семи разных вакцин (mRNA-1273, NVX-CoV2373, BNT162b2, Гам-КОВИД-Вак, ChAdOx1 nCoV-19, Ad26.COV2.S и CoronaVac) и исследований протективной эффективности вируснейтрализующих антител у переболевших людей. Была выявлена сильная нелинейная связь между титром ВНА и защитой от COVID-19 (коэффициент Спирмена $r=0,905$; $p=0,0046$). Также было показано, что титр ВНА у переболевших ниже, чем у вакцинированных mRNA-1273, NVX-CoV2373, BNT162b2 или Гам-КОВИД-Вак [Khoury D.S. и др., 2021]. Формирование мукозального иммунного ответа также имеет важное значение для предотвращения COVID-19. Антитела класса IgA были обнаружены на слизистых оболочках уже на 4 день после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 [Russell M.W. и др., 2022].

1.6 Генетические особенности разных вариантов вируса SARS-CoV-2

На сегодняшний день обнаружено большое количество мутаций в геноме SARS-CoV-2, что позволило выделить множество новых вариантов вируса. Мутации могут влиять на приспособленность и трансмиссивность вируса [Gupta D. и др., 2021]. Изучение вариантов вируса основано на секвенировании вирусного генома. В общей сложности 15 315 645 последовательностей были секвенированы и депонированы в базе данных Глобальной инициативы по обмену всеми данными о гриппе (GISAID, <https://www.gisaid.org/>). В феврале 2020 года была обнаружена мутация, приводящая к замене D614G в гликопротеине S, которая стала доминирующей во всем мире. Исследования показали, что эта замена усиливает связывание S-белка вируса с рецептором ACE2, тем самым повышая инфекционную активность. С момента появления D614G в мире было описано

несколько основных вариантов SARS-CoV-2 с новыми эпидемиологическими и клиническими особенностями. ВОЗ была предложена система номенклатуры для основных вариантов, вызывающих обеспокоенность (ВВО), вариантов, вызывающих интерес (ВВИ) и вариантов, находящихся под контролем (ВНК) — в соответствии с греческим алфавитом. На сегодняшний день варианты Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон сублиний ВА.1-ВА.5 относят к ранее циркулирующим ВВО. Вариант Дельта был доминирующим во всем мире до конца 2021 года, после чего вариант Омикрон полностью вытеснил его. Количество несинонимичных замен нуклеотидов в последовательностях вариантов, вызывавших озабоченность представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Количество несинонимичных замен нуклеотидов в последовательностях различных вариантов вируса SARS-CoV-2 [NextStrain, 2024].

Вариант по номенклатуре ВОЗ	Номенклатура PANGO	Количество несинонимичных замен нуклеотидов в последовательностях		
		Всего	S белок	RBD
Альфа	V.1.1.7	24	10	1
Бета	V.1.351	20	10	3
Гамма	P.1	24	12	3
Дельта	V.1.617.2	23	10	2
Омикрон (21K)	V.1.1.529 ВА.1	62	36	15
Омикрон (21L)	V.1.1.529 ВА.2	61	31	16
Омикрон (22A)	V.1.1.529 ВА.4	69	34	17
Омикрон (22B)	V.1.1.529 ВА.5	64	34	17
Омикрон (22C)	V.1.1.529 ВА.2.12.1	64	33	17
Омикрон (22D)	V.1.1.529 ВА.2.75	74	38	18

На рисунке 5 отмечены сайты аминокислотных замен в белках S различных вариантов SARS-CoV-2.

		B.1.1.7	B.1.351	P.1	B.1.617.2	B.1.1.529 BA.1	B.1.1.529 BA.2	B.1.1.529 BA.4	B.1.1.529 BA.5	B.1.1.529 BA.2.12.1	B.1.1.529 BA.2.75	
S1	L18F											
	T19I											
	T19R											
	T20N											
	d24-26											
	A27S											
	A67V											
	d69-70											
	D80A											
	T95I											
	D138Y											
	G142D											
	d142-144											
	d144											
	Y145D											
	K147E											
	W152R											
	d156-157											
	F157L											
	R158G											
	R190S											
	I210V											
	d211											
	L212I											
	V213G											
	D215G											
	d241-243											
	G257S											
	RBD	G339D										
		G339H										
		S371F										
		S371L										
		S373P										
S375F												
T376A												
D405N												
R408S												
K417N												
K417T												
N440K												
G446S												
L452R												
L452Q												
N460K												
S477N												
T478K												
E484K												
E484A												
F486V												
Q493R												
R493Q												
G496S												
Q498R												
N501Y												
Y505H												
T547K												
A570D												
D614G												
H655Y												
N679K												
P681R												
P681H												
S2	A701V											
	S704L											
	T716I											
	N764K											
	D796Y											
	N856K											
	D950N											
	Q954H											
	N969K											
	L981F											
	S982A											
T1027I												
D1118H												
V1176F												

Рисунок 5 - Сайты аминокислотных замен в белках S различных вариантов SARS-CoV-2 (отмечены бирюзовым цветом) [NextStrain, 2024].

Альфа

Первые геномы, относящиеся к линии В.1.1.7, были секвенированы на юге Англии в сентябре 2020 года. Линия В.1.1.7 характеризуется наличием 24 нуклеотидных мутаций в геноме, семь из которых - аминокислотные замены в S белке (N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A и D1118H) и три – делеции в NTD (Δ H69–V70 и Δ Y144) [Rambaut A., Loman N., 2020]. Эта линия была связана с быстро растущей долей зарегистрированных случаев SARS-CoV-2 [ECDC. Risk Related to Spread of New SARSCoV-2 Variants of Concern in the EU/EEA, 2020; Volz E., Mishra S., 2021]. Имеются также данные о том, что инфекция, вызванная этой линией, приводит к более высокой вирусной нагрузке [Kidd M. и др., 2021]. Данные характеристики связывают с заменой N501Y, которая увеличивает сродство S белка вируса с клеточным рецептором ACE2. Совместное появление Δ Y144 и E484K потенциально снижает нейтрализующую активность поликлональных антител, поскольку петля N3, в которой находится делеция Δ Y144, является одной из наиболее иммуногенных областей белка S, а аминокислотные замены в положении 484 снижают нейтрализующую активность антител, нацеленных на RBD.

Бета

Вскоре последовали сообщения о другой линии, обладающей заменой N501Y - линии В.1.351, циркулирующей в Южной Африке, частота встречаемости которой быстро увеличивалась с декабря 2020 года [Tegally H. и др., 2020]. В дополнение к N501Y линия В.1.351 определяется наличием пяти дополнительных аминокислотных замен в последовательности S белка (D80A, D215G, K417N, E484K и A701V) и делецией в NTD (Δ 242–244). Совместное появление K417N, E484K и замен в NTD приводит к тому, что линия В.1.351 может преодолевать ответ поликлональных антител за счет снижения нейтрализующей активности RBD-специфических антител и NTD-специфических антител. Литературные данные показали, что почти половина исследованных образцов плазмы реконвалесцентов не имела детектируемой нейтрализующей активности в отношении варианта В.1.351 [Wibmer C.K. и др., 2021]. Другие эксперименты с

псевдотипированными вирусами показали, что вариант В.1.351 также был устойчив к нейтрализующей активности некоторых mAb [Li Q. и др., 2021].

Гамма

Линия P.1, сублиния В.1.1.28, была впервые обнаружена в Бразилии [Faria N.R. и др., 2021] и у путешественников, которые вернулись из Бразилии в Японию [Navesa F. и др., 2021]. Линия P.1 характеризуется наличием следующих аминокислотных замен в гликопротеине S: L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, H655Y и T1027I69. В дополнение к заменам в положениях 417, 484 и 501, обсуждавшихся выше, линия P.1 имеет кластер замен, близких к описанным антигенным областям NTD, включая L18F, который, как известно, снижает нейтрализующую активность некоторых антител [McCallum M. и др., 2021]. Линия P.1 также была связана со случаем повторного заражения в Манаусе, Бразилия [Navesa F. и др., 2021]. Анализы, объединяющие геномные данные и данные о смертности, показывают, что P.1 может быть в 1,7–2,4 раза более трансмиссивным, и что предыдущее заражение другими вариантами SARS-CoV-2 обеспечивает лишь 54–79% защиты от инфекции P.1 [Jian S. и др., 2021].

Дельта

Вариант В.1.617.2 был впервые идентифицирован в Индии в конце 2020 года. Он имеет мутации в гене, кодирующем S белок, в том числе T478K, P681R и L452R [Starr T.N. и др., 2021], которые влияют на трансмиссивность вируса, а также на возможность его нейтрализации антителами к ранее циркулировавшим вариантам вируса COVID-19. Считается, что это один из наиболее высоко-трансмиссивных известных респираторных вирусов [European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of 24 May 2021.].

Омикрон

26 ноября 2021 г. ВОЗ объявила, что новый вариант (ранее названный PANGO В.1.1.529) был обозначен как ВВО и назван греческой буквой Омикрон.

Этот вариант был впервые обнаружен в Южной Африке 11 ноября 2021 года, после чего Омикрон распространился во многих странах и регионах за пределами Африки. Многие страны и регионы ввели ограничения на поездки в Южную Африку и соседние страны.

Анализ геномных последовательностей варианта Омикрон выявил большое количество мутаций, в том числе несколько в S белке, которые, как было доказано, связаны с трансмиссивностью, тяжестью заболевания и ускользанием от иммунитета. На начало 2023 года известно 6 основных сублиний варианта Омикрон: BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, BA.2.12.1 и BA.2.75. В целом, в варианте Омикрон было идентифицировано более 60 замен/делеций/вставок, в S белке более 30. Общими мутациями гликопротеина S для всех основных сублиний варианта Омикрон являются: G339D, S371F/L, S373P, S375F, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H и N969K. Примечательно, что все варианты, вызывавшие обеспокоенность содержат аминокислотную замену D614G в S белке. Исследования показали, что D614G связана с более высокой вирусной нагрузкой верхних дыхательных путей и более молодым возрастом пациентов [Korber В. и др., 2020; Plante J.A. и др., 2021; Volz E. и др., 2021; Yang T.J. и др., 2021]. Вариант Омикрон также имеет мутацию N501Y, такую же как в вариантах Альфа, Бета и Гамма. Считается, что эта мутация усиливает связывание между S белком и ACE2 и вызывает более высокую трансмиссивность [Leung K. и др., 2021]. Делеция H69/V70 в сублиниях BA.1, BA.4 и BA.5 дополнительно увеличивает трансмиссивность [Leung K. и др., 2021]. Кроме того, вариант Омикрон также имеет мутации N679K и P681H вблизи сайта расщепления фурином, что может способствовать расщеплению S белка на S1 и S2, тем самым усиливая слияние и вирусную инфекцию. Мутация P681H также была идентифицирована в варианте Альфа (рисунок 5). Предполагается, что эта мутация повышает инфекционную активность SARS-CoV-2 [Zuckerman N.S. и др., 2021].

Таким образом, новые варианты будут продолжать появляться, и, хотя важно понимать фенотипы возникающих вариантов с точки зрения инфекционности,

трансмиссивности, вирулентности и антигенности, также важно количественно оценить фенотипические последствия конкретных мутаций, приводящих к заменам аминокислот в белках, присутствующих в вариантах, как по отдельности, так и в совокупности в сочетании с другими мутациями. По мере того, как продолжают появляться новые варианты с непредвиденными комбинациями мутаций, такая информация позволит прогнозировать фенотип вируса.

1.7 Модели COVID-19 у животных для оценки эффективности профилактических и терапевтических средств

Мыши

Основным препятствием для заражения клеток мышей (*Mus musculus*) вирусом SARS-CoV-2 является отсутствие соответствующих рецепторов для инициации вирусной инфекции. SARS-CoV-2 — как и коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) — использует hACE2 как рецептор для связывания и проникновения в клетки, а ACE2 мыши не связывает эффективно S белок вируса [Wan Y. и др., 2020]. Для решения этой проблемы было разработано несколько подходов.

S белок вируса SARS-CoV-2 можно адаптировать для эффективного связывания с ACE2 мыши. Одной из стратегий достижения этой адаптации является последовательное пассирование SARS-CoV-2 в легочной ткани мыши *in vitro* [Gu H. и др., 2020]. В качестве альтернативы, SARS-CoV-2 может быть адаптирован для заражения клеток мыши с использованием обратной генетики для модификации рецептор-связывающего домена вируса таким образом, чтобы он мог заражать клетки мыши через мышинный белок ACE2. Используя два подхода, мыши линии BALB/c стали чувствительны к инфекции, но у них развилось только легкое течение заболевания [Dinnon K.H. и др., 2020]. Недостатком таких моделей инфекции является то, что замены в S белке SARS-CoV-2, которые повышают сродство к ACE2 мыши, расположены в рецептор-связывающем домене, который является основной мишенью для нейтрализующих антител. Помимо этого,

использование модифицированного вируса SARS-CoV-2 не позволяет полноценно сравнивать данную модель инфекции с заболеванием COVID-19 у человека.

Другой подход к созданию модели COVID-19 у мышей состоит в получении трансгенных мышей, клетки которых синтезируют hACE2. В настоящее время существуют три модели инфекции у трансгенных мышей, в которых hACE2 человека экспрессируется под контролем тканеспецифического промотора (промотора Krt18 для эпителиальных клеток [McCray Jr. P.B. и др., 2007]; мыши K18-hACE2), универсального промотора (энхансер из генома цитомегаловируса, за которым следует промотор от β -актина курицы [Tseng C.T.K. и др., 2007]) или эндогенный мышинный промотор ACE2 [Bao L. и др., 2020]. Все эти мыши восприимчивы к заражению SARS-CoV-2, но различия в экспрессии hACE2 приводят к разной тяжести заболевания: от легкой до летальной [McCray Jr. P.B. и др., 2007; Tseng C.T.K. и др., 2007; Bao L. и др., 2020].

Альтернативный подход заключается в замене ACE2 мыши на hACE2. Разработана модель нелетальной формы инфекции у мышей линии C57BL/6, экспрессирующим ген hACE2. Установлено, что интраназальное введение SARS-CoV-2 таким мышам, приводило к появлению инфекции и репродукции вируса в легких и в головном мозге животных [Sun S.H. и др., 2020].

Наконец, вместо постоянной генетической модификации также можно создать мышей, восприимчивых к заражению SARS-CoV-2, путем трансдукции аденовирусом или аденоассоциированным вирусом, который несет ген hACE2 (rAd5-hACE2 или rAAV-hACE2 соответственно). Аналогичная модель с использованием рекомбинантного аденовируса, несущего ген рецептора DPP4 человека, была впервые использована при анализе эффективности препаратов для профилактики и терапии ближневосточного респираторного синдрома (возбудителем которого является коронавирус MERS-CoV) [Zhao J. и др., 2014]. В случае разработки модели COVID-19, система транзиентной экспрессии с использованием рекомбинантных вирусных векторов обеспечивает временную экспрессию рецептора hACE2 в клетках животного, что приводит к возможности интернализации и репликации вируса SARS-CoV-2 в легких мышей в течение

нескольких дней до иммунного клиренса. Преимуществом такого подхода является возможность моделирования инфекции у различных видов животных. При заражении SARS-CoV-2 у мышей, трансдуцированных rAd5-hACE2, развивалась инфекция легких с характерными для вирусной пневмонии гистопатологическими изменениями, изменениями поведения и масса тела животных [Rathnasinghe R. и др., 2020; Hassan A.O. и др., 2020]. Мыши, трансдуцированные rAAV-hACE2, восприимчивы к заражению SARS-CoV-2, однако репликация вируса в таких моделях, ниже, чем у мышей, трансдуцированных rAd5-hACE2 [Israelow B. и др., 2020]. Мыши, трансдуцированные rAd5-hACE2 или rAAV-hACE2, используются для оценки эффективности препаратов для профилактики COVID-19 [Gary E.N. и др., 2021; Hassan A.O. и др., 2021].

Ограничением этой модели, а также некоторых других моделей инфекции у трансгенных мышей, экспрессирующих hACE2, является то, что hACE2 экспрессируется эктопически, что может изменить тканевой или клеточный тропизм вируса [Hassan A.O. и др., 2020].

Также существуют модели вирусных инфекций у мышей, гуманизированных гематопоэзом человека. Мышей с тяжелым иммунодефицитом линии NOD/SCID, которым трансплантировали CD34+ гемопоэтические клетки человека, использовали для изучения различных вирусных инфекций, таких как болезнь, вызванная вирусом Эбола, и лихорадка Денге [Spengler J.R. и др., 2018; Frias-Staheli N. и др., 2014]. Однако предложенная модель имеет множество ограничений и почти не используется для исследований COVID-19.

Таким образом, было описано несколько моделей легкой и тяжелой формы COVID-19 у мышей. Все эти модели используются для оценки эффективности вакцин, препаратов моноклональных антител и противовирусных препаратов, а также для исследований патогенеза заболевания.

Сирийские хомячки

Сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*) используются в качестве моделей вирусных респираторных заболеваний, включая SARS-CoV, вирус гриппа и

аденовирус [Miao J. и др., 2019; Iwatsuki-Horimoto K. и др., 2018; Wold W.S.M. и др., 2020]. *In silico* сравнение последовательности hACE2 с последовательностью ACE2 хомячка [Wold W.S.M. и др., 2020] позволило предположить, что сирийские хомячки могут быть восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2. При экспериментальном интраназальном заражении у сирийских хомячков заболевание протекает с легкой и средней степенью тяжести с прогрессирующей потерей веса, которая начинается через 1-2 дня после заражения. У всех хомячков, которых заражали разными изолятами SARS-CoV-2, проявлялись признаки респираторного заболевания, в том числе затрудненное дыхание [Chan J.F.W. и др., 2020; Boudewijns R. и др., 2020]. Дополнительные признаки болезни включали вялость, взъерошенную шерсть и сгорбленную позу [Chan J.F.W. и др., 2020]. В связи с тем, что COVID-19 является самолимитирующим заболеванием, через две недели после заражения хомячки обычно выздоравливают. Особый интерес представляет тот факт, что заражение хомячков SARS-CoV-2 отражает некоторые демографические различия COVID-19 у людей. Так, у старых хомячков и самцов развивается более тяжелое заболевание, чем у молодых животных и самок [Osterrieder N. и др., 2020].

Хорьки

Было показано, что хорьки (*Mustela putorius furo*) являются хорошей моделью для анализа патогенности и трансмиссивности респираторных вирусов человека, включая вирус гриппа и респираторно-синцитиальный вирус [Enkirch T. и др., 2015].

После интраназального заражения вирусом SARS-CoV-2 клинические изменения у хорьков проявляются в легкой форме и могут включать вялость, выделения из носа, свистящее дыхание, скопление слизи в ротоглотке, чихание и жидкий стул [Blanco-Melo D. и др., 2020]. У хорьков, зараженных аэрозольным методом, наблюдается похожее течение заболевания, при дозе вируса в 100 раз меньше. Другие исследователи показали, что у зараженных хорьков повышается температура, но снижение массы тела было минимально или вообще отсутствовало. Гематологические параметры у таких животных изменялись

незначительно. Так, у хорьков были выявлены легкая лимфопения и незначительное увеличение числа нейтрофилов. В мазках из носа и ротоглотки выявляли жизнеспособные вирусные частицы SARS-CoV-2 [Kim Y.I. и др., 2020; Schlottau K. и др., 2020; Shi J. и др., 2020]. Как и у сирийских хомячков, репродукция вируса обнаруживается в верхних дыхательных путях на 2-й день после заражения и далее в течение двух недель. Репродукция вируса у хорьков, по видимому, ограничивается дыхательным и желудочно-кишечным трактами.

При гистологическом исследовании у хорьков, инфицированных SARS-CoV-2, на пике вирусной репродукции наблюдали признаки воспалительной реакции в альвеолярных пространствах и периваскулярные мононуклеарные инфильтраты. В верхних дыхательных путях в подслизистом слое бронхов – инфильтрацию эозинофилами [Ryan K.A. и др., 2021].

Хорьки также способны эффективно передавать вирус неинфицированным хорькам в экспериментальных условиях [Schlottau K. и др., 2020; Richard M. и др., 2020]. Показано, что возможна передача SARS-CoV-2 воздушно-капельным путем, а также что модель хорьков может быть использована для дальнейших исследований передачи и распространения вируса.

Приматы

Моделирование инфекции COVID-19 у приматов проведено у макак-резусов (*Macaca mulatta*), яванских макак (*Macaca fascicularis*) и африканских зеленых мартышках (*Chlorocebus aethiops*). После заражения SARS-CoV-2 у приматов определяли высокие уровни репродукции вируса в течение 7–14 дней (как по количеству вирусной РНК, так и по инфекционному титру вируса) как в верхних, так и в нижних дыхательных путях, морфологические признаки вирусной пневмонии и развитие легкой формы заболевания [Munster V.J. и др., 2020; Rockx B. и др.]. Также определяли индукцию врожденного, гуморального и клеточного иммунных ответов. При повторном заражении животных вирусом SARS-CoV-2 наблюдали эффективную защиту приматов, что демонстрирует образование постинфекционного защитного иммунитета в этой модели инфекции

[Chandrashekar A. и др., 2020]. У приматов, зараженных интраназально, внутрибронхиально или аэрозольно, в течение 2 дней наблюдались рентгенологические изменения, которые, как правило, приходили в норму через 11–15 дней после заражения [Munster V.J. и др., 2020; Finch C.L. и др., 2020]. Наличие вируса было обнаружено как в дыхательных путях, так и в желудочно-кишечном тракте [Munster V.J. и др., 2020]. Кроме того, у инфицированных приматов наблюдались гематологические изменения с признаками активации Т-клеток, легкой лимфопенией и нейтрофилией. Таким образом, модель на приматах хорошо подходит для изучения патогенеза заболевания, а также для изучения эффективности терапевтических и профилактических препаратов.

Другие модели

Были попытки показать возможность использования в качестве модели COVID-19 и других видов животных. Так, апробировано моделирование COVID-19 у норок (*Neovison vison*) [Oreshkova N. и др., 2020], кошек (*Felis catus*) [Shi J. и др., 2020; Halfmann P.J. и др., 2020; Bosco-Lauth A.M. и др., 2020], собак (*Canis lupus familiaris*) [Shi J. и др., 2020; Halfmann P.J. и др., 2020; Bosco-Lauth A.M. и др., 2020], свиней (*Sus scrofa domesticus*) [Halfmann P.J. и др., 2020; Bosco-Lauth A.M. и др., 2020], домашних птиц [Barr I.G. и др., 2020] и летучих мышей (*Rousettus aegyptiacus*) [Schlottaу K. и др., 2020]. Однако возможность использования вышеуказанных животных имеют ряд ограничений в связи, с чем их почти не используют.

1.8 Разработка вакцин для профилактики COVID-19

Помимо важности введения неспецифических мер профилактики распространения вируса SARS-CoV-2, наиболее важным шагом для сдерживания этой глобальной пандемии является вакцинация. Усилия исследователей во всем мире за короткий срок привели к разработке новых вакцин для профилактики COVID-19. Согласно информационной панели ВОЗ по COVID-19, по состоянию на

31 декабря 2023 года было введено более 5,47 миллиардов доз вакцин. Более 55% населения мира получили как минимум одну дозу вакцины, 28% - как минимум одну бустерную дозу вакцины (ревакцинированы) [WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard., 2024].

Опыт изучения предыдущих коронавирусных инфекций, таких как тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) и ближневосточный респираторный синдром (БВРС), показал, что для индукции защитного иммунного ответа важно формирование как гуморального, так и клеточного (цитотоксического) иммунного ответа [Mubarak A. и др., 2019; Ху Х. и др., 2004]. Одними из наиболее перспективных являются вакцины на основе рекомбинантных вирусных векторов благодаря их способности индуцировать гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также формировать протективный иммунитет после 1-2 иммунизаций [Dolzhikova I.V. и др., 2017; Ковыршина А.В. и др., 2020]. Для формирования стойкого длительного иммунного ответа целесообразно проводить двукратную вакцинацию, при этом одной из наиболее эффективных является схема гетерологичной вакцинации с использованием различных вирусных векторов [Dolzhikova I.V. и др., 2017; Ковыршина А.В. и др., 2020]. Наиболее перспективным антигеном для включения в состав вакцины является поверхностный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2. Данный белок играет ключевую роль в жизненном цикле вируса – он взаимодействует с ACE2 на поверхности клетки, что приводит к проникновению вируса в клетку. Блокирование взаимодействия белка с рецептором позволяет ограничить интернализацию вируса и его размножение.

Существуют различные платформы для создания вакцинных препаратов (рисунок 6). В целом их можно разделить на три типа: вакцины на основе цельного вируса, вакцины на основе вирусных компонентов (целевого антигена) и вакцины на основе нуклеиновых кислот, кодирующих последовательность вирусных антигенов (таблица А.1 приложения А). По данным ВОЗ, на 30 марта 2023 г. имеется множество вакцин-кандидатов на разных платформах: 183 кандидатных вакцин на стадии клинических испытаний и 199 – на стадии доклинических испытаний [WHO. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. 2023]. 50 вакцин

одобрены хотя бы одним национальным регулирующим органом для экстренного применения (таблица А.2 приложения А), 12 из них одобрены ВОЗ для экстренного применения [COVID-19 Vaccine tracker. Approved vaccines. 2024].

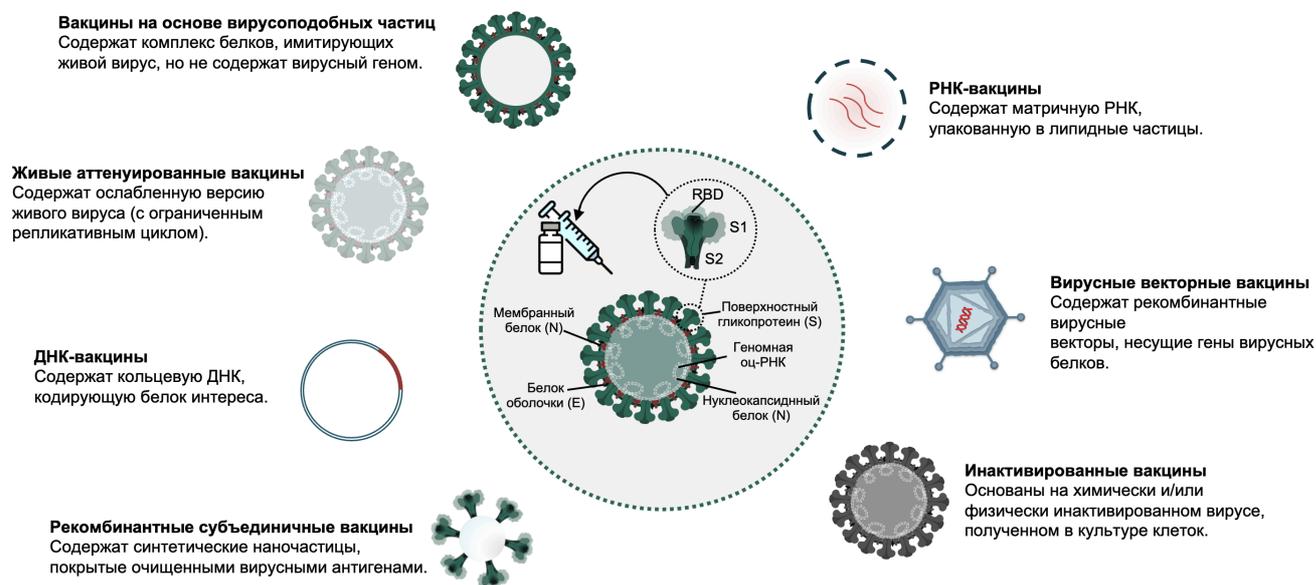


Рисунок 6 – Типы вакцины для профилактики COVID-19 [Адаптировано из: [Al-Jighefee H.T. и др., 2021]].

Наиболее широкое распространение получили вакцины, созданные на 4 технологических платформах: 1) векторные вакцины, 2) мРНК-вакцины, 3) инактивированные вакцины, 4) субъединичные вакцины. Наибольшей эффективностью в защите от COVID-19 обладают векторные и мРНК-вакцины [Графа С. и др., 2022]. В состав всех препаратов входит ключевой протективный антиген – поверхностный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2. Попадая в клетку, препарат доставляет генетическую информацию, с которой начинается наработка гликопротеина S в самих клетках (рисунок 7), что позволяет сформировать полноценный иммунный ответ к белку в нативной форме. Клетки вакцинированного сами синтезируют антиген, тем самым имитируя инфекционный процесс. В результате, к такому белку формируется как гуморальный иммунный ответ, который необходим для того, чтобы заблокировать проникновение вируса в клетку, так и клеточный цитотоксический иммунный ответ, который необходим для элиминации зараженных клеток.

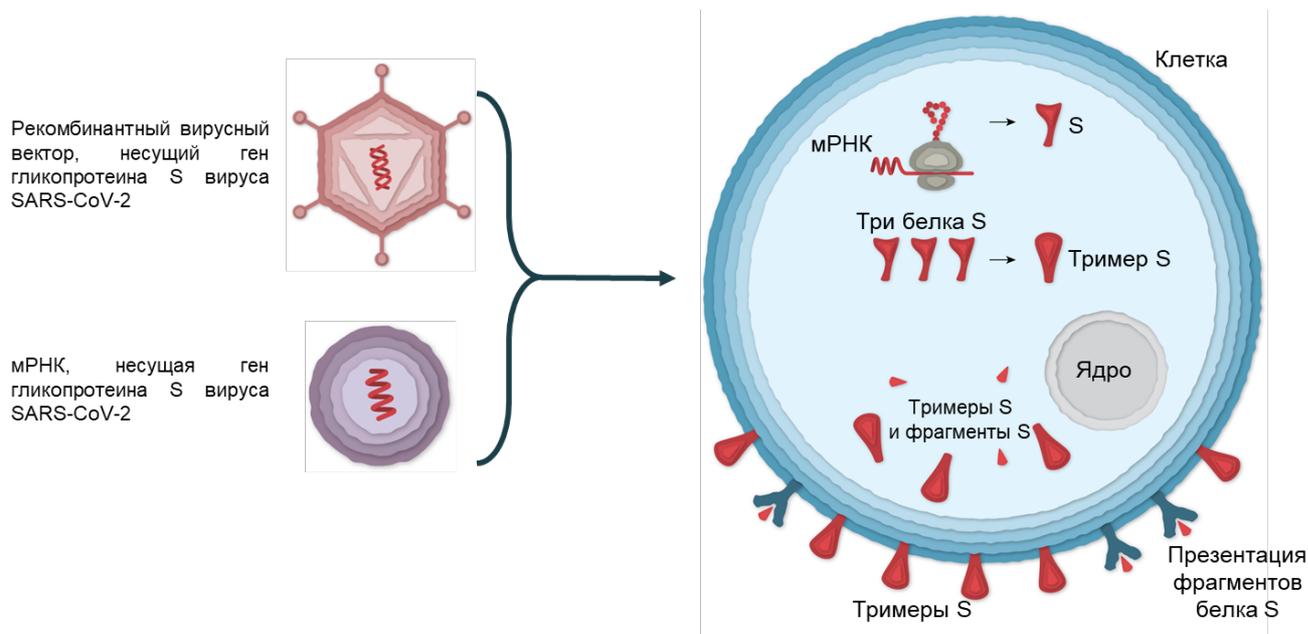


Рисунок 7 - Экспрессия гликопротеина S SARS-CoV-2 в клетках после вакцинации препаратами рекомбинантных вирусных векторов и мРНК [Адаптировано из: [NYTimes. How Gamaleya's Vaccine Works, 2021] и [NYTimes. How the Pfizer-BioNTech Vaccine Works, 2020]].

Вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) – первая в мире зарегистрированная вакцина от COVID-19. Вакцина состоит из двух компонентов: компонент 1 на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, несущего ген, кодирующий гликопротеин S вируса SARS-CoV-2, компонент 2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, несущего ген, кодирующий гликопротеин S вируса SARS-CoV-2. Компоненты вводятся с интервалом в 21 день. Результаты клинических исследований 1-2 фазы лиофилизированной и жидкой форм вакцины продемонстрировали благоприятный профиль безопасности и высокую иммуногенность (формирование как клеточного, так и гуморального иммунного ответа) [Logunov D.Y. и др., 2020]. Промежуточные результаты многоцентрового плацебо-контролируемого исследования 3 фазы показали благоприятный уровень безопасности и высокий уровень эффективности в отношении циркулирующих в 2020 г. вариантов вируса. Эффективность вакцины составила около 92% [Logunov D.Y. и др., 2021]. Были проведены сравнительные исследования вируснейтрализующей активности сывороток, полученных от

вакцинированных добровольцев в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 [Gushchin V.A. и др., 2021; Lara D. и др., 2022; Dolzhikova I.V. и др., 2021]. Не наблюдалось снижение вируснейтрализующей активности антител в отношении варианта Альфа (B.1.1.7). Показано снижение вируснейтрализующей активности антител в 3,1 раза в отношении варианта Бета (B.1.351), в 2,8 раза в отношении варианта Гамма (B.1.1.28 P.1) и в 2,5 раза в отношении варианта Дельта (B.1.617.2) в сравнении с исходным вариантом вируса SARS-CoV-2 (Ухань) [Gushchin V.A. и др., 2021]. В отношении варианта Омикрон (B.1.1.529) было показано снижение в 8,1-11,76 раз [Lara D. и др., 2022; Dolzhikova I.V. и др., 2021].

Вакцина Comirnaty/BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) – вакцина на основе модифицированной мРНК, инкапсулированной в липидные наночастицы. Результаты многонационального плацебо-контролируемого клинического исследования эффективности показали, что лица в возрасте 16 лет и старше, получавшие две дозы кандидатной вакцины BNT162b2 с интервалом в 21 день, показали 95% защиту от COVID-19 с профилем безопасности, аналогичным другим вакцинам [Polack F.P. и др., 2020]. Основываясь на результатах этого исследования эффективности вакцины, 11 декабря 2020 года Управление по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) выпустило Разрешение на экстренное применение (EUA), позволяющее использование вакцины BNT162b2 для предотвращения COVID-19. В связи со снижением эффективности этой вакцины в отношении варианта Омикрона, были разработаны и одобрены два новых адаптированных варианта вакцины - Comirnaty Bivalent Original/Omicron BA.1 и Comirnaty Bivalent Original/Omicron BA.4/BA.5 – представляющие собой бивалентные вакцины на основе антигена исходного варианта вируса (Ухань) и антигена варианта Омикрон соответствующих сублиний.

Вакцина Spikevax/mRNA-1273 (Moderna) – аналогичная мРНК-вакцина, основанная на модифицированной мРНК. Результаты многоцентрового рандомизированного слепого плацебо-контролируемого исследования фазы 3 показали, что лица, получившие 2 дозы вакцины mRNA-1273 с интервалом в 28 дней показали 94,1 % эффективности в предотвращении заболевания COVID-19, с

хорошим профилем безопасности, включающим лишь незначительные местные и системные реакции [Baden L.R. и др., 2021]. Основываясь на результатах этого испытания эффективности вакцины, 18 декабря 2020 года FDA выпустило EUA, позволяющее использование вакцины mRNA-1273 для предотвращения COVID-19. Аналогично вакцине компаний BioNTech/Pfizer, в связи со снижением эффективности вакцины в отношении варианта Омикрона, были разработаны и одобрены два новых адаптированных варианта вакцины - Spikevax Bivalent Original/Omicron BA.1 и Spikevax Bivalent Original/Omicron BA.4/BA.5 – представляющие собой бивалентные вакцины на основе антигенов исходного варианта вируса (Ухань) и варианта Омикрон соответствующих сублиний.

Вакцина Ad26.COV2.S (Johnson & Johnson/Janssen) – векторная вакцина на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа. Результаты международного многоцентрового рандомизированного плацебо-контролируемого клинического исследования 3 фазы показало, что одна доза вакцины Ad26.COV2.S обеспечивает 73,1% эффективности в предотвращении COVID-19 у взрослых вакцинированных добровольцев [Sadoff J. и др., 2021].

Вакцина ChAdOx1-nCoV-19 (Oxford/AstraZeneca) – векторная вакцина на основе рекомбинантного аденовируса шимпанзе. Промежуточный анализ многоцентрового рандомизированного клинического исследования продемонстрировал приемлемый профиль безопасности и клиническую эффективность 70,4% против симптоматического COVID-19 после двух доз и эффективность 64% от COVID-19 после хотя бы одной стандартной дозы [Voysey M. и др., 2021]. Вакцина ChAdOx1-nCoV-19 получила разрешение на экстренное использование для профилактики COVID-19 во многих странах мира.

Вакцина NVX-CoV2373 (Novavax) – вакцина на основе гликопротеина S с адьювантом Matrix-M1. Предварительные результаты рандомизированного слепого плацебо-контролируемого исследования фазы 2 в Южной Африке по оценке эффективности и безопасности NVX-CoV2373 показали, что вакцина эффективна для профилактики COVID-19 [Shinde V. и др., 2021]. Это исследование было проведено, когда в стране наблюдалась вторая волна заболевания, вызванного

вариантом Бета (B.1.351). При введении однократной дозы NVX-CoV2373 была продемонстрирована 92,6% эффективность вакцины против актуальных на момент исследования вариантов в клинических исследованиях в США и Мексике с участием более 29 000 участников [Dunkle L.M. и др., 2022].

1.9 Заключение

В связи с высокой скоростью распространения вируса и высокой летальностью, в конце января 2020 года начавшаяся вспышка COVID-19 была объявлена чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения, имеющую международное значение, что значительно ускорило разработку профилактических и терапевтических средств против COVID-19. 11 марта 2020 года была объявлена пандемия COVID-19. В том же году в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России была начата работа по разработке вакцины для профилактики COVID-19. На сегодняшний день по всему миру зарегистрировано большое количество препаратов для профилактики COVID-19. Повсеместное распространение возбудителя, хронизация инфекции у иммунокомпromетированных лиц и формирование иммунной прослойки (реконвалесценты и вакцинированные) могли способствовать появлению новых вариантов вируса SARS-CoV-2, способных уходить от иммунного ответа. В различных исследованиях показано снижение эпидемиологической эффективности зарегистрированных вакцин в отношении новых вариантов вируса SARS-CoV-2. Одной из ключевых задач сегодня является постоянный мониторинг появляющихся вариантов и исследование эффективности существующих вакцин в отношении новых вариантов вируса SARS-CoV-2. Исследование эпидемиологической эффективности проводятся в ходе длительных клинических исследований или в ходе ретроспективного анализа. Для своевременного принятия решения о смене антигенного состава существующих вакцинных препаратов, необходимо разрабатывать подходы для оценки протективной эффективности вакцин в условиях лаборатории в короткие сроки.

Настоящая работа посвящена оценке эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 по вируснейтрализующей активности сывороток вакцинированных добровольцев и на модели инфекции у животных.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: наборы автоматических пипеток переменного объема фирм Thermo Scientific (Россия), Eppendorf, (Германия) и Sartorius (Германия); аквадистиллятор (GFL, Германия); система очистки воды Milli-Q® Type 1 (Merck, Германия); боксы биологической безопасности 3620924 (Labconco, США), БМБ-II-«Ламинар-С» (ЗАО "Ламинарные системы", Россия); амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США); ПЦР-бокс (ДНК-технология, Россия); термостат твердотельный "Гном" (ДНК-Технологи, Россия); спектрофотометр NanoDrop 2000 (Thermo, США); весы лабораторные Discovery DV215CD (Ohaus, США); мешалка магнитная MR Hei-End (Heidolph, Германия), микроскопы СКХ41 (Olympus, Япония), NIB620 (Nexscore, Китай) и Primo Vert (Carl Zeiss, Германия); pH-метр Professional Meter PP-15 (Sartorius, Германия); система для содержания лабораторных животных IsoCage N (Techniplast, Италия); гомогенизатор FastPrep-24 (MP Biomedicals, США); счетчик клеток автоматический TC20 (Bio Rad Laboratories Inc., США); автоклав 2540 ЕКА (Tuttnauer, Израиль); центрифуги 5417R и 5810R (Eppendorf, Германия); инкубаторы Galaxy 170 R (New Brunswick, Германия) и CellXpert 170i (Eppendorf, Германия); анализатор крови Smart V5 Vet ET-00156 (Corway, Китай), морозильники Premium U410-86 (New Brunswick, Германия), холодильники Medicoool MPR214-F (Sanyo, Япония).

2.1.2 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 В.1.1.1 hCoV-19/Russia/Moscow_PMVL-1/2020;
- Альфа В.1.1.7 hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_20432/2020;
- Бета В.1.351 hCoV-19/Russia/SPE-RII-27029S/2021;
- Гамма В.1.1.28/P.1 hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_10915/2021;
- Дельта В.1.617.2 hCoV-19/Russia/SPE-RII-32758S-PMVL-CS-SPE32758/2021;
- Омикрон ВА.1 В.1.1.529 hCoV-19/Russia/MOW-Moscow_PMVL-O16/2021;
- Омикрон ВА.2 В.1.1.529 hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-ON402/2022;
- Омикрон ВА.5 В.1.1.529 hCoV-19/Russia/SPE-RII-25357S/2022.

2.1.3 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.

2.1.4 Животные

В исследовании использовали трансгенных мышей F1, полученных от скрещивания трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/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.)

2.1.5 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).

2.1.6 Среды для культивирования эукариотических клеток

Для культивирования клеточных линий эукариот использовали ростовую среду DMEM: среда DMEM (минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко, HyClone, США), содержащая 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), глутамин 584 мг/л (ПанЭко, Россия) и антибиотики пенициллин 25000 ЕД и стрептомицин 25 мг (ПанЭко, Россия).

Для определения инфекционного титра вируса SARS-CoV-2 в гомогенатах органов животных использовали среду поддержки DMEM с гентамицином: среда DMEM (минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко, HyClone, США), содержащую 2% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), глутамин 584 мг/л (ПанЭко, Россия), антибиотики пенициллин 25000 ЕД и стрептомицин 25 мг (ПанЭко, Россия) и антибиотик гентамицин 50 мг/л (ПанЭко, Россия).

Для наработки вируса SARS-CoV-2 и для постановки реакции вируснейтрализации использовали среду поддержки DMEM: среда DMEM

(минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко, HyClone, США), содержащую 2% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), глутамин 584 мг/л (ПанЭко, Россия) и антибиотики пенициллин 25000 ЕД и стрептомицин 25 мг (ПанЭко, Россия).

Криохраниение клеток осуществляли в растворе среды, содержащей 10% диметилсульфоксида для культуры клеток (A3672, AppliChem, Германия).

2.1.7 Наборы

Для выделения РНК использовали набор реагентов для выделения РНК RNeasy Plus Universal Kits (QIAGEN, Германия). ОТ-ПЦР-РВ проводили с использованием наборов «ПОЛИВИР SARS-CoV-2 «Express»» («Литех», Россия) и «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.» («АмплиТест», Россия).

2.1.8 Иммунобиологические препараты

Вакцины, используемая в работе, была получена из Филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России:

- Гам-КОВИД-Вак Ухань (Гам-КОВИД-Вак) - вакцина состоит из двух компонентов: компонент 1 на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 исходного варианта Ухань, компонент 2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 исходного варианта Ухань;
- Гам-КОВИД-Вак Дельта - вакцина состоит из двух компонентов: компонент 1 на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 варианта Дельта, компонент 2 на основе

рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 варианта Дельта;

- Гам-КОВИД-Вак Омикрон - вакцина состоит из двух компонентов: компонент 1 на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон, компонент 2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон;
- Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон – комбинированная вакцина состоит из двух компонентов: компонент 1 на основе смеси рекомбинантных аденовирусов человека 26 серотипа, несущих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 вариантов Дельта и Омикрон, компонент 2 на основе смеси рекомбинантных аденовирусов человека 5 серотипа, несущих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 вариантов Дельта и Омикрон.

2.2 Методы

2.2.1 Работа с вирусом SARS-CoV-2

Все исследования с жизнеспособным вирусом SARS-CoV-2 проводили в помещениях класса BSL-3 в присутствии не менее двух сотрудников, согласно 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".

2.2.2 Нарботка и анализ инфекционной активности SARS-CoV-2

2.2.2.1 Нарботка SARS-CoV-2

Нарботку различных вариантов вируса SARS-CoV-2 проводили на культуре клеток Vero E6. Культуру клеток предварительно заседали на культуральные флаконы с конфлюентностью 80% с использованием ростовой среды DMEM. Через 24 часа заменяли ростовую среду на среду поддержки и добавляли вирус SARS-CoV-2 при множественности инфекции $MOI=0,01$. Инкубировали в CO_2 -инкубаторе до достижения цитопатического действия (ЦПД). После наступления ЦПД кондиционированную среду, содержащую вирус, собирали, центрифугировали при $10000g +4^{\circ}C$, разливали в криопробирки и замораживали при $-80^{\circ}C$. После полной заморозки анализировали наличие вируса с помощью ОТ-ПЦР-РВ и определяли инфекционный титр.

2.2.2.2 Определение титра вируса SARS-CoV-2 по TCID₅₀

Титр инфекционного вируса определяли на клетках Vero E6 путем определения 50% инфекционной дозы культуры ткани (TCID₅₀ - tissue culture infectious dose 50). Последовательные 10-кратные разведения исходного материала вируса готовили в DMEM с 2% инактивированной FBS и в объеме 100 мкл добавляли к клеткам Vero E6 в 96-луночной планшете в 8 повторах. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 96 часов и оценивали визуально цитопатический эффект. Титр TCID₅₀ рассчитывали по методу Спирмена-Кербера.

2.2.2.3 Определение количества вирусных частиц методом ОТ-ПЦР-РВ

Выделение РНК из образцов, содержащих вирус SARS-CoV-2 проводили с помощью RNeasy Plus Universal Kits (QIAGEN, Германия) по протоколу фирмы-производителя. 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 ГЭ/мл.

2.2.3 Анализ уровня вируснейтрализующих антител

Реакцию нейтрализации проводили при постоянной дозе вируса с различными разведениями сыворотки крови добровольцев или животных. Перед анализом сыворотки инактивировали при 56°C в течение 30 минут. Готовили разведения сыворотки крови в культуральной среде DMEM с 2%

инактивированной эмбриональной бычьей сывороткой, далее смешивали со 100 TCID₅₀ вируса SARS-CoV-2, инкубировали 1 час при 37°C и добавляли к клеткам Vero E6. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Через 96 часов производили учет развития цитопатического действия вируса на культуру клеток визуально по оценке нарушения монослоя клеток. За титр ВНА исследуемой сыворотки принимали наибольшее ее разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия.

2.2.4 Исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак

2.2.4.1 Содержание животных

Содержание и обслуживание животных осуществляли в соответствии с требованиями по содержанию лабораторных животных [«Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях», 2010]. Кормление грызунов осуществляли полноценным гранулированным комбикормом, исключая необходимость введения дополнительных ингредиентов – «Комбикорм для содержания крыс, мышей, хомяков» (ООО «Лабораторкорм», Россия) [ГОСТ Р 50258-92, 1992].

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). В качестве подстилки использовали подстил для лабораторных животных REHOFIX® (JRS, Германия). Чистку клеток осуществляли каждый день. Поилки с водой меняли ежедневно.

2.2.4.2 Иммунизация животных

Исследование проводили на мышах линии C57BL/6 Tg(K18-ACE2)2Pr1m и сирийских хомячках.

Вакцину Гам-КОВИД-Вак использовали сразу после разморозки. При необходимости разведения препаратов использовали формулирующий буфер. Разведенный препарат использовали сразу после разведения. Иммунизацию проводили внутримышечно в объемах, не превышающих допустимые для данного вида животных. Дозы препарата были выбраны на основе результатов исследования индукции S-специфического иммунного ответа у животных при введении различных доз рекомбинантных вирусных векторов rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV-2 в предварительных экспериментах, не вошедших в состав данной диссертационной работы. Иммунизирующие дозы, используемые в данной работе, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Иммунизирующие дозы компонентов вакцины Гам-КОВИД-Вак.

	Компонент 1 (rAd26-S-CoV2)	Компонент 2 (rAd5-S-CoV2)
Мыши	10^8 - 10^9 в.ч.	10^8 - 10^9 в.ч.
Сирийские хомячки	10^9 - 10^{10} в.ч.	10^9 - 10^{10} в.ч.

2.2.4.3 Получение сыворотки крови животных

Цельную кровь животных инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C, отделяли сгустки крови со стенок пробирок, а после центрифугировали при 800g в течение 10 минут. Сыворотку отбирали в отдельные пробирки и хранили при -80°C.

2.2.4.5 Исследование протективной активности вакцины при интраназальном заражении сирийских хомячков вирусом SARS-CoV-2

Исследование протективной активности проводили на базе Лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Исследования проводили в соответствии с действующим СанПиН: СП 1.3.3118—13 Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности) Санитарно-эпидемиологические правила и СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". Исследования одобрены комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Исследование проводили на сирийских хомячках с индуцированной иммуносупрессией. Введение иммунодепрессантов (дексаметазон (DEX) и циклофосфамид (CPA)) начинали за 7 дней до заражения SARS-CoV-2 - DEX в дозе 10 мг/кг вводили внутривентрально ежедневно в течение 7 дней, за 3 дня до заражения дополнительно вводили CPA в дозе 150 мг/кг внутривентрально. В день заражения SARS-CoV-2 и через каждые 3 дня после заражения CPA вводили внутривентрально в дозе 100 мг/кг. Животных заражали интраназально в дозе 10^6 TCID₅₀ SARS-CoV-2. Хомячков содержали в изолированной системе IsoCage N (Techniplast, Италия) в помещениях, аттестованных под работу с животными, инфицированными патогенами 2 группы патогенности.

2.2.4.6 Исследование протективной активности вакцины при интраназальном заражении трансгенных мышей вирусом SARS-CoV-2

Исследование протективности проводили на базе Лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Исследования проводили в соответствии с действующим СанПиН: СП 1.3.3118—13 и СП 3.3686-21. Исследования одобрены комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Трансгенные мыши-гибриды F1 получены в результате скрещивания трансгенных самцов, несущих ген hACE2 (The Jackson Laboratory, США) и нетрансгенных самок линии C57BL/6 (Пушино, Россия). Разведение животных осуществляли в SPF-виварии Филиала «Медгамал НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Наличие гена hACE2 у мышей линии C57BL/6 Tg(K18-ACE2)2Pr1mn поколения F1 определяли с помощью ПЦР в реальном времени по протоколу The Jackson Laboratory для данной линии мышей.

Животных заражали интраназально в дозе 3×10^4 или 10^5 TCID₅₀ SARS-CoV-2. Мышей содержали в изолированной системе IsoCage N (Techniplast, США) в помещениях, аттестованных для работы с животными, инфицированными патогенами 2 группы патогенности.

2.2.4.7 Определение вирусной нагрузки в легких

Животных эвтаназируют с помощью передозировки ингаляционным анестетиком с последующей цервикальной дислокацией. Проводили вскрытие животных, отбирали легкие. Промывали отобранные органы физиологическим раствором. 10% гомогенат легких готовили с использованием прибора MRbio FastPrep-24, гомогенаты центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин и супернатант использовали для дальнейшего анализа. Для количественного определения вирусной РНК в виде геномных эквивалентов в мл (ГЭ/мл) использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени [Corman V.M. и др., 2020]. Определение вирусной нагрузки по количеству геномных эквивалентов проводили методом ПЦР в реальном времени. Для определения вирусной нагрузки с помощью ПЦР РНК выделяли из 10% гомогенатов органов с использованием набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit. ПЦР проводили с использованием набора «Поливи́р SARS-CoV-2 Express» («Литех», Россия). Определение концентрации вирусной РНК в образцах проводили с помощью калибровочной кривой, построенной на 10-кратных разведениях вирусной РНК с известной концентрацией в той же ПЦР. Для контроля выделения РНК использовали праймеры для гена бета-

актина мыши и хомяка (мышь: F: СТАТТGGCAACGAGCGGTTC, R: CGGATGTCAACGTCACACTTC, P: ROX-GCTCTTTTCCAGCCTTCSTTCTTG-BHQ2; хомяк: F: АСТGCCGCATCCTCTTCCT, R: TCGTTGCCAATGGTGATGAC, P: FAM-CCTGGAGAAGAGСТАТGAGCTGCCTGATG-BHQ1). Инфекционный титр вируса определяли на клетках Vero E6 с использованием анализа TCID₅₀ по методике, описанной выше (2.2.2.2. Определение титра вируса SARS-CoV-2 по TCID₅₀).

2.2.5 Гистологический анализ

Гистологические исследования проводились 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)).

Животных эвтаназируют с помощью передозировки ингаляционным анестетиком с последующей цервикальной дислокацией. Проводили вскрытие животных, отбирали легкие. Промывали отобранные органы физиологическим раствором. 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 были получены с помощью сканера Epson Perfection V600 (Epson, Япония), и с помощью микроскопа Axio Imager.Z1 (ZEISS, Германия) с камерой AxioCam MRc 5 (ZEISS, Германия).

2.2.6 Статистические и биоинформатические методы

2.2.6.1 Статистическая обработка результатов исследований

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 [Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.М., 2011]. 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 д'Агостино-Пирсона или тест Шапиро-Уилка на нормальность распределения [Авива П., Кэролайн С., 2015].

2.2.7.2 Биоинформатические методы

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».

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Общая схема исследования

С момента разработки вакцины Гам-КОВИД-Вак в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России ведется постоянный мониторинг эффективности вакцины в отношении появляющихся новых вариантов вируса SARS-CoV-2. Мониторинг эффективности проводится по нескольким направлениям:

1) исследование вируснейтрализующей активности сывороток крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, в отношении нового варианта вируса в сравнении с исходным вариантом;

2) исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении нового варианта вируса на модели инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у лабораторных животных.

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. Схема исследования представлена на рисунке 8.

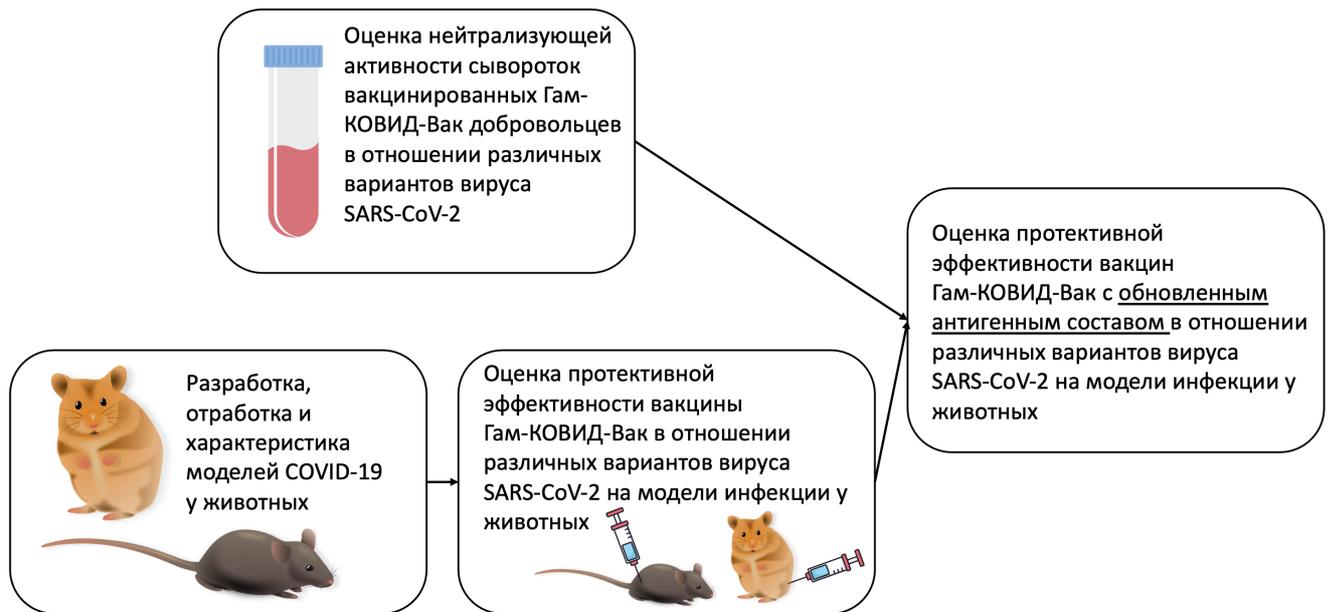


Рисунок 8 – Общая схема исследования эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 на экспериментальной модели.

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

Одним из первых этапов исследования протективной эффективности существующих вакцинных препаратов в отношении новых появляющихся вариантов вируса SARS-CoV-2 является анализ уровня вируснейтрализующих в сыворотках крови вакцинированных добровольцев в сравнении с исходным вариантом вируса SARS-CoV-2 Ухань (B.1.1.1).

3.2.1 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 вариантов BBO вируса SARS-CoV-2 в сравнении с исходным вариантом Ухань (B.1.1.1). На рисунке 9 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).

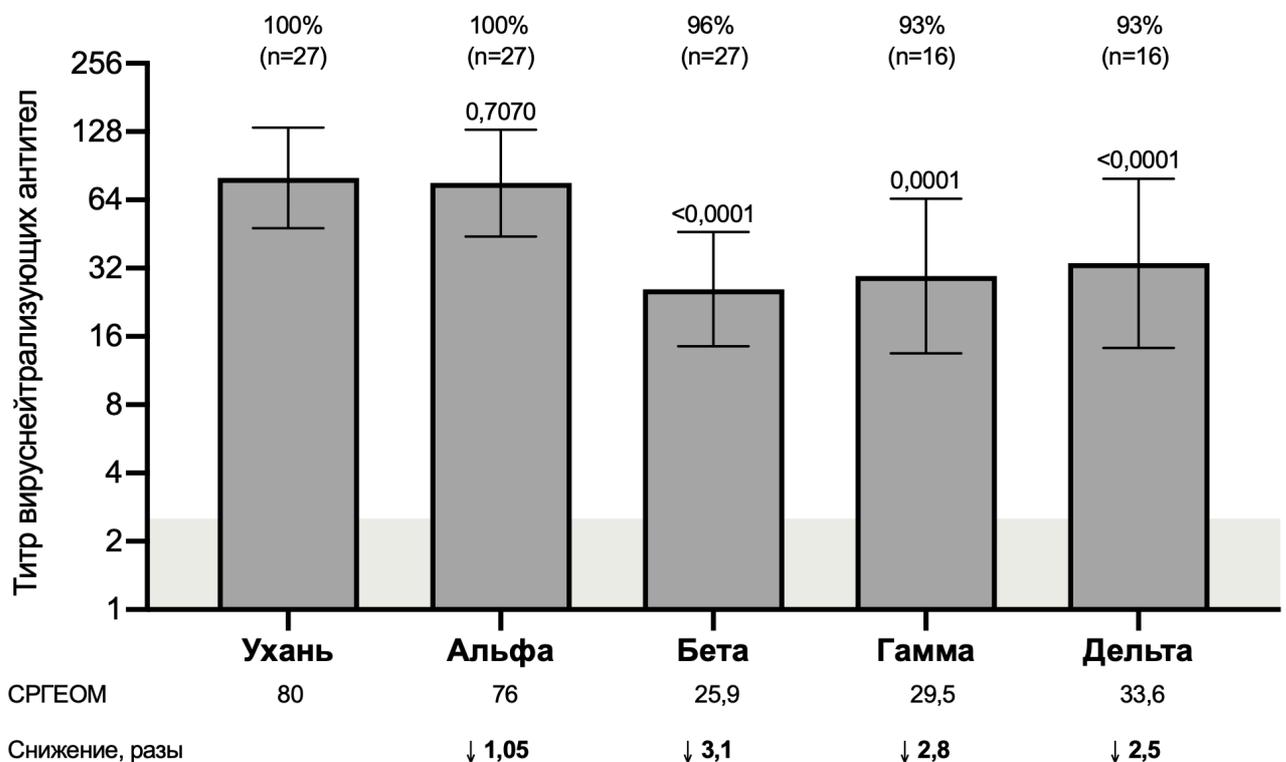


Рисунок 9 – Титры вируснейтрализующих антител в сыворотках крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1), Альфа (B.1.1.7), Бета (B.1.351), Гамма (B.1.1.28/P.1) и Дельта (B.1.617.2). Значение P определяли с помощью теста Уилкоксона. Серым цветом 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.

3.2.2 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 проводили с использованием 19 сывороток крови вакцинированных и ревакцинированных добровольцев, доступных на момент проведения исследования. Результаты исследования представлены на рисунке 10.

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.

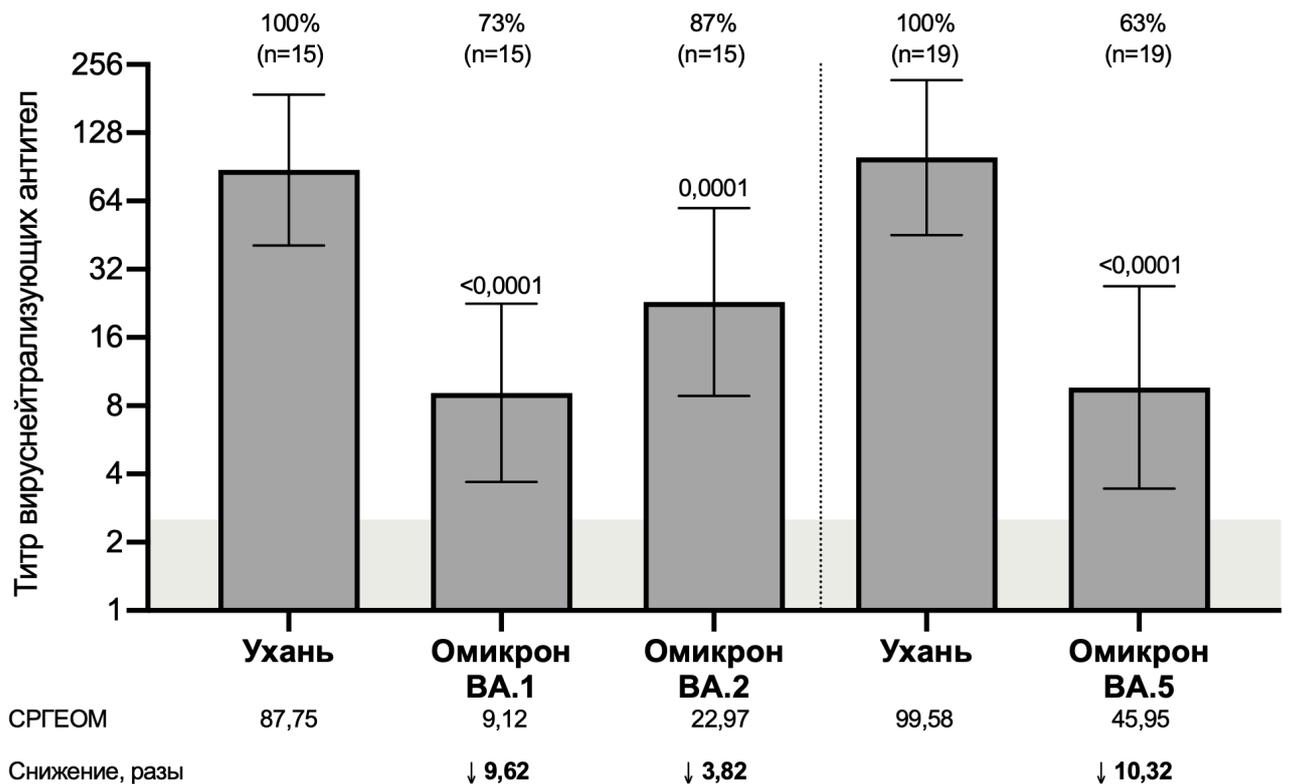


Рисунок 10 - Уровни вируснейтрализующих антител в сыворотках крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1) и Омикрон (B.1.1.529) сублиний BA.1, BA.2 и BA.5. На рисунке отмечено среднее геометрическое титра ВНА, 95% доверительный интервал, снижение относительно варианта Ухань, уровни значимости 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 11 представлены титры вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1) и Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.1.

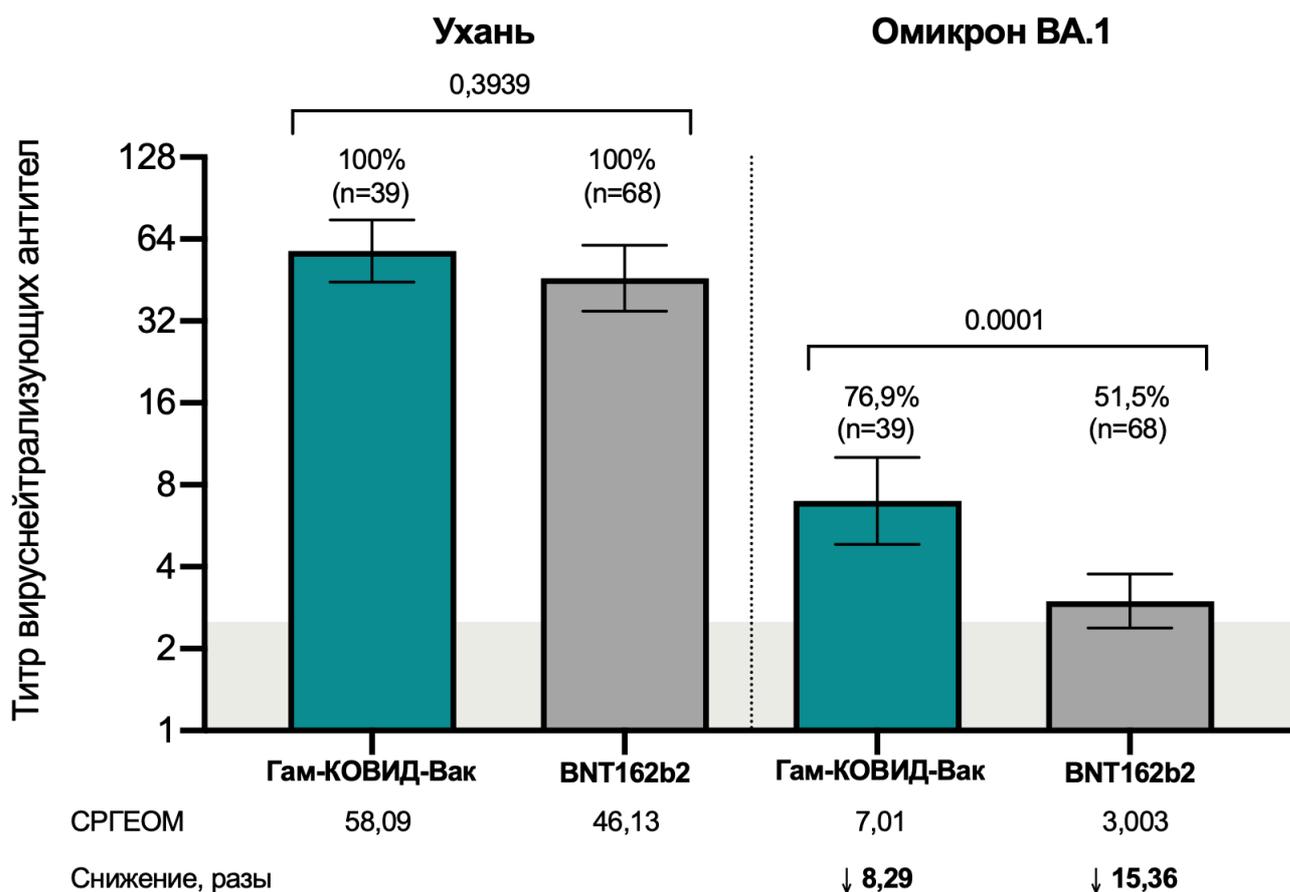


Рисунок 11 – Уровни вируснейтрализующих антител в сыворотках крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак или BNT162b2, в отношении вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1.1) и Омикрон (B.1.1.529) сублинии BA.1. На рисунке отмечено среднее геометрическое титра ВНА, 95% доверительный интервал, снижение относительно варианта Ухань, уровни значимости 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 11).

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

3.3 Адаптация модели COVID-19 у лабораторных животных

3.3.1 Адаптация модели COVID-19 у сирийских хомячков

Для разработки модели COVID-19 использовали сирийских хомячков. Животных заражали вирусом SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1 интраназально в дозе 5×10^5 TCID₅₀ на животное. Признаками развития инфекции считали гибель животных и уменьшение массы тела. Было установлено, что через 2 суток после заражения животных у них выявлялось снижение массы тела (рисунок 12), которое достигало своего максимума к 4 суткам после заражения. Однако наблюдаемое снижение было обратимым – уже на 4 сутки животные начинали набирать вес, к 6-7 суткам достигали своей первоначальной массы тела и продолжали ее набирать в течение срока наблюдения (12 суток). Не наблюдалась гибель зараженных животных в течение всего срока наблюдения.

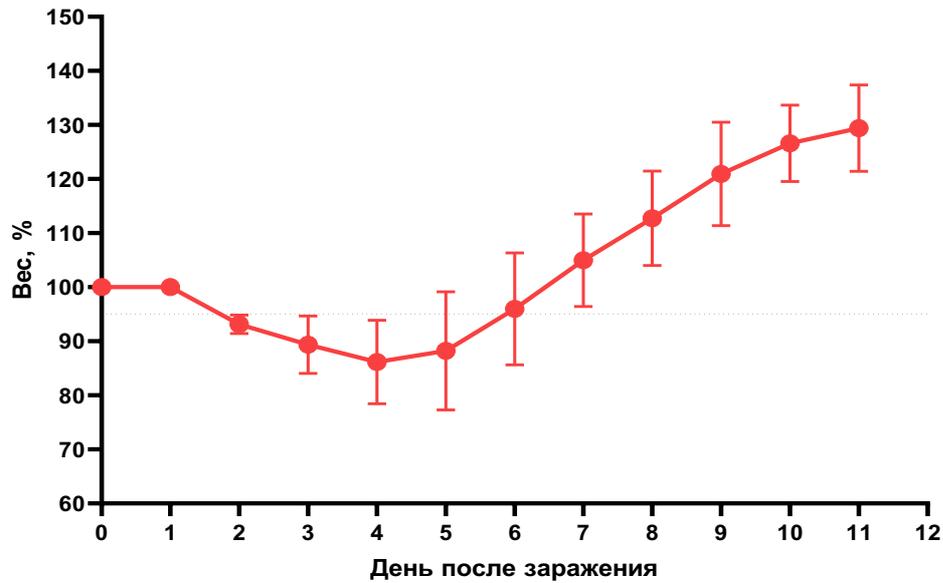


Рисунок 12 - Изменения массы тела сирийских хомячков, зараженных вирусом SARS-CoV-2 вариантом B.1.1.1. Представлены суточные изменения средних значений массы тела животных ($M \pm \sigma$, $n=6$).

Для оценки эффективности профилактических препаратов необходимо продемонстрировать создание защиты у животных от заражения летальной дозой патогена, поэтому нами была разработана модель летальной инфекции COVID-19 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией.

Для индукции иммуносупрессии применяли дексаметазон (DEX - синтетический глюкокортикоид) и циклофосфамид (CPA - цитостатический противоопухолевый химиотерапевтический лекарственный препарат алкилирующего типа действия). В первую очередь проводили исследование влияния данных препаратов на массу тела животных и на основные показатели крови (лейкоцитарную формулу). В ходе исследования животных разделили на 4 группы (таблица 3):

- сирийские хомячки, получающие терапию только дексаметазоном (DEX);
- сирийские хомячки, получающие терапию только циклофосфамидом (CPA);
- сирийские хомячки, получающие комбинированную терапию дексаметазоном и циклофосфамидом (DEX + CPA);
- интактные сирийские хомячки (Контроль).

Таблица 3 – Схема исследования влияния дексаметазона и циклофосфида на массу тела животных и лейкоцитарную формулу.

	DEX	CPA	DEX+CPA	Контроль
0 день	DEX 10 мг/кг	-	DEX 10 мг/кг	-
1 день	DEX 10 мг/кг	-	DEX 10 мг/кг	-
2 день	DEX 10 мг/кг	-	DEX 10 мг/кг	-
3 день	DEX 10 мг/кг	CPA 150 мг/кг	DEX 10 мг/кг + CPA 150 мг/кг	-
4 день	DEX 10 мг/кг	-	DEX 10 мг/кг	-
5 день	DEX 10 мг/кг	-	DEX 10 мг/кг	-
6 день	DEX 10 мг/кг	CPA 100 мг/кг	DEX 10 мг/кг + CPA 100 мг/кг	-
7 день	Отбор крови			

По результатам исследования было продемонстрировано снижение массы тела животных на 1-2 день после начала терапии дексаметазоном в группах «DEX» и «DEX+CPA», при этом снижение массы тела оказалось обратимым и приходило в норму к моменту окончания введения иммуносупрессантов (рисунок 13).

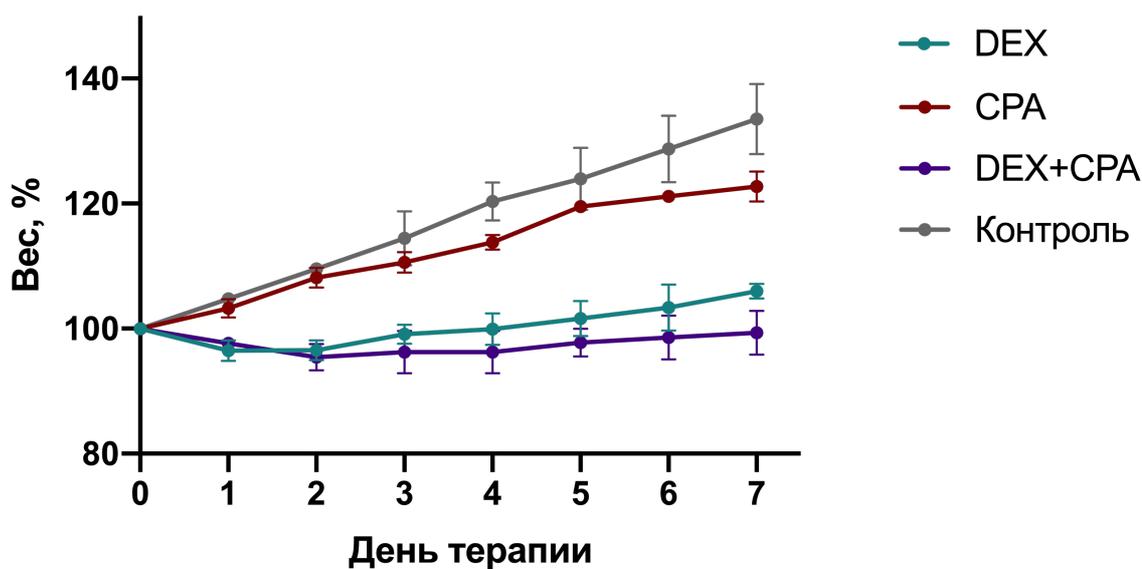


Рисунок 13 – Динамика изменения массы тела сирийских хомячков, получающих иммуносупрессанты. На графике представлены средние значения и стандартное отклонение.

На следующий день после окончания введения иммуносупрессантов, у животных отбирали кровь для оценки изменений в лейкоцитарной формуле. Результаты исследования представлены на рисунке 14.

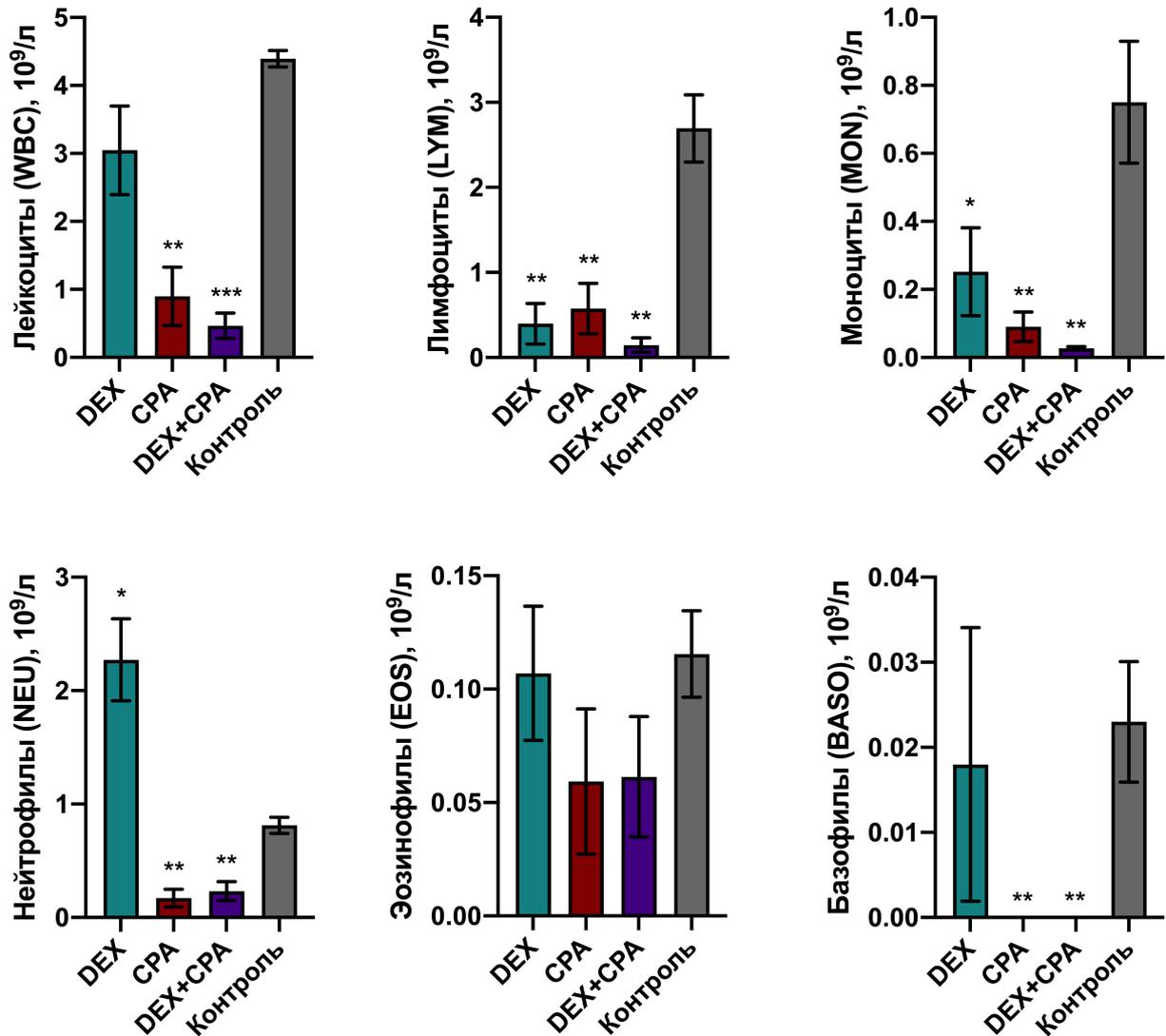


Рисунок 14 – Лейкоцитарная формула крови сирийских хомячков, получающих иммуносупрессанты. На графике представлены средние значения и стандартное отклонение (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p = 0,0001$).

По результатам исследования было продемонстрировано снижение абсолютного количества лейкоцитов в цельной крови всех групп животных, получающих иммуносупрессанты, однако достоверное снижение было показано только в группах «CPA» и «DEX+CPA». Абсолютное количество лимфоцитов и моноцитов было снижено во всех группах животных, получавших

иммуносупрессанты. Наибольшее снижение абсолютного количества лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов было продемонстрировано в группе комбинированного введения «DEX+CPA». Абсолютное количество нейтрофилов повышалось в группе «DEX», в то время как применение циклофосфида вызывало их снижение. Достоверного изменения в абсолютном количестве эозинофилов продемонстрировано не было, однако наблюдается тенденция к снижению этого показателя у животных, получающих циклофосфамид. Абсолютное значение базофилов в группах животных, получающих циклофосфамид было равно 0, в то время как в группе животных получающих дексаметазон их количество оставалось в норме.

Исходя из полученных данных, для достижения необходимого уровня иммуносупрессии у сирийских хомячков к моменту заражения вирусом SARS-CoV-2, необходимо применять комбинированную терапию дексаметазоном и циклофосфамидом.

На следующем этапе проводили исследование летальности вируса SARS-CoV-2 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией. Иммуносупрессию у животных индуцировали с помощью дексаметазона и циклофосфида по следующей схеме: дексаметазон в дозе 10 мг/кг (ежедневно в течение 7 дней) и циклофосфамид (150 мг/кг за 3 дня до заражения, 100 мг/кг в день заражения и далее – 1 раз в 3 дня). Животных (n=8) заражали вирусом SARS-CoV-2 вариант В.1.1.1 интраназально в дозе 10^6 TCID₅₀ на животное. В контрольную группу входили незараженные животные с индуцированной иммуносупрессией. Признаками развития инфекции считали гибель животных и уменьшение массы тела.

По результатам исследования было установлено, что у зараженных животных на фоне иммуносупрессии уже на вторые сутки после заражения наблюдалось необратимое снижение веса, а к 12 суткам после заражения все животные опытной группы погибли (рисунок 15). Снижение массы тела и гибель животных в контрольной группе животных не выявлены в течение срока наблюдения.

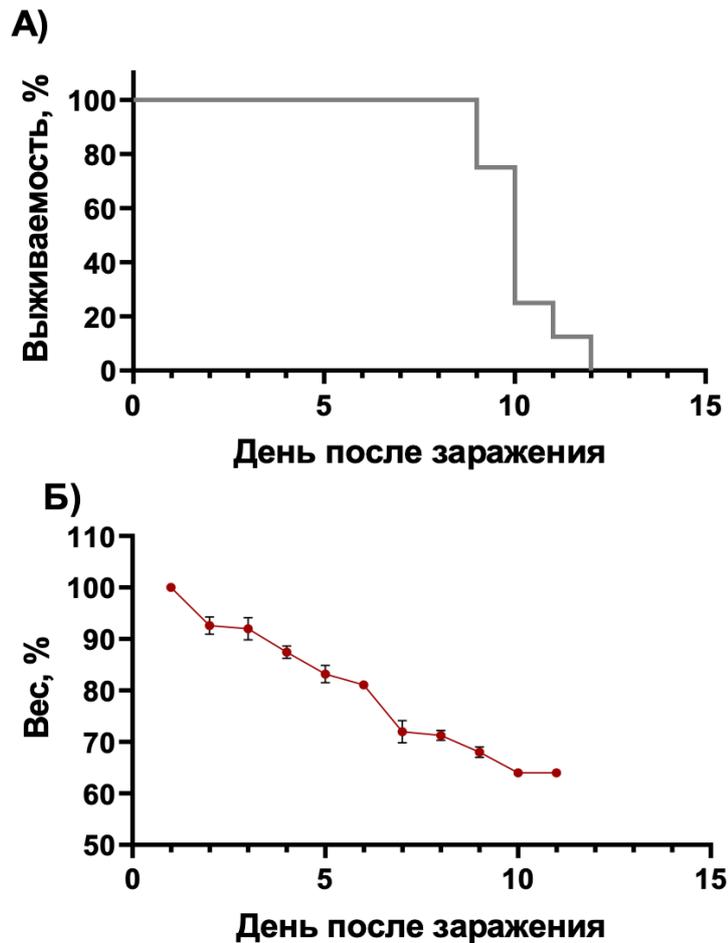


Рисунок 15 - Выживаемость (А) и изменения массы тела (Б) сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией после заражения вирусом SARS-CoV-2 в дозе 10^6 TCID₅₀. Б. Представлены суточные изменения средних значений массы тела животных ($M \pm \sigma$, $n=8$).

На следующем этапе исследования необходимо было определить минимальную дозу SARS-CoV-2, приводящую к гибели животных.

С этой целью сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией разделяли на четыре группы и заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 вариант В.1.1.1 в дозах 10^1 TCID₅₀, 10^2 TCID₅₀, 10^3 TCID₅₀ и 10^4 TCID₅₀ на животное соответственно. Наблюдение за гибелью зараженных животных проводили в течение 30 суток. Все вводимые дозы вируса оказались летальными для животных (рисунок 16).

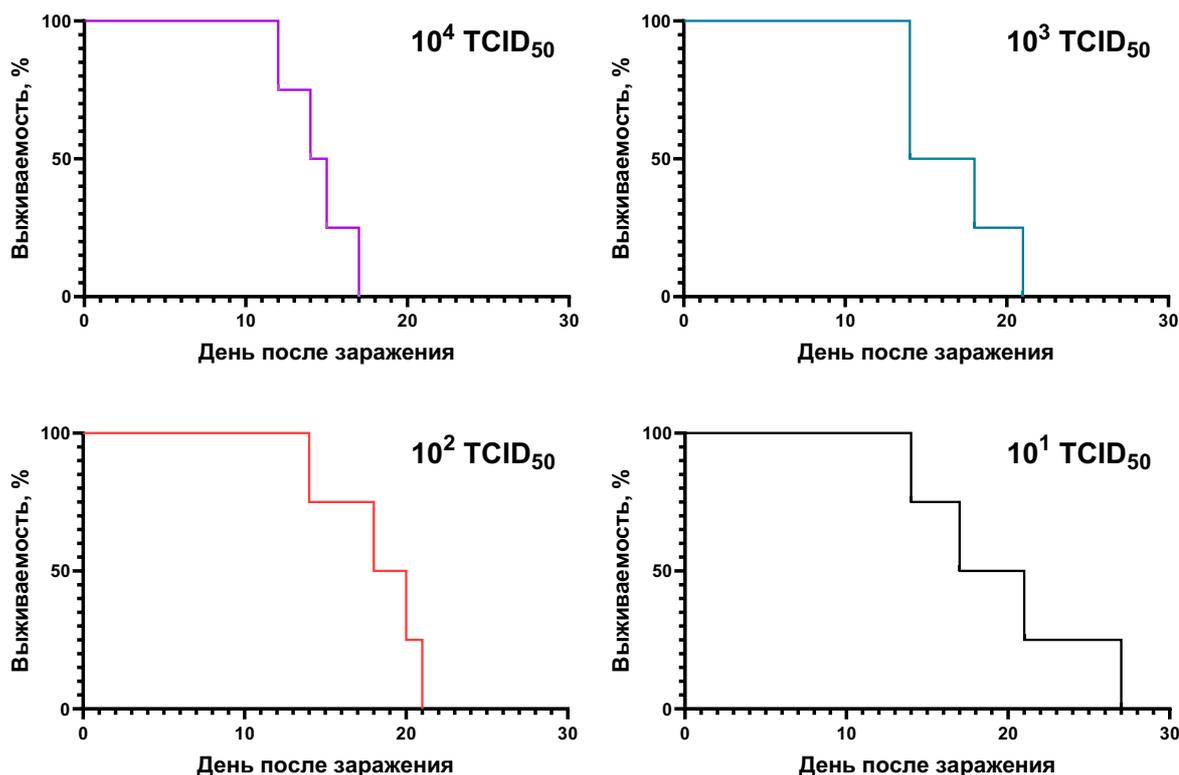


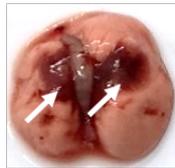
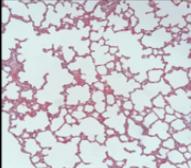
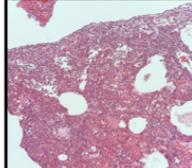
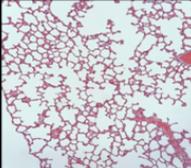
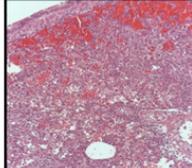
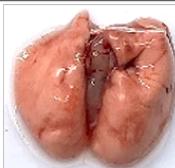
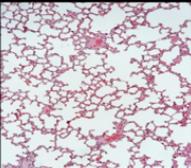
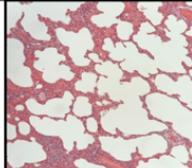
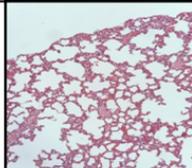
Рисунок 16 - Выживаемость сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией после заражения различными дозами вируса SARS-CoV-2 (n=4 в группе).

Таким образом, по результатам исследования было показано, что вирус SARS-CoV-2 в дозе 10^1 TCID₅₀ на животное обеспечивает 100% летальность сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией при интраназальном заражении.

Затем было проведено исследование состояния легких и вирусной нагрузки у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией после заражения различными дозами вируса SARS-CoV-2. Животных на фоне иммуносупрессии заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1 в дозах 10^1 – 10^3 TCID₅₀ на животное, на 4 и 7 сутки у животных изымали легкие для макроскопического анализа и оценки вирусной нагрузки. На 4 сутки после заражения у животных, получивших вирус в дозах 10^2 – 10^3 TCID₅₀, детектировали повреждения тканей легкого при макроскопическом исследовании, анализ вирусной нагрузки показал, что вирус накапливается в легких зараженных

животных в высоком титре (более 10^6 TCID₅₀/100 мг ткани). Примечательно, что в группе животных, получивших вирус в дозе 10^1 TCID₅₀, при макроскопическом анализе не выявлено повреждений легких, однако вирусная нагрузка составила более 10^6 TCID₅₀/100 мг ткани (рисунок 17).

На 7 сутки после заражения в легких всех зараженных животных детектировали значительные повреждения легких, анализ вирусной нагрузки показал, что у всех зараженных животных в легких детектируется инфекционно-активный вирус (рисунок 17). Повреждения в легких у животных на иммуносупрессии, которых не заражали вирусом SARS-CoV-2, отсутствовали (рисунок 17).

Доза вируса, TCID ₅₀	День после заражения					
	4			7		
	Макроскопия	Гистология	Вирусная нагрузка*	Макроскопия	Гистология	Вирусная нагрузка*
3 lg			6,3±0,7			5,5±1,3
2 lg			6,5±0,4			5,4±0,5
1 lg			6,1±0,3			6,1±0,5
Без вируса						-

* - TCID₅₀/мл в 10% гомогенате органа, среднее ± стандартное отклонение.

Рисунок 17 - Фотографии и вирусная нагрузка в легких сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией через 4 и 7 дней после заражения различными дозами вируса SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1.

Гистологический анализ тканей легких показал (рисунок 17):

1) У сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией, зараженных всеми исследуемыми дозами вируса SARS-CoV-2:

- На 4 сутки после заражения: Паренхима лёгкого представлена бронхами различного калибра и ацинусами. Легочный рисунок сохранен в большинстве образцов. Воздушность – 55 – 65%. Просветы крупного и среднего бронхов – гофрированы, местами содержат лейкоциты. Их стенка выстлана однослойным однослойным многорядным (цилиндрическим) реснитчатым эпителием, островки хондроцитов. В собственной пластинке крупных бронхов, а также в межальвеолярных перегородках присутствуют единичные эозинофилы и тучные клетки. Альвеолы выстланы однослойным плоским эпителием. Индекс васкуляризации в пределах нормы.

- На 7 сутки после заражения: Паренхима лёгкого представлена бронхами различного калибра и частично сохранившимися ацинусами. Легочный рисунок не сохранен в большинстве образцов. Воздушность – 45 – 55%. На значительном протяжении признаки ателектаза и участками распада лёгочной паренхимы. Просветы крупного и среднего бронхов – расширены, содержат скопление лейкоцитов. Их стенка выстлана однослойным кубическим эпителием. В собственной пластинке крупных бронхов, а также в межальвеолярных перегородках присутствуют эозинофилы и тучные клетки. Альвеолы выстланы однослойным плоским эпителием, зоны лейкоцитарной инфильтрации. Гиперплазия лимфоидной ткани, скопление пенистых макрофагов. Кровеносные сосуды – просветы расширены, полнокровные, стенка – утолщена, зоны гиалиноза, очаги переваскулярного отёка.

2) У незараженных сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией:

- Паренхима лёгкого представлена бронхами различного калибра и ацинусами. Легочный рисунок сохранен в большинстве образцов, картина спавшегося лёгкого. Воздушность – 75 – 85%. На значительном протяжении

признаки ложной эмфиземы. Просветы крупного и среднего бронхов – гофрированы. Их стенка выстлана однослойным многорядным (цилиндрическим) реснитчатым эпителием, пластинки и островки гиалинового или эластического хряща, содержащего матрикс и хондроциты (изогенные группы). В собственной пластинке крупных бронхов, а также в межальвеолярных перегородках присутствуют единичные эозинофилы и тучные клетки. Альвеолы выстланы однослойным плоским эпителием. Индекс васкуляризации в пределах нормы.

Таким образом, по результатам проведенных исследований была разработана модель летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией. Показано, что заражение животных на фоне иммуносупрессии приводит к развитию тяжелой инфекции: у зараженных животных детектировали обширные поражения легочной ткани, значительное снижение веса после заражения и гибель животных.

3.3.2 Адаптация модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей

hACE2-трансгенные мыши восприимчивы к вирусу SARS-CoV-2. В исследовании использовали гемизиготных трансгенных мышей F1, полученных от скрещивания трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J (Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/034860>, статус здоровья SOPF) и нетрансгенных самок C57BL/6 (статус здоровья SPF). В рамках первичного исследования мышей заражали вирусом SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1 интраназально в дозе 10^5 TCID₅₀/мышь. После заражения оценивали формирование повреждений в легких, динамику массы тела и гибель животных. Часть животных на 4 день после заражения подвергали эвтаназии и изымали легкие для проведения макроскопического и гистологического анализа. У животных начиная с 4 суток после заражения детектировали необратимое снижение массы тела, к 8 суткам после заражения все животные погибли (рисунок 18 А,Б). Макроскопический и гистологический анализ подтвердил развитие вирусной пневмонии в легких

зараженных животных. Наблюдается лейкоцитарная инфильтрация, ателектаз и изменение мембранных структур стенки альвеол (рисунок 18 В,Г).

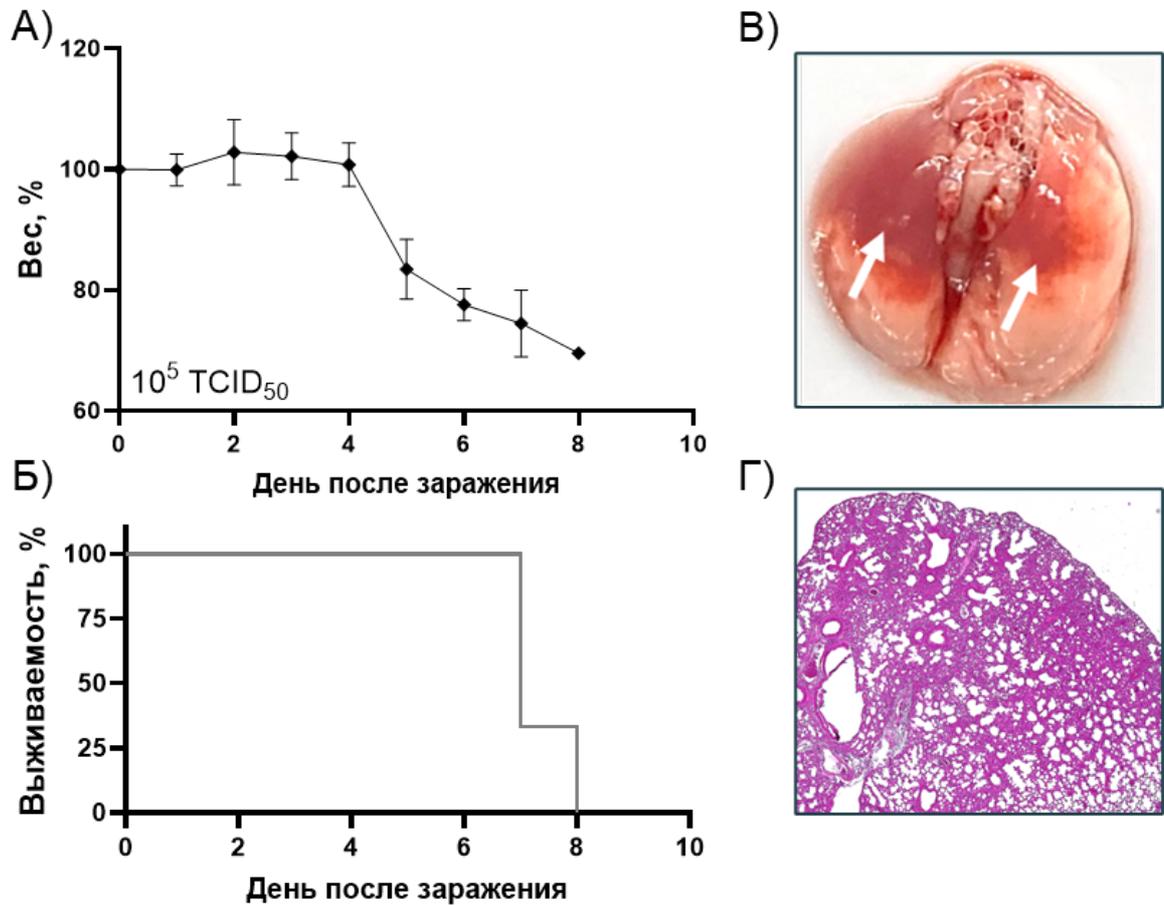


Рисунок 18 – Изменение массы тела (А) и выживаемость (Б) hACE2-трансгенных мышей после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариант В.1.1.1 интраназально в дозе 10^5 TCID₅₀/мышь (n=4). В) Макрофотография легкого зараженного животного на 4 день после заражения. Г) Фотография среза легкого зараженного животного на 4 день после заражения (окрашивание Гематоксилин-Эозином).

Далее было проведено исследование для определения 50% летальной дозы (ЛД₅₀) для данной модели инфекции. С этой целью шесть групп hACE2-трансгенных мышей заражали вирусом SARS-CoV-2 вариант В.1.1.1 интраназально в дозах 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 TCID₅₀/мышь. В каждой группе было по 3 животных. Было установлено, что введение вируса SARS-CoV-2 в дозах

$10^3 - 10^5$ TCID₅₀/мышь приводило к гибели всех животных в течение 10-11 дней после заражения (рисунок 19). Доза 10^2 TCID₅₀/мышь вызвала гибель 33% животных. Не наблюдали в течение срока наблюдения (20 суток) гибели животных в группах, зараженных вирусом SARS-CoV-2 в дозах $10^0 - 10^1$ TCID₅₀/мышь в (рисунок 19). Расчет ЛД₅₀ проводили по методу Рида-Менча. Значение ЛД₅₀ для hACE2-трансгенных мышей при интраназальном введении вируса SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1 составило 2×10^2 TCID₅₀.

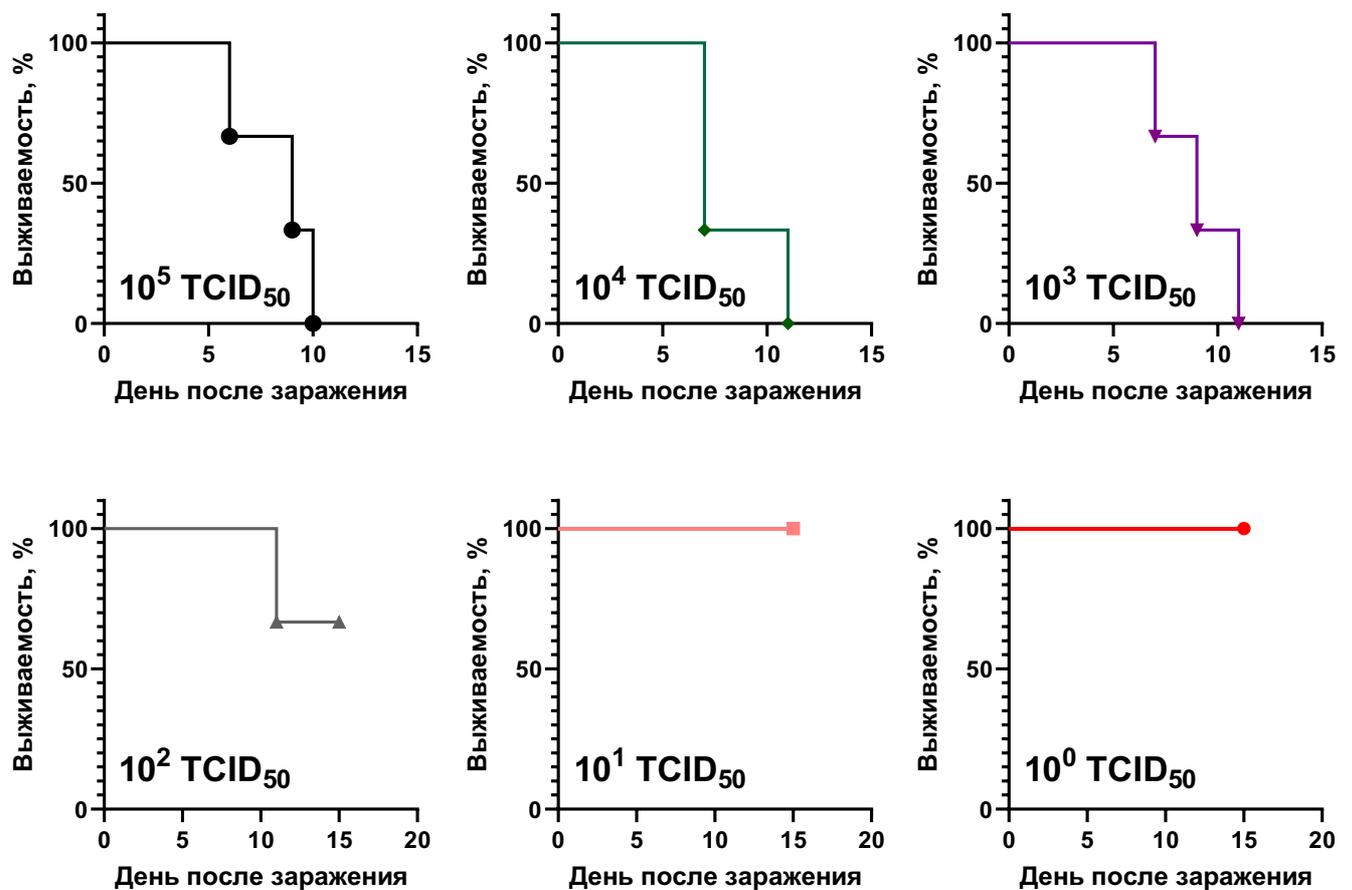


Рисунок 19 - Выживаемость hACE2-трансгенных мышей после заражения различными дозами вируса SARS-CoV-2 (n=3 в группе).

Таким образом, показано, что интраназальное заражение hACE2-трансгенных мышей вирусом SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1 приводит к развитию легочной инфекции у животных. Определена величина ЛД₅₀ вируса SARS-CoV-2

вариант В.1.1.1 для hACE2-трансгенных мышей при интраназальном заражении, которая составила $\sim 2 \times 10^2$ TCID₅₀.

3.4 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

Одна из ключевых задач при мониторинге эффективности вакцины в условиях эволюции вируса SARS-CoV-2 и появления новых вариантов, вызывающих обеспокоенность, состоит в своевременной оценке эффективности существующих вакцин в отношении новых появляющихся вариантов вируса SARS-CoV-2. В этом исследовании представлены результаты защитной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак против SARS-CoV-2 вариант Ухань и вариантов, вызывающих обеспокоенность: В.1.1.7, В.1.351, В.1.1.28/Р.1, В.1.617.2 при летальной инфекции COVID-19 на hACE2-трансгенных мышах.

hACE2-трансгенных мышей иммунизировали внутримышечно двукратно вакциной Гам-КОВИД-Вак с интервалом в 21 день и через неделю после второй иммунизации заражали различными вариантами вируса SARS-CoV-2 (таблица 4).

Таблица 4 – Дизайн исследования протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2.

Группа	Вирус SARS-CoV-2, доза	Проводимые процедуры
Вакцина	В.1.1.1, 10^5 TCID ₅₀	В каждой группе по 12 животных: По 4 мыши вскрывали на 4 день после заражения для определения вирусной нагрузки в легких (TCID ₅₀); По 8 мышей для изучения динамики изменения веса и для оценки выживаемости.
Контроль		
Вакцина	В.1.1.7, 10^5 TCID ₅₀	
Контроль		
Вакцина	В.1.351, 10^5 TCID ₅₀	
Контроль		
Вакцина	В.1.1.28/Р.1, 10^5 TCID ₅₀	
Контроль		
Вакцина	В.1.617.2, 10^5 TCID ₅₀	
Контроль		

На 4-й день после заражения SARS-CoV-2 проводили макроскопический и гистологический анализ повреждений легких и анализ вирусной нагрузки в легких животных в группах вакцинированных и контрольных животных (рисунки 20, 21).

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 20).

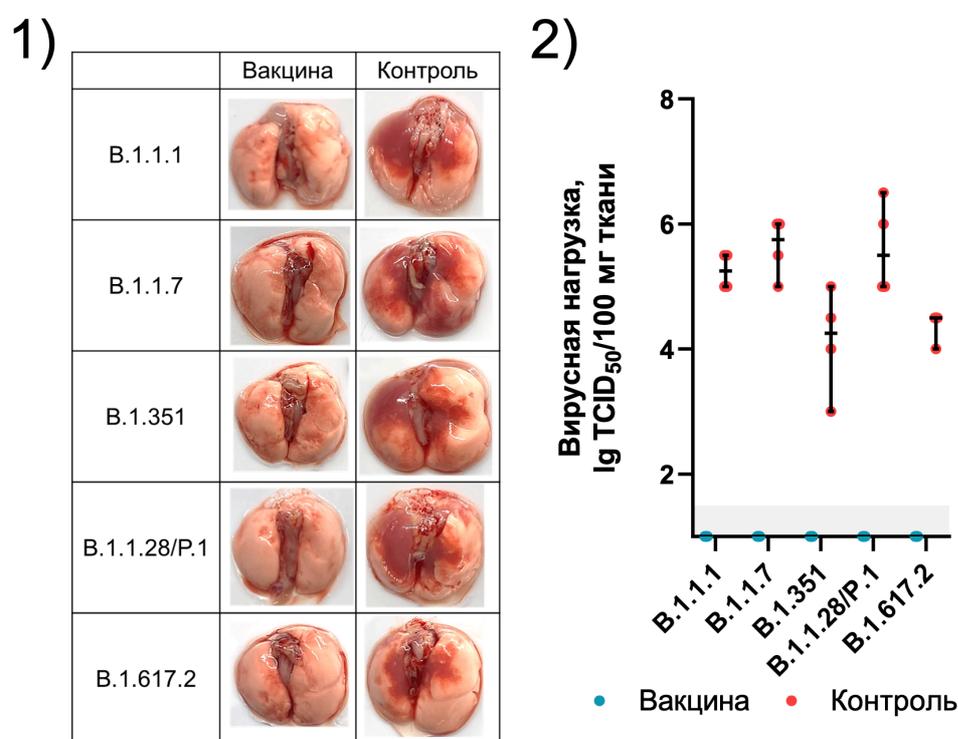


Рисунок 20 - 1) Фотографии легких вакцинированных и контрольных (плацебо) мышей через 4 дня после заражения различными вариантами SARS-CoV-2. 2) Вирусная нагрузка (TCID₅₀/мл) в 10% гомогенатах легких вакцинированных и контрольных животных на 4-й день после заражения. Данные представлены в виде индивидуальных 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 ($p=0,0286$).

Гистологический анализ срезов легких показал обилие сегментоядерных лейкоцитов в периваскулярной области легких у контрольных невакцинированных животных, в то время как у вакцинированных животных сегментоядерные лейкоциты практически отсутствуют (рисунок 21(1)). Также у контрольных невакцинированных животных наблюдается заполнение просвета бронхов и бронхиол макрофагами, белковым экссудатом и постклеточными структурами, в то время как у вакцинированных животных наблюдается сдувание эпителия и тонкие гиалиновые мембраны в бронхах и бронхиолах (рисунок 21(2)).

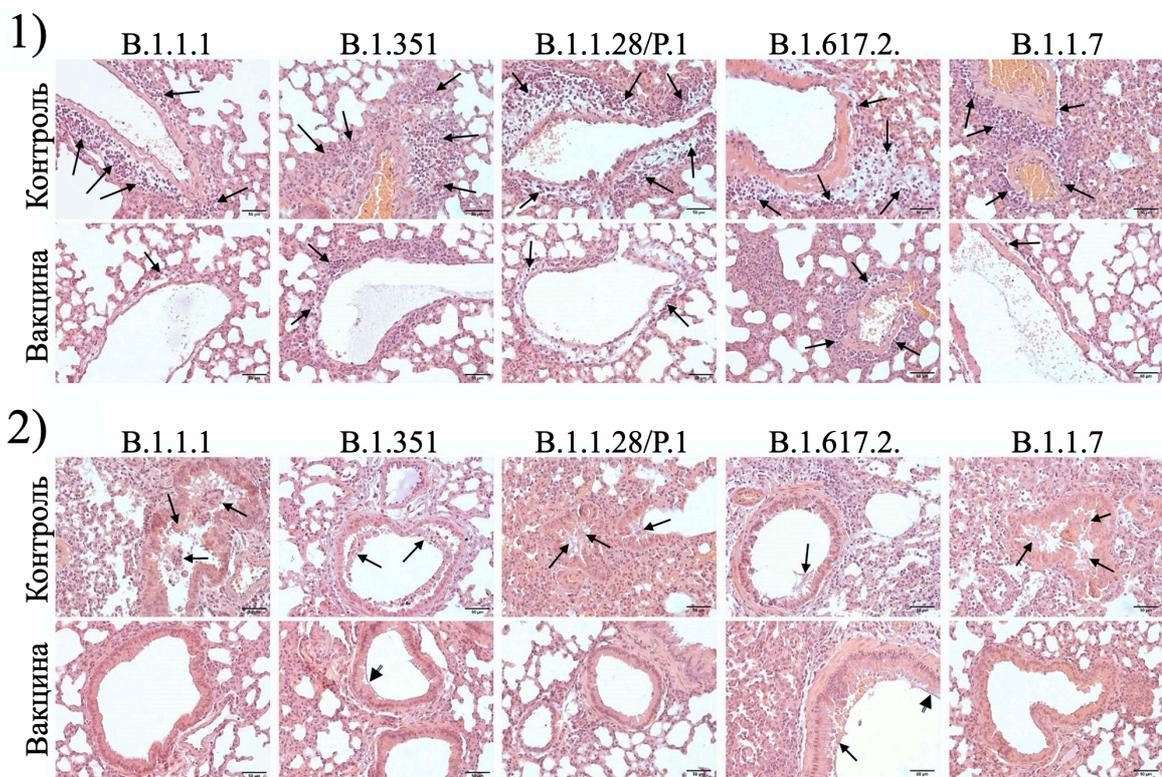


Рисунок 21 - Гистологические особенности лёгочной ткани вакцинированных и контрольных (плацебо) мышей через 4 дня после заражения различными вариантами SARS-CoV-2. 1) обилие сегментоядерных лейкоцитов в периваскулярной области (стрелки) у контрольных животных против почти полного их отсутствия у вакцинированных (стрелки); 2) заполнение просвета бронхов и бронхиол макрофагами, белковым экссудатом и постклеточными структурами (стрелки) в контроле, сдувание эпителия и тонкие гиалиновые мембраны (короткие стрелки) в бронхах и бронхиолах вакцинированных мышей; окрашивание гематоксилином и эозином, шкала – 50 μm .

Далее гистологические изменения в легких были проанализированы с помощью специализированной балльной системы оценки (таблица 5).

Таблица 5 - Критерии оценки воспалительной реакции и критерии оценки бронхиального древа для оценки гистологических изменений в легких.

Баллы	Критерии оценки воспалительной реакции	Критерии оценки бронхиального древа
1	появление лейкоцитов в межальвеолярных перегородках	увеличение количества макрофагов в просвете бронхов
2	единичные периваскулярные скопления лейкоцитов	слущивание бронхиального эпителия
3	массивная периваскулярная инфильтрация и инфильтрация стенок бронхов	тонкие гиалиновые мембраны в просвете бронхов и бронхиол
4	массивная периваскулярная инфильтрация с тяжами воспалительного инфильтрата	появление белкового экссудата и/или крупных скоплений макрофагов с постклеточными структурами в просвете бронхов
5	крупные очаги сегментоядерных лейкоцитов с кровоизлияниями	ярко-выраженное сужение просвета бронхиол с накоплением в них белкового экссудата и уплотнением перибронхиолярной ткани

С помощью данной системы оценки была показана существенная разница между образцами легких вакцинированных и контрольных животных. В легких вакцинированных животных детектировали более низкие уровни повреждений легочной ткани и воспалительной реакции в сравнении с легкими контрольных животных (рисунок 22).

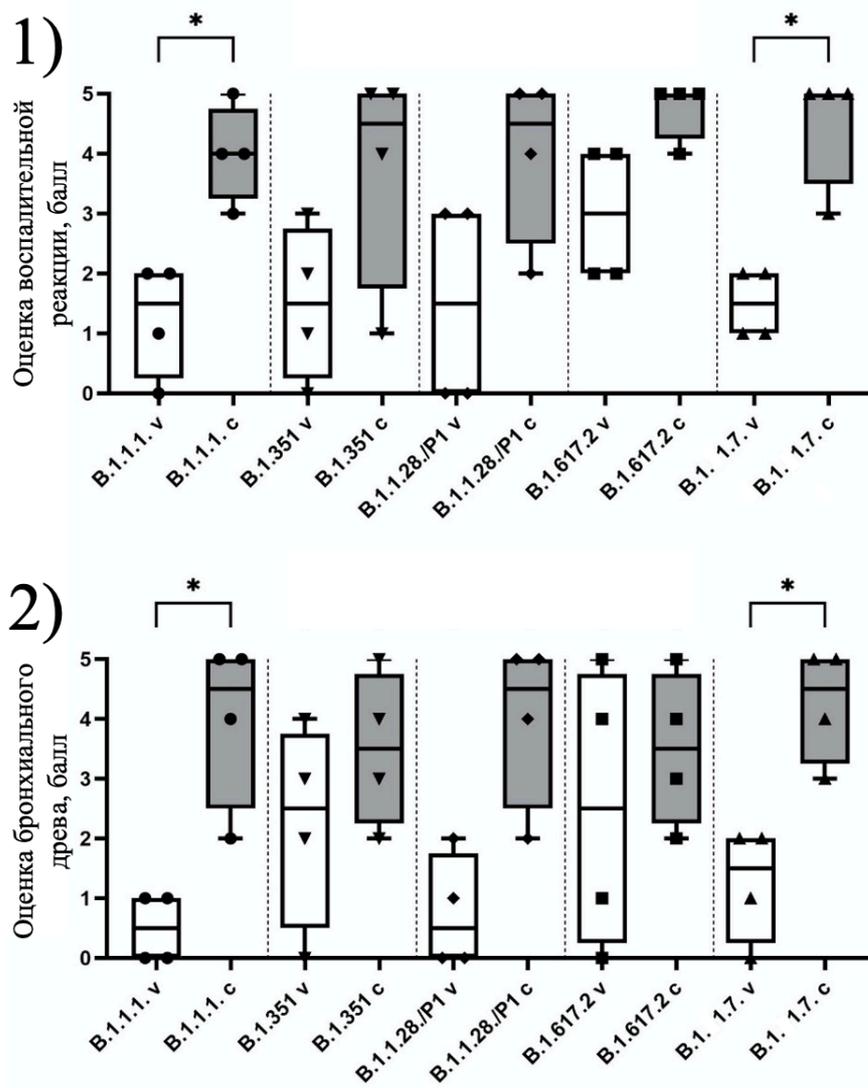


Рисунок 22 – 1) график, отражающий степень воспаления в лёгких мышей; 2) график, отражающий характер патологических изменений бронхов и бронхиол на гистологических срезах лёгких. Белыми блоками отмечены вакцинированные Гам-КОВИД-Вак животные, серыми – контрольные невакцинированные животные.

Анализ динамики массы тела не показал потери массы тела в вакцинированной группе 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 23). Предварительная иммунизация Гам-КОВИД-Вак позволила обеспечить полную 100% защиту вакцинированных hACE2-трансгенных мышей от заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантами B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28./P1 и B.1.617.2 (рисунок 23).

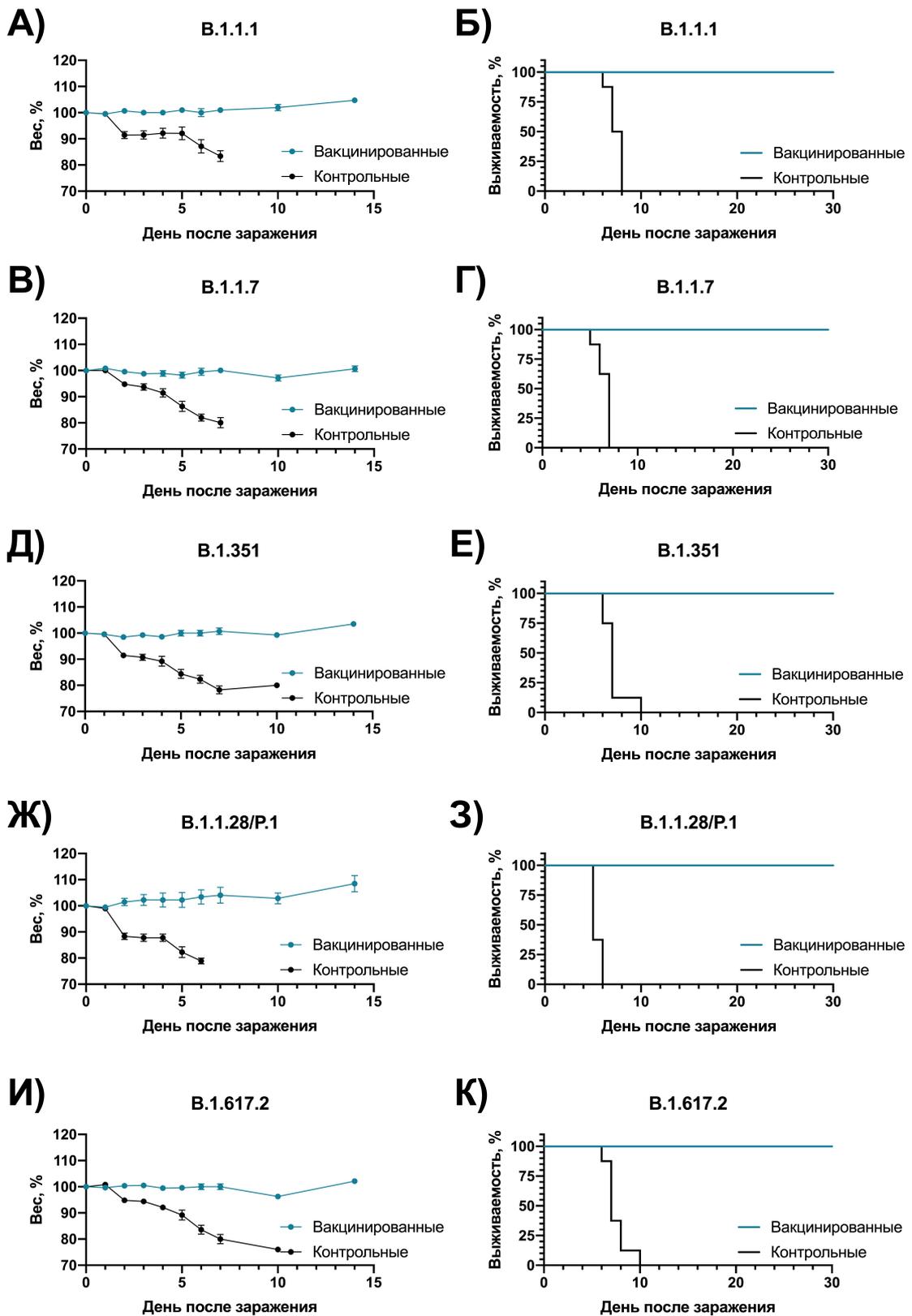


Рисунок 23 – Изменение массы тела (среднее \pm стандартная ошибка среднего) (А, В, Д, Ж, И) и выживаемость (%) (Б, Г, Е, З, К) в группах вакцинированных и контрольных животных после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантами В.1.1.1, В.1.1.7, В.1.351, В.1.1.28/P.1 и В.1.617.2, соответственно.

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.

3.5 Адаптация модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей для исследования протективной эффективности в отношении вируса SARS-CoV-2 вариант Омикрон B.1.1.529

При появлении в России варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2, одной из первоочередных задач было определение эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак на модели инфекции, вызванной вариантом Омикрон вируса SARS-CoV-2, у животных. В предварительных исследованиях было показано, что заражение hACE2-трансгенных мышей вариантом Омикрон BA.1 вируса SARS-CoV-2 не приводит к развитию клинической картины инфекции: отсутствует снижение веса животных (рисунок 24), отсутствует специфическая гибель животных.

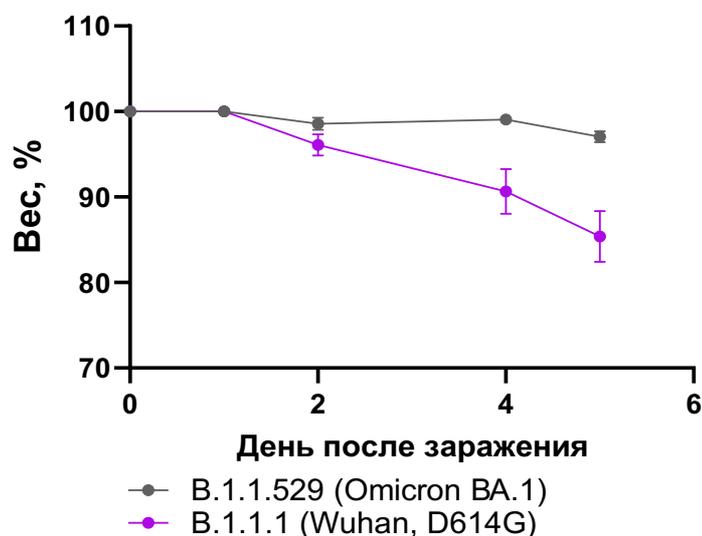


Рисунок 24 – Изменение массы тела hACE2-трансгенных мышей, зараженных вирусом SARS-CoV-2 вариантами B.1.1.1 и B.1.1.529 BA.1 (Омикрон) (n=5).

При макроскопическом анализе легких зараженных животных отсутствуют повреждения органа (рисунок 25), характерные для предшествующих вариантов вируса SARS-CoV-2 (Ухань, Альфа, Бета, Гамма и Дельта).

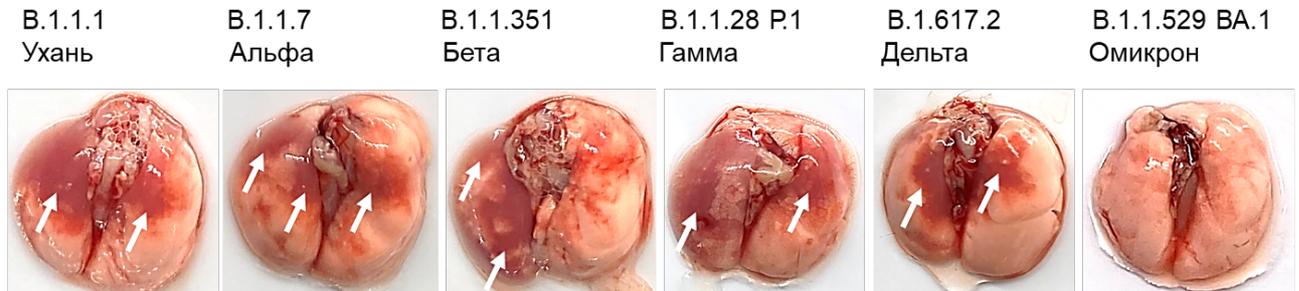


Рисунок 25 - Фотографии легких hACE2-трансгенных мышей через 4 дня после заражения вирусом SARS-CoV-2 различных вариантов. Стрелками указаны значительные зоны поражения легких.

Исходный вариант Омикрон BA.1 вируса SARS-CoV-2 обладает значительно меньшей патогенностью для моделей COVID-19 у животных, что в последующем было неоднократно показано в исследованиях [Halfmann P.J. и др., 2022; Zhang Y.N. и др., 2022; Abdelnabi R. и др., 2022], поэтому нами была модифицирована модель COVID-19 под вариант Омикрон.

hACE2-трансгенных мышей заражали двукратно вирусом SARS-CoV-2 вариант В.1.1.529 Омикрон BA.1 с интервалом в 24 часа. Через 3 дня после заражения у животных извлекали легкие для определения возможных возникших повреждений. Полученные результаты представлены на рисунке 26.

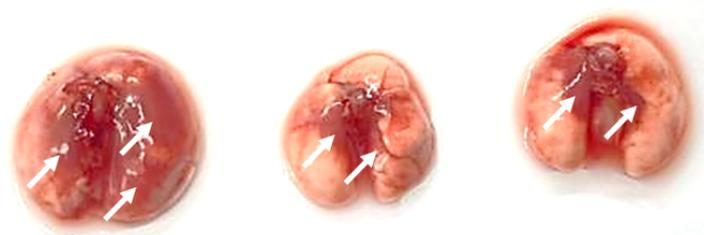


Рисунок 26 - Фотографии легких hACE2-трансгенных мышей через 3 дня после двукратного заражения вирусом SARS-CoV-2 вариант В.1.1.529 Омикрон BA.1. Стрелками указаны значительные зоны поражения легких.

Установлено, что двукратное заражение hACE2-трансгенных мышей вирусом SARS-CoV-2 вариант B.1.1.529 Омикрон BA.1 приводило к появлению значительных зон поражения в легких зараженных животных.

Анализ патогенности вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон сублиний BA.2 и BA.5 для hACE2-трансгенных мышей показал, что данные варианты вируса патогенны для трансгенных животных. В легких животных, зараженных однократно, детектировали вирус-специфические повреждения легочной ткани, а также клинические признаки инфекции у животных: снижение массы тела после заражения и гибель животных. При анализе вирусной нагрузки в легких животных через 4 дня после заражения сублиниями BA.2 И BA.5 методом ПЦР было детектировано 8,34 и 10,91 ГЭ/мл, соответственно (рисунок 27).

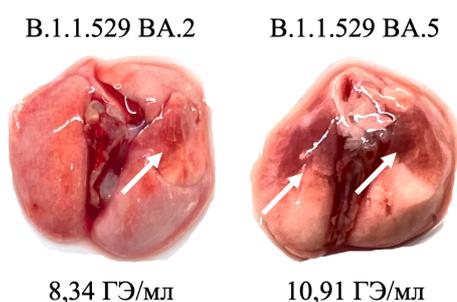


Рисунок 27 - Фотографии легких hACE2-трансгенных мышей через 4 дня после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта Омикрон сублиний BA.2 и BA.5. Стрелками указаны значительные зоны поражения легких. Под изображением легких указана средняя вирусная нагрузка в ткани в ГЭ на мл гомогената.

3.6 Исследование протективной эффективности различных антигенных вариантов вакцины Гам-КОВИД-Вак на моделях COVID-19 у лабораторных животных

3.6.1 Исследование протективной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак Дельта на модели COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей

Исследование проводили на модели летальной инфекции у hACE2-трансгенных мышей. Животные были поделены на 6 групп, согласно дизайну эксперимента. Дизайн исследования представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Дизайн исследования протективной эффективности обновленной версии вакцины Гам-КОВИД-Вак Дельта.

Группа	Кол-во животных	Доза вируса SARS-CoV-2	Ожидаемый эффект
Вакцина Гам-КОВИД-Вак	10	B.1.1.1, 10 ⁵ TCID ₅₀	Летальность в группе вакцинированных животных – не более 50%.
Вакцина Гам-КОВИД-Вак	10	B.1.617.2, 10 ⁵ TCID ₅₀	
Вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта	10	B.1.1.1, 10 ⁵ TCID ₅₀	
Вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта	10	B.1.617.2, 10 ⁵ TCID ₅₀	
Контроль	10	B.1.1.1, 10 ⁵ TCID ₅₀	Летальность в группе
Контроль	8	B.1.617.2, 10 ⁵ TCID ₅₀	контрольных животных – 100%.

Мышей вакцинировали двукратно с интервалом в 21 день, через 7 дней после второй дозы вакцины животных заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 вариантами B.1.1.1 (Ухань, D614G) и B.1.617.2 (Дельта). После заражения за животными наблюдали в течение 30 дней.

Результаты оценки выживаемости животных после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантами B.1.1.1 и B.1.617.2 представлены на рисунке 28.

В контрольной группе животных, зараженных вирусом SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1, гибель всех животных была зафиксирована к 10 суткам после заражения. В контрольной группе животных, зараженных вирусом SARS-CoV-2 вариант B.1.617.2, гибель всех животных была зафиксирована к 11 суткам после заражения. Летальность в группах вакцинированных животных, зараженных вирусом SARS-CoV-2 вариантами B.1.1.1 и B.1.617.2, отсутствовала на протяжении всего периода наблюдения.

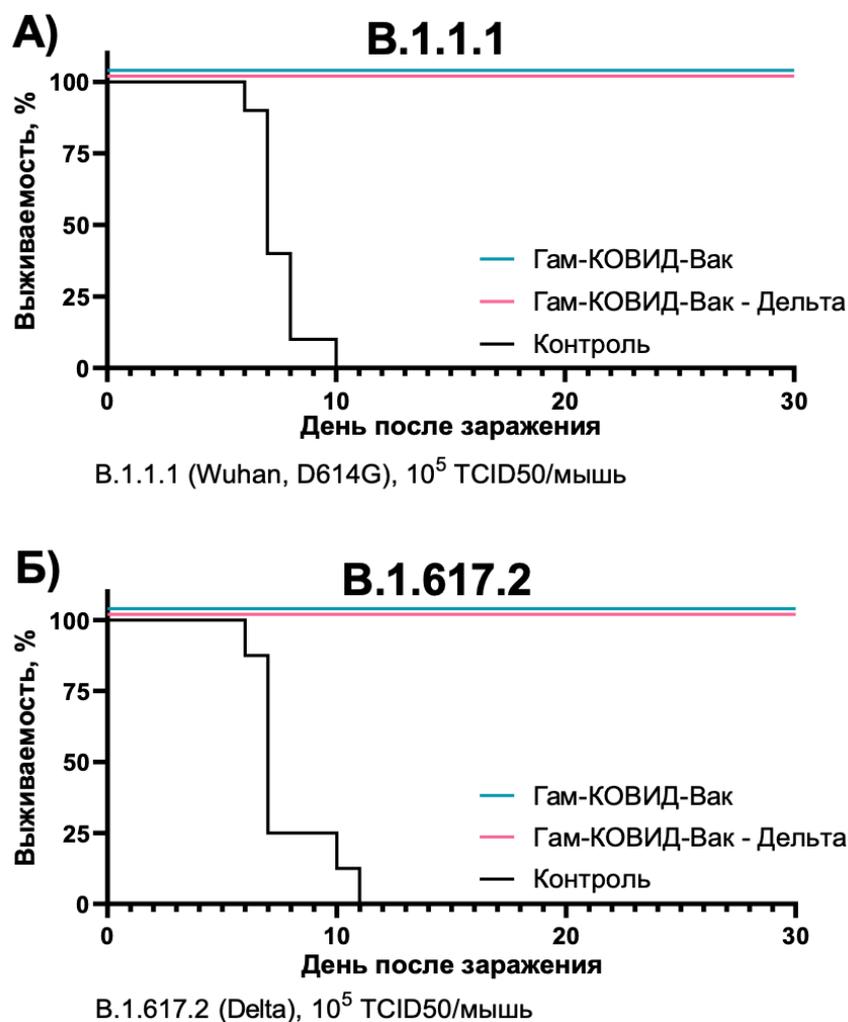


Рисунок 28 - Выживаемость животных, вакцинированных различными вариантами Гам-КОВИД-Вак, и контрольных групп после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантами B.1.1.1 (А) и B.1.617.2 (Б).

По результатам проведенного исследования было показано, что оба варианта вакцины (исходный вариант и вариант Дельта) позволяют защитить 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантами В.1.1.1 и В.1.617.2, у hACE2-трансгенных мышей.

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

Вакцина Гам-КОВИД-Вак была актуализирована под варианты вируса SARS-CoV-2 Дельта и Омикрон. Проведено исследование протективной эффективности исходного варианта вакцины, а также вариантов вакцины Дельта, Омикрон и Дельта-Омикрон в отношении исходного варианта вируса Ухань и трех сублиний варианта Омикрон – ВА.1, ВА.2 и ВА.5.

На первом этапе проводили вакцинацию животных разными антигенными вариантами вакцины 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 29.

По результатам проведенного исследования было показано, что вакцинация животных всеми исследуемыми вариантами вакцины позволяет индуцировать формирование вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. Стоит обратить внимание, что 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. Например, вакцинация животных препаратами Гам-КОВИД-Вак Ухань и Гам-КОВИД-Вак Дельта приводит к формированию ВНА в высоком титре к вариантам Ухань и Дельта вируса SARS-CoV-2, но наблюдается значительное снижение уровня ВНА к варианту Омикрон вируса SARS-CoV-2. В то же время вакцинация животных препаратом Гам-КОВИД-Вак Омикрон приводит к

формированию ВНА в высоком титре к варианту Омикрон вируса SARS-CoV-2, но наблюдается значительное снижение уровня ВНА к вариантам Ухань и Дельта вируса SARS-CoV-2. 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 29).

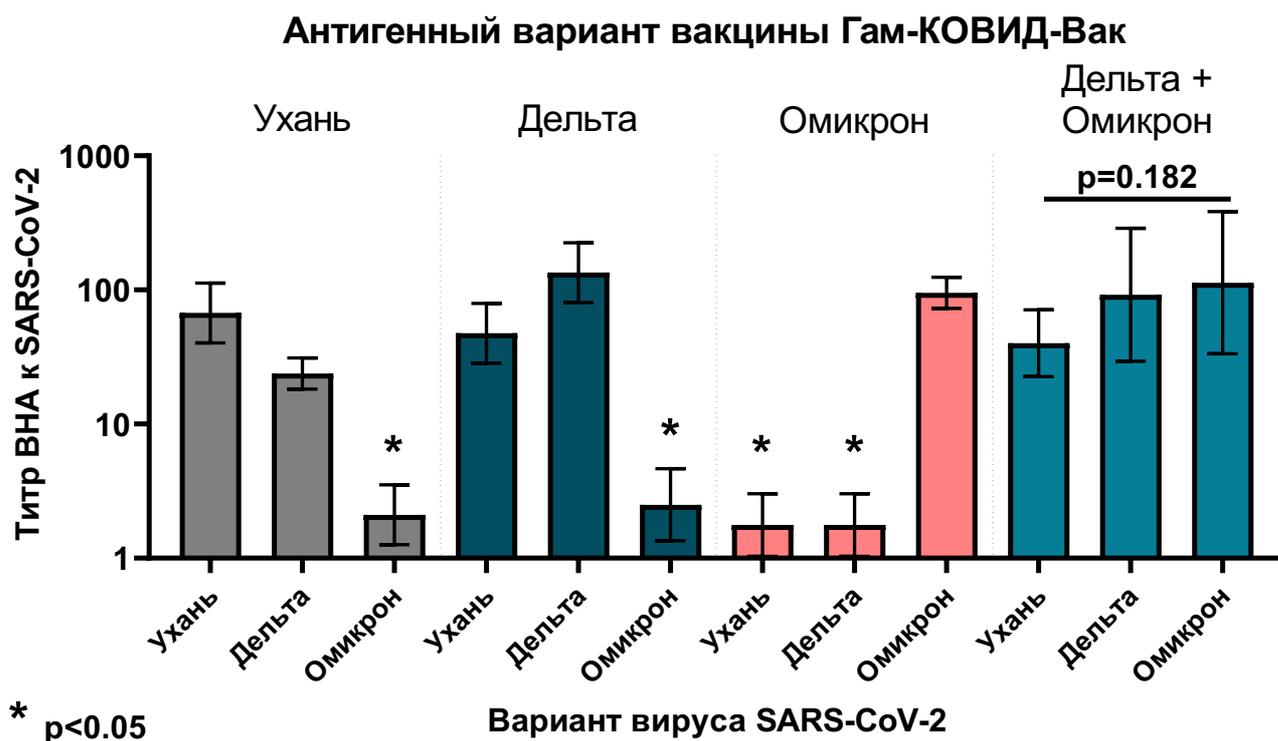


Рисунок 29 - Уровни вируснейтрализующих к различным вариантам вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови мышей, вакцинированных различными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак, через неделю после введения второй дозы вакцины. На рисунке отмечено среднее геометрическое титра ВНА, 95% доверительный интервал, уровни значимости p (критерий Вилкоксона).

На следующем этапе проводили исследование эффективности вакцины на модели инфекции с использованием hACE2-трансгенных мышей. В таблице 7 приведено описание используемой модели в зависимости от варианта вируса SARS-CoV-2. Поскольку вариант Омикрон BA.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.

Таблица 7 – Описание используемой модели инфекции, вызванной различными вариантами вируса SARS-CoV-2, у hACE2-трансгенных мышей.

Вариант SARS-CoV-2	Описание модели инфекции	Критерий оценки эффективности препарата
Ухань	Летальная	Снижение вирусной нагрузки в легких на 2 и более lg. Снижение летальности в группе вакцинированных животных на 50% и более. Снижение тяжести течения инфекции (вес).
Омикрон ВА.1	Нелетальная	Снижение вирусной нагрузки в легких на 2 и более lg.
Омикрон ВА.2	Летальная	Снижение вирусной нагрузки в легких на 2 и более lg. Снижение летальности в группе вакцинированных животных на 50% и более. Снижение тяжести течения инфекции (вес).
Омикрон ВА.5	Сублетальная	Снижение вирусной нагрузки в легких на 2 и более lg. Снижение летальности в группе вакцинированных животных на 50% и более. Снижение тяжести течения инфекции (вес).

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 8.

Таблица 8 – 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 BA.1 и BA.2, в легких не определяется инфекционно-активный вирус. В то же время у животных, зараженных вирусом SARS-CoV-2 вариант Омикрон BA.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 BA.2 и BA.5, в то время как у контрольных животных масса тела значительно снижается после заражения (рисунок 30). Так, у животных вакцинированных групп отсутствовала отрицательная динамика изменения массы тела после заражения вирусом SARS-CoV-2.

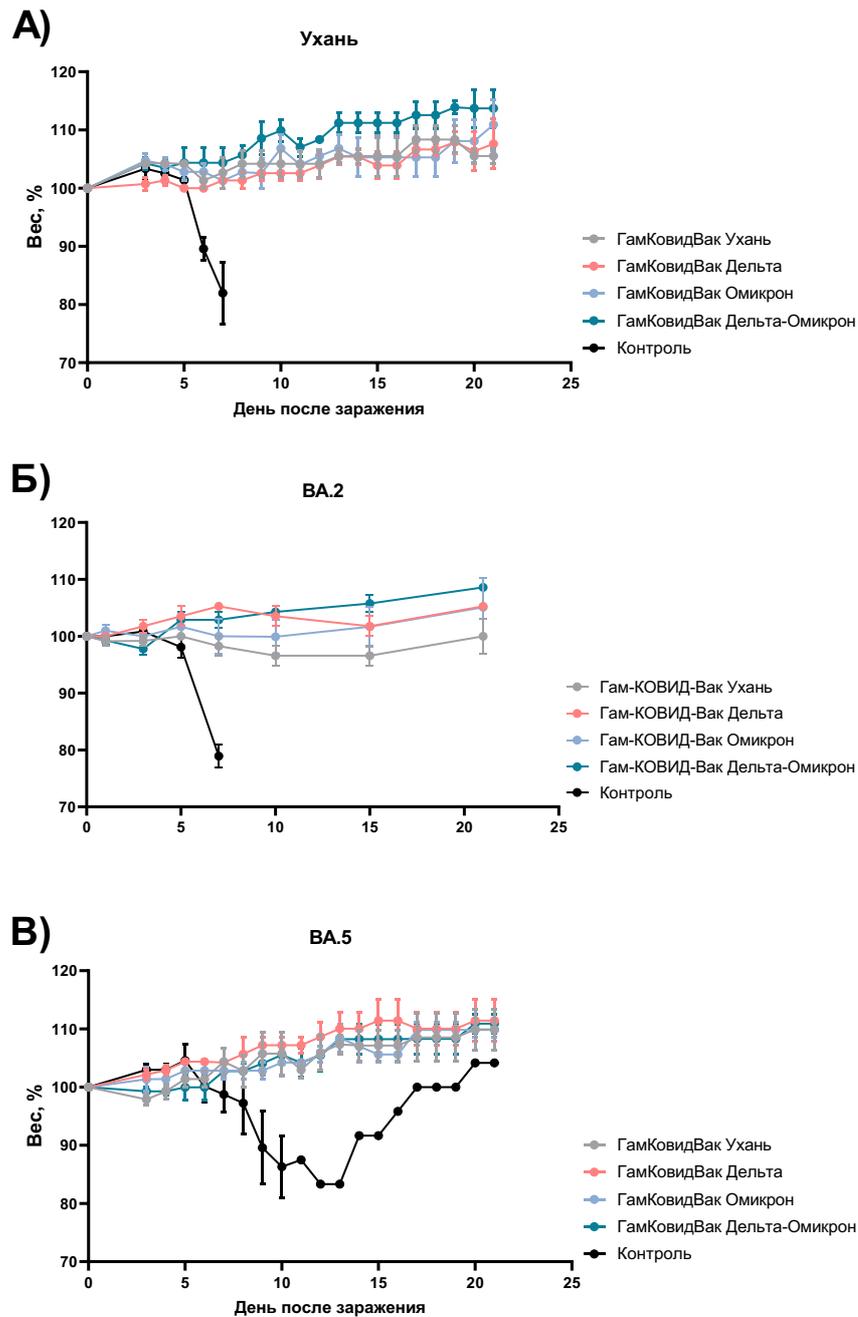


Рисунок 30 - Изменение массы тела животных, вакцинированных различными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак, и контрольных групп после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантом Ухань (А), Омикрон ВА.2 (Б), Омикрон ВА.5 (В). На рисунке представлено среднее \pm SEM значение веса животных по группе.

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 31), что свидетельствует об эффективности препаратов.

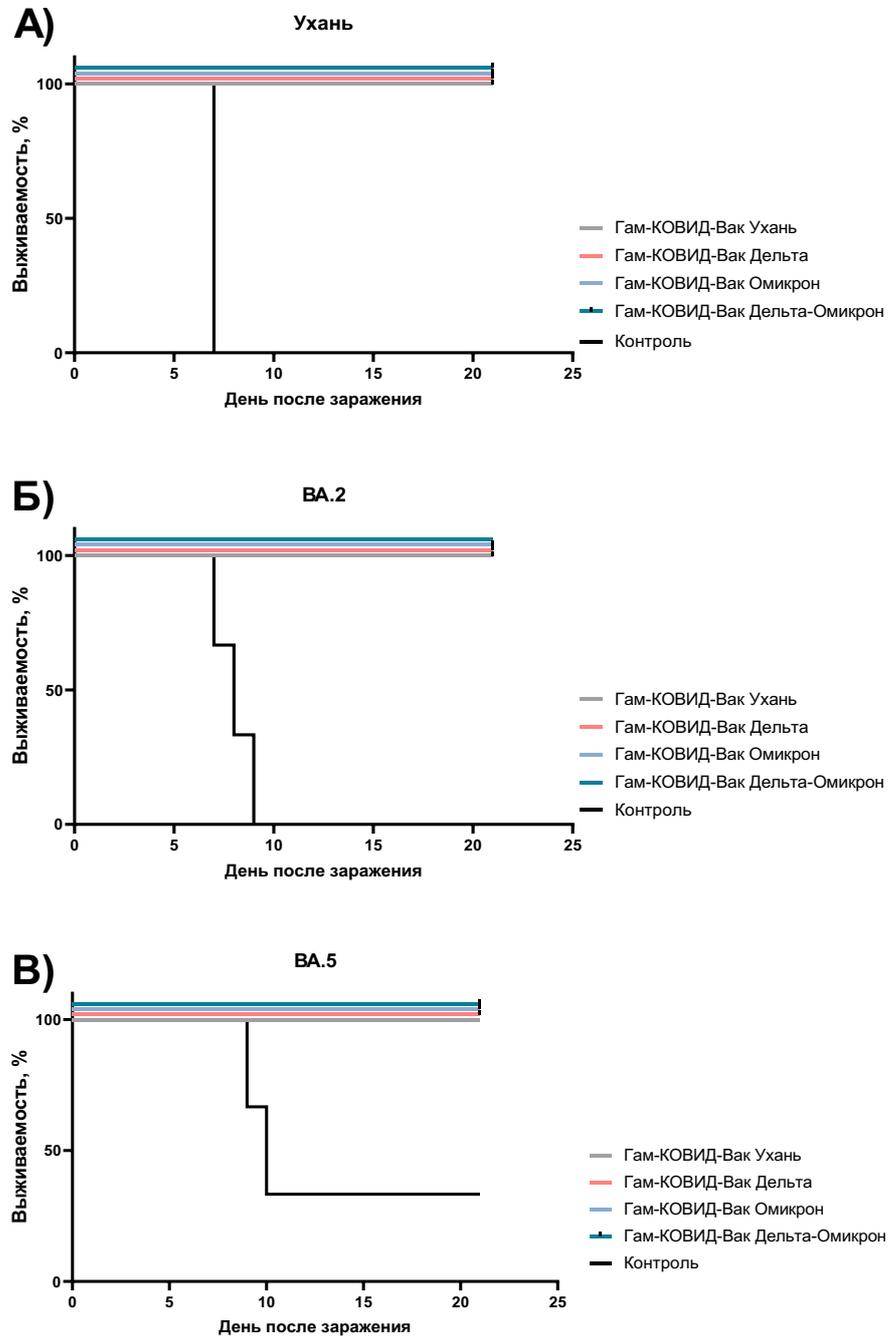


Рисунок 31 - Выживаемость животных, вакцинированных различными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак, и контрольных групп после заражения вирусом SARS-CoV-2 вариантом Ухань (А), Омикрон BA.2 (Б), Омикрон BA.5 (В).

3.6.3 Исследование протективной эффективности вакцин Гам-КОВИД-Вак Омикрон и Дельта-Омикрон на модели COVID-19 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией

Сирийских хомячков вакцинировали двукратно с интервалом в 21 день разными вариантами вакцины Гам-КОВИД-Вак (Ухань, Омикрон, Дельта-Омикрон), через неделю после второй дозы вакцины животным начинали вводить иммуносупрессанты – дексаметазон и циклофосфамид. Через неделю после начала введения иммуносупрессантов животных заражали интраназально вирусом SARS-CoV-2 вариант Омикрон BA.5 в дозе 3×10^5 TCID₅₀/хомяка. На 4 сутки после заражения животных подвергали эвтаназии для анализа вирусной нагрузки в легких. Результаты исследования вирусной нагрузки в 10% гомогенате легких представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Вирусная нагрузка в легких вакцинированных и контрольных сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией через 4 дня после заражения вирусом SARS-CoV-2 Омикрон BA.5.

Вариант вакцины	Вирусная нагрузка, среднее \pm SEM		Снижение вирусной нагрузки, lg	Уровень значимости p (t-тест)
	Вакцинированные	Контрольные		
Вирусная нагрузка, lg ГЭ/мл				
Ухань	8,60 \pm 0,39	9,96 \pm 0,23	1,36	0,04
Омикрон	8,86 \pm 0,12		1,10	0,01
Дельта-Омикрон	6,65 \pm 0,77		3,31	0,01
Вирусная нагрузка, lg TCID ₅₀ /мл				
Ухань	3,12 \pm 0,17	4,58 \pm 0,08	1,42	<0,01
Омикрон	2,67 \pm 0,17		1,92	<0,01
Дельта-Омикрон	1,33 \pm 0,68		3,25	<0,01

По результатам проведенного исследования показано, что у вакцинированных животных в легких определяется достоверно более низкий

уровень вирусной нагрузки, чем у контрольных животных. При этом, наибольшее снижение (более 3 lg как при анализе геномных эквивалентов, так и при анализе инфекционно-активного вируса) детектируется у животных, получивших вакцину Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана первая зарегистрированная вакцина для профилактики COVID-19 – вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V). В состав вакцины входят два рекомбинантных аденовируса человека 26 и 5 серотипов, несущих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (компонент 1 и компонент 2, соответственно), для гетерологичной «прайм-буст» вакцинации. Доклинические исследования показали, что вакцина безопасна, индуцирует выраженный гуморальный и клеточный иммунный ответ у грызунов и приматов, а также позволяет защитить 100% животных (сирийских хомячков и трансгенных мышей) от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. Высокая эффективность и безопасность позволили начать клинические испытания в России [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04436471; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04437875]. Также было проведено множество независимых исследований эффективности и безопасности вакцины Гам-КОВИД-Вак, продемонстрировавших высокую эффективность препарата (снижение заболеваемости и тяжести течения COVID-19) [Фельдблюм И.В. и др., 2023], хороший профиль безопасности и высокую иммуногенность [Pagotto V. и др., 2021; Montalti M. и др., 2021; Claro F. и др., 2021; Rossi A.H. и др., 2021; Gonzalez Lopez Ledesma M.M. и др., 2021; AlQahtani M. и др., 2021; Корсак Е.С. и др., 2023; Андреев И.В. и др., 2022; Платонова Т.А. и др., 2022; Плехова Н.Г. и др., 2022; Костин Н.Н. и др., 2022; Шаповалов К.Г. и др., 2021; Кириллов И.А. и др., 2022].

Вирус SARS-CoV-2 с момента проникновения в популяцию людей активно эволюционирует. Скорость эволюции SARS-CoV-2 с декабря 2019 года соответствовала тому, что вирус приобретал примерно две мутации в месяц [Duchene S. и др., 2020; Worobey M. и др., 2020]. В феврале 2020 года была обнаружена мутация, приводящая к замене D614G в гликопротеине S, которая стала доминирующей во всем мире. Исследования показали, что эта мутация усиливает связывание S-белка вируса с рецептором ACE2, тем самым повышая

инфекционную активность [Korber В. и др., 2020]. С момента появления замены D614G, в мире было описано несколько основных вариантов SARS-CoV-2 с новыми эпидемиологическими и клиническими особенностями. Эти варианты названы по разным номенклатурным системам, но общепринятой является система Всемирной организации здравоохранения. Согласно системе ВОЗ, варианты делятся на следующие группы: вариант, вызывающий интерес (ВВИ), вариант, вызывающий обеспокоенность (ВВО), и вариант, находящийся под наблюдением (ВНК).

Распространение новых вариантов вируса SARS-CoV-2 привело к снижению эпидемиологической эффективности вакцин по всему миру. Результаты мета-анализа эпидемиологической эффективности вакцинации представлены в таблице 10. В отношении варианта Альфа эффективность в защите от заболевания составляла более 86%, в отношении вариантов Бета, Гамма и Дельта – более 70%, а уже в отношении первых сублиний варианта Омикрон эффективность снизилась до 23%. При этом стоит отметить, что введение бустерных доз вакцин позволило повысить эффективность вакцинации в отношении варианта Омикрон до 57%. Несмотря на снижение эффективности в отношении заболеваемости, защита от тяжелого течения заболевания и от COVID-ассоциированных летальных исходов сохранялась на высоком уровне в период распространения всех вариантов [Shao W. и др., 2022].

Критически важным оказалось проводить своевременную оценку эффективности вакцин против COVID-19 в отношении различных появляющихся вариантов вируса SARS-CoV-2. Оценку эпидемиологической эффективности вакцин проводят в ходе длительных клинических исследований или в ходе ретроспективного анализа, что не позволяет использовать данный метод для своевременного обновления антигенного состава вакцин. Для принятия решения о смене антигенного состава необходимо разрабатывать подходы для оценки эффективности вакцины в лабораторных условиях за короткие сроки.

Таблица 10 - Результаты метаанализа эпидемиологической эффективности вакцин по всему миру [Shao W. и др., 2022].

ВВО SARS-CoV-2	Эффективность вакцинации, %			
	Заболела- емость	Госпитали- зации	Необходимость реанимации и интенсивной терапии	Летальный исход
Альфа	86,8	90,4	96	94,2
Бета	72,8	н/д	н/д	н/д
Гамма	71,9	78,4	н/д	82,2
Дельта*	70,9 / 93,3	84,9 / 92,8	88,2 / 93,8	90,3 / н/д
Омикрон*	23,5 / 57,6	56,5 / 83,4	77,6 / 95,5	82,4 / 94,9

*2 дозы вакцины / 3 и более дозы вакцины

Способность существующих вакцин обеспечивать защитный иммунный ответ против вызывающих беспокойство вариантов SARS-CoV-2 является крайне актуальным вопросом сегодня, когда варианты вируса широко распространились по миру и практически полностью вытеснили исходные варианты вируса SARS-CoV-2 [NextStrain. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with global subsampling, 2024]. Однако в настоящее время недостаточно данных о протективности вакцин на моделях инфекции у животных.

На сегодняшний день разработан ряд вакцин на основе мРНК против новых вариантов SARS-CoV-2, которые находятся на стадии доклинических исследований протективности и клинических исследований [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04785144, NCT04405076, NCT05289037, NCT04927065, NCT04889209].

Способность индуцировать выработку нейтрализующих антител у мышей исследовали для вакцин mRNA-1273.351 (на основе гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 вариант Бета) и mRNA-1273.211 (1:1 mRNA-1273 (Ухань) и mRNA-1273.351 (Бета)). По предварительным данным, вакцинация модифицированными вакцинами (Бета и Ухань-Бета) стимулирует формирование более высоких титров

вируснейтрализующих антител по сравнению с использованием классической версии вакцины mRNA-1273 (Ухань) [Wu K. и др., 2021]. Первоначальная версия вакцины mRNA-1273 показала частичный протективный эффект на модели острой легочной инфекции у мышей с использованием вируса SARS-CoV-2 вариант Бета, адаптированного к животным [DiPiazza A.T. и др., 2021].

Интраназальная вакцина ChAd-SARS-CoV-2-S индуцирует устойчивый иммунный ответ против вариантов B.1.351, B.1.1.28 и B.1.617.1 у мышей BALB/c. Показано, что через 9 месяцев после вакцинации сыворотки животных сохраняют нейтрализующую активность в отношении вариантов SARS-CoV-2. Для создания модели летальной инфекции мышам интраназально вводили Nu-Ad5-hACE2 и стимулировали эктопическую экспрессию hACE2 за 5 дней до сбора сыворотки и инфицирования SARS-CoV-2 (100 и 200 дней после иммунизации). На 100 день у вакцинированных мышей не определялась вирусная нагрузка при интраназальном заражении. На 200 день вирусная нагрузка у иммунизированных мышей была значительно снижена по сравнению с контролем [Hassan A.O. и др., 2021].

Протективность вакцины на основе рекомбинантного лентивирусного вектора исследовали в отношении SARS-CoV-2 вариант Ухань (B.1.1.1) и вариант Гамма (B.1.1.28/P1). Для создания модели летальной инфекции были получены трансгенные мыши B6.K18-hACE2IP-TH с высокой перmissивностью к вирусу, в том числе в тканях головного мозга. Мышей иммунизировали дважды на 0 и 5 неделе эксперимента, на 7 неделе мышей заражали $0,3 \times 10^5$ TCID₅₀ SARS-CoV-2 вариант Ухань (B.1.1.1) и вариант Гамма (B.1.1.28/P1). Вакцина обеспечивала отсутствие увеличения вирусной нагрузки у вакцинированных мышей в отношении варианта Гамма в сравнении с вариантом Бета, а также сохранение нейтрализующей активности сывороток к двум вариантам вируса в реакции нейтрализации псевдовироионов [Ku M.W. и др., 2021].

Вакцина на основе вирусоподобных частиц защищала мышей линии BALB/c от адаптированного к мышам SARS-CoV-2 в дозе 10^5 БОЕ. Сыворотка мышей показала нейтрализующую активность против вариантов B.1.1.28/P1, B.1.351 и B.1.1.7 в реакции нейтрализации псевдовироионов [Geng Q. и др., 2021].

На сегодняшний день большая часть данных о протективности существующих вакцин и вакцин-кандидатов была получена с использованием SARS-CoV-2 вариант Ухань [DiPiazza A.T. и др., 2021; Geng Q. и др., 2021; Matchett W.E. и др., 2021; Pan X. и др., 2021; Hassan A.O. и др., 2020; Tian J.H. и др., 2021; Ji R.R. и др., 2021; Lambe T. и др., 2021; Xu K. и др., 2021]. Было показано, что ряд вакцин способен индуцировать формирование защитных титров нейтрализующих антител против вариантов вируса SARS-CoV-2, вызывающих обеспокоенность [Hassan A.O. и др., 2021; Sun W. и др., 2021; Jangra S. и др., 2021]. Для ряда вакцин протективное действие было исследовано на различных животных моделях – приматах, хорьках, хомячках [Matchett W.E. и др., 2021; Lambe T. и др., 2021; Fischer R.J. и др., 2021; Chai K.M. и др. 2021; Kulkarni R. и др., 2021].

Имеющиеся данные о протективной эффективности вакцин против вариантов вируса SARS-CoV-2, вызывающих обеспокоенность, в моделях летальной инфекции у животных чаще включают новые/кандидатные вакцины, а не широко используемые в клинической практике. Исследования протективности недостаточно стандартизированы: используются разные животные модели, изоляты вируса и методики постановки реакции нейтрализации, а спектр исследуемых вариантов SARS-CoV-2 часто неполный. Это усложняет задачу сравнения защитной эффективности вакцин против вариантов SARS-CoV-2.

В ходе данного исследования была адаптирована летальная модель COVID-19 у сирийских хомячков с индуцированной иммуносупрессией. Было показано значительное снижение веса зараженных животных. Было показано, что на 4 и 7 дни после заражения наблюдаются обширные поражения легких. Выживаемость хомячков в такой модели составила 0%. Данная модель может быть использована для оценки эффективности препаратов для терапии и профилактики COVID-19. Данная модель имеет много преимуществ: доступность животных, простота манипуляций, воспроизводимость, однако при использовании данной модели необходимо учитывать, что введение иммуносупрессантов приводит к блокировке пролиферации и снижению количества Т- и В-клеток, снижению влияния Т-клеток

на В-клетки и торможению синтеза иммуноглобулинов, что является критичным для исследований препаратов, эффективность которых связана с индукцией клеточного звена иммунитета. Однако, при проведении исследований протективной эффективности с использованием данной модели инфекции возможно оценивать вклад именно гуморального иммунного ответа, который является крайне важным в защите от многих инфекций [Brocato R.L. и др., 2014].

Также в рамках исследования была адаптирована летальная модель COVID-19 у hACE2-трансгенных мышей линии C57BL/6 Tg(K18-ACE2)2Prlmn, полученных из The Jackson laboratory (США). Модель применима для таких вариантов вируса, как Ухань (В.1.1.1), Альфа (В.1.1.7), Бета (В.1.351), Гамма (В.1.1.28/Р.1), Дельта (В.1.617.2), Омикрон ВА.1 (В.1.1.529 ВА.1), Омикрон ВА.2 (В.1.1.529 ВА.2) и Омикрон ВА.5 (В.1.1.529 ВА.5). После заражения hACE2-трансгенных мышей вирусом SARS-CoV-2 наблюдаются обширные поражения легких. После заражения hACE2-трансгенных мышей вирусом SARS-CoV-2 вариантами Ухань (В.1.1.1), Альфа (В.1.1.7), Бета (В.1.351), Гамма (В.1.1.28/Р.1), Дельта (В.1.617.2) и Омикрон ВА.2 (В.1.1.529 ВА.2) также наблюдается необратимое снижение массы тела животных и 100% летальность. Данная модель может быть использована для оценки эффективности препаратов для терапии и профилактики COVID-19.

Поскольку вариант вируса SARS-CoV-2 вариант Омикрон ВА.1 (В.1.1.529 ВА.1) не вызывает клинической картины инфекции у hACE2-трансгенных мышей [Blanco-Melo D. и др., 2020], модель инфекции была адаптирована под данный вариант вируса. Мышей заражали двукратно вирусом SARS-CoV-2 вариант Омикрон ВА.1. Через 4 дня после заражения наблюдались обширные поражения легких у зараженных животных.

Появление новых вариантов вируса SARS-CoV-2 вызвало обеспокоенность мирового здравоохранения. В связи с этим необходимо было изучить эффективность зарегистрированной вакцины Гам-КОВИД-Вак против вируса SARS-CoV-2 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).

Оценка протективной эффективности вакцины первично в рамках лабораторного мониторинга проводится по двум направлениям: 1) анализ вируснейтрализующей активности сывороток вакцинированных, 2) анализ протективной активности вакцины на модели инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у лабораторных животных.

Вариант Альфа появился в сентябре 2020 года в Великобритании. По результатам анализа вируснейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев не было выявлено снижения нейтрализующей активности относительно варианта Ухань [Gushchin V.A. и др., 2021]. Исследования протективной эффективности Гам-КОВИД-Вак на модели лабораторных животных показали 100% защиту от летальной инфекции, вызванной вариантом Альфа.

Первые случаи заболевания, вызванного вариантом Бета, зарегистрированы в мае 2020 года в Южной Африке. По результатам анализа вируснейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев было детектировано снижение относительно варианта Ухань в 3,1 раз [Gushchin V.A. и др., 2021]. Исследования протективной эффективности Гам-КОВИД-Вак на модели лабораторных животных показали 100% защиту от летальной инфекции, вызванной вариантом Бета. Однако, в связи со снижением нейтрализующей активности вакцина Гам-КОВИД-Вак была адаптирована относительно варианта Бета. Был обновлен ген гликопротеина S, входящий в состав рекомбинантных вирусных векторов, с учетом мутаций. Такой вариант вакцины также показал 100% протективную эффективность как относительно исходного варианта Ухань, так и относительно гомологичного варианта Бета. Вариант Бета не получил широкого распространения, поэтому данный препарат был перемещен в резервный банк и не использовался в дальнейшем.

Вариант Гамма впервые был обнаружен в Бразилии в ноябре 2020 года. По результатам анализа вируснейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев было детектировано снижение относительно варианта Ухань в 2,8 раз [Gushchin V.A. и др., 2021]. Исследования протективной

эффективности Гам-КОВИД-Вак на модели лабораторных животных показали 100% защиту от летальной инфекции, вызванной вариантом Гамма. Было принято решение не создавать адаптированный вариант вакцины, поскольку не было выявлено значительного снижения уровня нейтрализующих антител, и вирус не получил широкого распространения.

Вариант Дельта появился в октябре 2020 года в Индии. По результатам анализа вируснейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев было детектировано снижение относительно варианта Ухань в 2,5 раз [Gushchin V.A. и др., 2021]. Исследования протективной эффективности Гам-КОВИД-Вак на модели лабораторных животных показали 100% защиту от летальной инфекции, вызванной вариантом Дельта. Однако, в связи широким распространением варианта Дельта вакцина Гам-КОВИД-Вак была актуализирована под этот вариант. Вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта показала 100% протективную эффективность как относительно исходного варианта Ухань, так и относительно гомологичного варианта Дельта.

В ноябре 2021 года появились первые сведения о новом варианте вируса SARS-CoV-2 - варианте Омикрон. Новый вариант за несколько недель полностью вытеснил вариант Дельта и стал доминирующим. По результатам анализа вируснейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев было детектировано снижение в отношении варианта Омикрон сублинии BA.1 в 8,29 и более раз [Lara D. и др., 2022; Dolzhikova I.V. и др., 2021], сублинии BA.2 – в 3,82 раза, сублинии BA.5 в 10,32 раза. Снижение нейтрализующей активности в отношении варианта Омикрон явилось основанием для актуализации вакцины к данному варианту - Гам-КОВИД-Вак Омикрон.

Вирус SARS-CoV-2 вариант Омикрон содержит более 60 несинонимичных замен нуклеотидов по сравнению с исходным вариантом. Обширный набор мутаций, послуживший причиной существенных функциональных и структурных различий между вариантом Омикрон и предыдущими вариантами, позволил группе ученых из Института Пастера (Франция) выделить два возможных серотипа вируса SARS-CoV-2 (рисунок 32). К первому серотипу отнесли исходный вариант и

варианты Альфа, Бета, Гамма и Дельта. Ко второму серотипу отнесли все сублинии варианта Омикрон [Simon-Loriere E., Schwartz O., 2022]. Поскольку существует вероятность возвращения вариантов из первого серотипа, а также появления новых вариантов, содержащих мутации, характерные как для первого, так и для второго серотипа, было принято решение разработать комбинированную адаптированную вакцину – Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон.

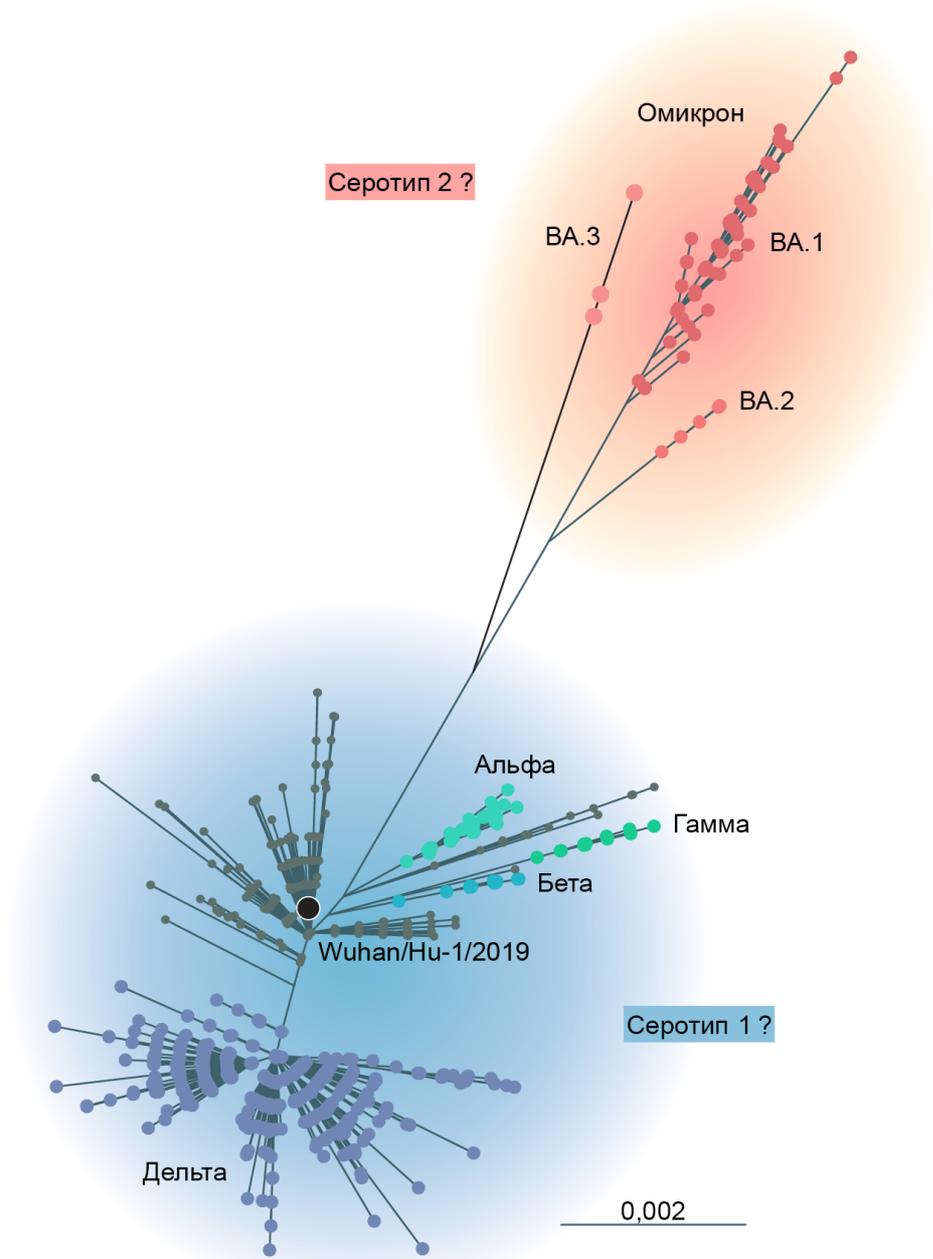


Рисунок 32 – Филогенетическое дерево вируса SARS-CoV-2, полученное с помощью анализа последовательностей гликопротеина S [Simon-Loriere E., Schwartz O., 2022].

Комбинированная вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон состоит из 2 компонентов: Компонент 1 на основе смеси двух рекомбинантных аденовирусных векторов 26 серотипа, несущих гены гликопротеинов S вируса SARS-CoV-2 вариантов Дельта и Омикрон BA.1; Компонент 2 на основе смеси двух рекомбинантных аденовирусных векторов 5 серотипа, несущих гены гликопротеинов S вируса SARS-CoV-2 вариантов Дельта и Омикрон BA.1. Исследование уровня вируснейтрализующих антител к разным вариантам вируса SARS-CoV-2 показало, что такая комбинированная вакцинация позволяет сформировать нейтрализующие антитела широкого спектра действия: дисперсионный анализ не выявил различий в уровне вируснейтрализующих антител в отношении разных наиболее актуальных вариантов вируса: Ухань, Дельта, Омикрон BA.1, Омикрон BA.2 и Омикрон BA.5.

Исследование протективной эффективности комбинированной вакцины Гам-КОВИД-Вак-Дельта-Омикрон показало, что вакцинация позволяет сформировать протективный иммунный ответ у животных, который защищает от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 актуального на момент анализа варианта Омикрон сублиний BA.1, BA.2 и BA.5. Ключевой заменой в гликопротеине S у варианта Омикрон сублинии BA.5 является L452R, такая же как в варианте Дельта. Таким образом, было показано, что комбинированная вакцина Гам-КОВИД-Вак Дельта-Омикрон позволяет сформировать протективный иммунный ответ против новых появляющихся вариантов вируса SARS-CoV-2, содержащих замены в гликопротеине S, характерные как для первого, так и для второго серотипов.

В связи с постоянной сменой доминирующих вариантов вируса SARS-CoV-2 необходимо было разработать универсальный метод, который поможет упростить исследования эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении новых вариантов вируса. Для этого нами был проведен анализ полученных данных по снижению уровня вируснейтрализующих антител к новым вариантам вируса в сыворотках крови вакцинированных добровольцев относительно исходного варианта и снижению вирусной нагрузки в легких вакцинированных животных,

зараженных новыми вариантами вируса, относительно контроля. В ходе анализа полученных в ходе работы данных, было показано, что при значительном снижении вируснейтрализующей активности (более, чем в 10 раз) сывороток крови добровольцев, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, в отношении новых вариантов вируса SARS-CoV-2, наблюдается также снижение протективной эффективности вакцины в рамках исследований у животных (таблица 11).

Таблица 11 – Эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак в различных экспериментальных моделях.

Вариант SARS-CoV-2	Лабораторный мониторинг		Эпидемиологическая эффективность	
	Снижение вирусной нагрузки в легких вакцинированных животных, lg TCID ₅₀	Снижение ВНА в сыворотке крови вакцинированных добровольцев, разы	Защита от заболевания, %	Защита от госпитализации, %
Ухань	5,25	1	91,6 ¹	100 ¹
Альфа	5,63	1,05		
Бета	4,13	3,1	85 ⁴	89 ⁴
Гамма	5,63	2,8		
Дельта	4,38	2,5	83 ²	94 ²
Омикрон ВА.1	3,67	9,62	54 ²	86-97 ³
Омикрон ВА.2	3,67	3,82	-	-
Омикрон ВА.5	0,72	10,32	44 ⁴	67 ⁴

¹ Logunov D.Y., и др., 2021;

² Гущин В.А., 2023;

³ Shkoda A.S., и др., 2022;

⁴ Stowe J., и др., 2022.

Таким образом, для варианта вируса SARS-CoV-2, в отношении которого детектируется значительное снижение уровня ВНА в сыворотке крови вакцинированных добровольцев (более 10 раз в сравнении с вариантом Ухань), мы видим существенное снижение эффективности вакцины у животных (снижение вирусной нагрузки в легких вакцинированных животных не достигает требуемых 2 lg).

Схожая тенденция наблюдается и по результатам анализа эпидемиологической эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак [Гущин В.А., 2023]. Так, при вакцинации двумя компонентами вакцины Гам-КОВИД-Вак людей старше 18 лет, эпидемиологическая эффективность при доминировании вариантов Ухань и Альфа составила 91%, при доминировании варианта Дельта – 83%, при доминировании варианта Омикрон – 54%. Эти данные соотносятся с результатами анализа нейтрализующих антител в сыворотках крови вакцинированных добровольцев, где мы видели снижение нейтрализации в отношении Омикрона ВА.1. В то же время анализ эффективности по показателю госпитализации при доминировании исходного варианта, а также вариантов Дельта и Омикрон первых сублиний (ВА.1 и ВА.2) показывает высокий уровень защиты от тяжелого течения COVID-19 среди вакцинированных. По всей видимости, результаты анализа эффективности у животных соотносятся с эффективностью вакцины в отношении госпитализации пациентов.

Отдельно стоит заметить, что для анализа уровня ВНА в сыворотке крови вакцинированных добровольцев требуется всего 5 дней, в то время как анализ протективной эффективности вакцины у животных занимает до 2 месяцев. Оба представленных исследования обязательно должны проводиться при анализе эффективности вакцины в отношении нового варианта вируса, однако предварительные данные о снижении нейтрализующей активности сывороток крови вакцинированных можно использовать для принятия решения о необходимости смены антигенного состава вакцины. Актуализация антигенного состава может быть проведена параллельно с исследованиями протективной эффективности исходной вакцины у животных в отношении нового варианта. В

случае, если в рамках исследования вакцины с исходным составом будет показано отсутствие эффективности в отношении нового варианта вируса, к моменту завершения исследований уже могут быть получены опытные серии вакцины с новым антигенным составом, что существенно сократит сроки исследования вакцины с новым составом и внедрения ее в гражданский оборот с целью защиты населения от COVID-19.

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 ВА.2. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак защищает 100% hACE2-трансгенных мышей от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантом Омикрон ВА.1. Показано, что вакцина Гам-КОВИД-Вак защищает 100% hACE2-трансгенных мышей от сублетальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 вариантом Омикрон ВА.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 ВА.1 – в 9,6 раз, ВА.2 – в 3,8 раза, ВА.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 ВА.1 и Омикрон ВА.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 ВА.1 и Омикрон ВА.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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АДФ - Аденозиндифосфат
- БВРС (MERS) – ближневосточный респираторный синдром
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ВВИ - варианты SARS-CoV-2, вызывающие интерес
- ВВО – варианты SARS-CoV-2, вызывающие обеспокоенность
- В.ч. – вирусная частица
- ВНА – вируснейтрализующие антитела
- ВНК – варианты SARS-CoV-2, находящиеся под контролем
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) – вакцина для профилактики COVID-19, разработанная в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ
- ГЭ – геномный эквивалент
- криоЭТ - криоэлектронная томография
- ЛД50 – 50% летальная доза
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- ОТ-ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- p - уровень значимости
- pH – водородный показатель
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СанПиН/СП – санитарные правила
- СРГЕОМ – среднее геометрическое
- ТОРС (SARS) – тяжелый острый респираторный синдром
- тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
- УСТ - усреднение субтомограмм
- ЦПД – цитопатическое действие

AAV-hACE2 - рекомбинантный аденоассоциированный вирус, несущий ген ACE2 человека

ACE2 - ангиотензин превращающий фермент 2

Ad5-hACE2 – рекомбинантный аденовирус человека 5 серотипа, несущий ген ACE2 человека

ANOVA – дисперсионный анализ (ANalysis Of Variance)

BSL-3 – уровень биологической безопасности 3 (Biosafety level 3)

CD - соединительный домен

CD147 (басигин) - мембранный белок, внеклеточная металлопротеиназа матрикса

COVID-19 - коронавирусная инфекция 2019

CPA - циклофосфамид

CTD – С-концевой домен

DEX - дексаметазон

DMEM - минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко

E – оболочечный белок

ER – эндоплазматический ретикулум

ERGIC - промежуточный компартмент эндоплазматический ретикулум-

Гольджи

EUA – разрешение на экстренное применение (emergency use authorization)

F1 - первое дочернее поколение потомства

FBS – фетальная бычья сыворотка

FDA - управление по контролю за продуктами и лекарствами

FP - слитый пептид

GISAID - Глобальная инициатива по обмену данными о птичьей гриппе (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data)

hACE2 - ангиотензин превращающий фермент 2 человека

HR1 - гептадный повтор 1

HR2 - гептадный повтор 2

LKR – линкерная область

- M – мембранный белок
- MERS-CoV – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома
- MERS-CoV – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома
- M_{pro} - основная протеаза
- N - нуклеокапсидный белок
- NLR - отношение нейтрофилов к лимфоцитам
- NP - нуклеопротеид
- Nsp – неструктурный белок
- NTD - N-концевой домен
- ORF – открытая рамка считывания
- PANGO - Филогенетическая принадлежность названных линий глобальных вспышек (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages)
- PLPro - папаиноподобная протеаза
- Pp – полипротеин
- rAd26-S-CoV-2 - рекомбинантный аденовирус человека 26 серотипа, несущий ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2
- rAd5-S-CoV-2 - рекомбинантный аденовирус человека 5 серотипа, несущий ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2
- RBD - рецептор-связывающий домен
- RdRp - РНК-зависимая РНК полимераз
- RNP-комплекс - рибонуклеопротеидный комплекс
- S - поверхностный гликопротеин Spike
- S1 – субъединица 1 гликопротеина S
- S2 – субъединица 2 гликопротеина S
- SARS-CoV – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома
- SARS-CoV-2 (2019-nCoV) – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2
- SEM – стандартная ошибка среднего
- SPF – статус животных без специфических патогенов (specific-pathogen-free)
- TCID₅₀ - 50% тканевая инфицирующая доза

TM – трансмембранный домен

TMPRSS2 - трансмембранная сериновая протеза 2

Vero E6 – клон культуры клеток эпителия почки зеленой африканской
мартышки

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авива П. Наглядная медицинская статистика. Учебное пособие. / П. Авива, С. Кэролайн // ГЭОТАР-Медиа, Москва, Россия. - 2015.
2. Андреев И.В. Поствакцинальный и постинфекционный гуморальный иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2. / И.В. Андреев, К.О. Нечай, А.И. Андреев [и др.]. // Иммунология. – 2022. - №43(1). – С.18–32.
3. ГОСТ Р 50258-92 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. М.: Издательство стандартов, 1992 год
4. Гущин В.А. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг и оценка эффективности средств специфической диагностики и вакцинопрофилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19). / Дис. докт. биол. наук. –2023.
5. Кириллов И.А. Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак. / И.А. Кириллов, А.П. Пирожков, В.В. Рубцов [и др.]. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. - №22(4). – С.435–445.
6. Ковыршина А.В. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. / А.В. Ковыршина, И.В. Должикова, Д.М. Гроусова [и др.]. // Иммунология. 2020; 41 (2): 135–143.– 2020. - №41(2). – С.135-143.
7. Корсак Е.С. Изучение гуморального иммунитета против коронавирусной инфекции COVID-19 у привитых вакцинами, доступными в Республике Беларусь (Спутник V (Gam-COVID-Vac), РФ и Sinopharm (BBIBP-CorV), КНР). / Е.С. Корсак, И.О. Стома, Е.В. Воропаев [и др.]. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2023. - №22(1). – С.28-37.
8. Костин Н.Н. ИФА-платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности. / Н.Н. Костин, Т.В. Бобик, Г.А. Скрыбин [и др.]. // Acta Naturae. – 2022. – Т.14. - №3(54). - С.109-119.

9. Платонова Т.А. Оценка специфического Т-клеточного иммунитета у переболевших и вакцинированных против COVID-19. / Т.А. Платонова, М.С. Скляр, А.А. Голубкова [и др.]. // Журнал инфектологии. – 2022. - №1(14). – С. 96-104.
10. Плехова Н.Г. Оценка специфического Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2 при коронавирусной инфекции COVID-19 и вакцинопрофилактике Гам-КОВИД-Вак. / Н.Г. Плехова, Т.А. Ситдикова, А.А. Дубий, А.О. Михайлов, Е.В. Просекова // Российский иммунологический журнал. - 2022. №3(25). - С. 267-274.
11. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Е. И. Асташкин, Е. Е. Ачкасов, К. В. Афонин [и др.]. – Москва : Профиль - 2С, 2010. – 358 с.
12. Унгурияну Т.Н. Краткие рекомендации по описанию, статистическому анализу и представлению данных в научных публикациях. / Т.Н. Унгурияну, А.М. Гржибовский // Экология человека. - 2011. - №5. - С.55-60.
13. Фельдблюм И.В. Профилактическая эффективность отечественных вакцин против новой коронавирусной инфекции при иммунизации сотрудников медицинских организаций. / И.В. Фельдблюм, Т.М. Репин, М.Ю. Девятков [и др.]. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2023. - №22(1). – С.22-27.
14. Шаповалов К.Г. Трехмесячные результаты вакцинации медработников моностанции препаратом «Гам-КОВИД-Вак». / К.Г. Шаповалов, А.В. Степанов, Ж.С. Бурдинская, М.В. Шакирьянова, О.М. Янченко // Иммунология. – 2021. - №42 (2). – С.125–130.
15. A Study to Evaluate the Immunogenicity and Safety of mRNA Vaccine Boosters for SARS-CoV-2 (COVID-19) Variants. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04927065. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04927065?term=mRNA-1273.211&city=&rank=1>
16. Abdelnabi R. The omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 variant of concern does not readily infect Syrian hamsters. / R. Abdelnabia, C.S. Foo, X. Zhang [и др.]. // Antiviral Research. - 2022. - №198. - С.105253.

17. Ahmad J. Structures of synthetic nanobody-SARS-CoV-2 receptor-binding domain complexes reveal distinct sites of interaction. / J. Ahmad, J. Jiang, L.F. Boyd [и др.]. // *J Biol Chem.* – 2021. - №297(101202).
18. Al-Jighefee H.T. COVID-19 Vaccine Platforms: Challenges and Safety Contemplations. / H.T. Al-Jighefee, H. Najjar, M.N. Ahmed, A.Qush, S. Awwad, L. Kamareddine // *Vaccines.* - 2021. - №9(10). - С.119.
19. AlQahtani M. Morbidity and mortality from COVID-19 post-vaccination breakthrough infections in association with vaccines and the emergence of variants in Bahrain. / M. AlQahtani, S. Bhattacharyya, A. Alawadi [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-828021/v1>
20. An Open Study of the Safety, Tolerability and Immunogenicity of "Gam-COVID-Vac Lyo" Vaccine Against COVID-19. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04437875. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04437875>
21. An Open Study of the Safety, Tolerability and Immunogenicity of the Drug "Gam-COVID-Vac" Vaccine Against COVID-19. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04436471. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04436471>
22. Baden L.R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. / L.R. Baden, H.M. El Sahly, B. Essink [и др.]. // *N Engl J Med.* – 2021. - №384(5). – С.403-416.
23. Banach B.B. Paired heavy- and light-chain signatures contribute to potent SARS-CoV-2 neutralization in public antibody responses. / B.B. Banach, G. Cerutti, A.S. Fahad [и др.]. // *Cell Rep.* – 2021. - №37(109771).
24. Bao L. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. / L. Bao, W. Deng, B. Huang [и др.]. // *Nature.* – 2020. - №583. – С.830–833.
25. Baranov P.V. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. / P.V. Baranov, C.M. Henderson, C.B. Anderson [и др.]. // *Virology.* – 2005. - №332. – С.498–510.

26. Barnes C.O. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. / C.O. Barnes, C.A. Jette, M.E. Abernathy [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №588 – С.682-687.
27. Barr I.G. SARS-CoV-2 does not replicate in embryonated hen's eggs or in MDCK cell lines. / I.G. Barr, C. Rynehart, P. Whitney, J. Druce // *Euro Surveill*. – 2020. - №25(25). – С. 2001122.
28. Blanco-Melo D. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. / D. Blanco-Melo, B.E. Nilsson-Payant, W.C. Liu [и др.]. // *Cell*. – 2020. - №181. – С.1036–1045,е9.
29. Bosco-Lauth A.M. Pathogenesis, transmission and response to re-exposure of SARS-CoV-2 in domestic cats. / A.M. Bosco-Lauth, A.E. Hartwig, S.M. Porter [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2020.05.28.120998>
30. Boudewijns R. STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. / R. Boudewijns, H.J. Thibaut, S.J.F. Kaptein [и др.]. // *Nat Commun*. - 2020. - №11(1). - С.5838.
31. Boumaza A. Monocytes and macrophages, targets of SARS-CoV-2: the clue for Covid-19 immunoparalysis. / A. Boumaza, L. Gay, S. Mezouar [и др.]. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – С.jiab044.
32. Brocato R.L. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome in immunosuppressed Syrian hamsters infected with Sin Nombre virus. / R.L. Brocato, C.D. Hammerbeck, T.M. Bell [и др.] // *J Virol*. – 2014. - №88(2). – С.811-819.
33. Cai Y. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. / Y. Cai, J. Zhang, T. Xiao [и др.]. // *Science*. – 2020. - №369. – С.1586-1592.
34. Casadevall A. The convalescent sera option for containing COVID-19. / A. Casadevall, L.A. Pirofski // *J Clin Invest*. – 2020. - №130(4). – С.1545-1548.
35. Cascella M. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Feb 5]. / M. Cascella, M. Rajnik, A. Aleem, S.C. Dulebohn, R. Di

Napoli // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

36. Cerutti G. Structural basis for accommodation of emerging B.1.351 and B.1.1.7 variants by two potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. / G. Cerutti, M. Rapp, Y. Guo [и др.]. // *Structure*. – 2021. - №29. – С.655-663, e654.

37. Claro F. Immunoglobulin G antibody response to the Sputnik V vaccine: previous SARS-CoV-2 seropositive individuals may need just one vaccine dose. / F. Claro, D. Silva, M. Rodriguez, H.R. Rangel, J.H. de Waard. // *Int J Infect Dis*. - 2021. - №111. - С.261-266.

38. Chai K.M. DNA vaccination induced protective immunity against SARS CoV-2 infection in hamsters. / K.M. Chai, T.T. Tzeng, K.Y. Shen [и др.]. // *PLoS Negl Trop Dis*. – 2021. - №15(5). – С.e0009374.

39. Chan J.F.W. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: Implications for disease pathogenesis and transmissibility. / J.F.W. Chan, A.J. Zhang, S. Yuan [и др.]. // *Clin. Infect. Dis*. - 2020.

40. Chandrashekar A. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. / A. Chandrashekar, J. Liu, A.J. Martinot [и др.]. // *Science*. – 2020. - №369. – С.812–817.

41. Chang C.K. Multiple nucleic acid binding sites and intrinsic disorder of severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein: implications for ribonucleocapsid protein packaging. / C.K. Chang, Y.L. Hsu, Y.H. Chang [и др.]. // *J Virol*. – 2009. – №83. – С.2255-2264.

42. Chen G. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. / G. Chen, D. Wu, W. Guo W [и др.]. // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2020. - №130(5). – С.2620–2629.

43. Chen J. Structural basis for helicase-polymerase coupling in the SARS-CoV-2 replication-transcription complex. / J. Chen, B. Malone, E. Llewellyn [и др.]. // *Cell*. – 2020. - №182. – С.1560-1573, e1513.

44. Codo A.C. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis. / A.C. Codo, G.G. Davanzo, L.B. Monteiro [и др.]. // *Cell Metabolism*. – 2020. - №32(3). – С.437–446 e435.
45. Corbett K.S. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. / K.S. Corbett, D.K. Edwards, S.R. Leist [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №586. – С.567-571.
46. Corman V.M. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. / V.M. Corman, O. Landt, M. Kaiser [и др.]. // *Euro Surveill*. – 2020. - №25(3). – С.2000045.
47. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses *Nature Microbiology*. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7095448>
48. COVID-19 Vaccine tracker. Approved vaccines. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/>
49. COVID-19 Variant Immunologic Landscape Trial (COVAIL Trial). *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT05289037. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05289037?term=mRNA-1273.351&city=&rank=3>
50. Dejnirattisai W. The antigenic anatomy of SARS-CoV-2 receptor binding domain. / W. Dejnirattisai, D. Zhou, H.M. Ginn [и др.]. // *Cell*. – 2021. – №184. – С.2183-2200, e2122.
51. Delayed Heterologous SARS-CoV-2 Vaccine Dosing (Boost) After Receipt of EUA Vaccines. *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT04889209. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04889209?term=mRNA-1273.211&city=&rank=2>
52. Dhar Chowdhury S. Epidemiology of COVID-19. / S. Dhar Chowdhury, A.M. Oommen. // *Journal of Digestive Endoscopy*. – 2020. - №11(1). – С.3-7.

53. Dinno K.H. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. / K.H. Dinno, S.R. Leist, A. Schäfer [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №586. – С.560–566.
54. DiPiazza A.T. COVID-19 vaccine mRNA-1273 elicits a protective immune profile in mice that is not associated with vaccine-enhanced disease upon SARS-CoV-2 challenge. / A.T. DiPiazza, S.R. Leist, O.M. Abiona [и др.]. // *Immunity*. – 2021. - №54(8). – С.1869-1882,е6.
55. Dolzhikova I.V. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. / I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova, A.I. Tukhvatulin [и др.]. // *Hum Vaccin Immunother*. – 2017. - №13(3). – С. 613-620.
56. Dolzhikova I.V. Sputnik Light booster after Sputnik V vaccination induces robust neutralizing antibody response to B.1.1.529 (Omicron) SARS-CoV-2 variant. / I.V. Dolzhikova, A.A. Iliukhina, A.V. Kovyrshina [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2021.12.17.21267976>
57. Dose-Confirmation Study to Evaluate the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of mRNA-1273 COVID-19 Vaccine in Adults Aged 18 Years and Older. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04405076. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04405076?term=mRNA-1273.351&city=&rank=2>
58. Du S. Structurally resolved SARS-CoV-2 antibody shows high efficacy in severely infected hamsters and provides a potent cocktail pairing strategy. // S. Du, Y. Cao, Q. Zhu [и др.]. // *Cell*. – 2020. - №183. – С.1013-1023.е1013.
59. Duchene S. Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. / S. Duchene, L. Featherstone, M. Haritopoulou-Sinanidou [и др.]. // *Virus Evol*. – 2020. - №6(2). – С.veaa061.
60. Dunkle L.M. Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico. / L.M. Dunkle, K.L. Kotloff, C.L. Gay [и др.]. // *N Engl J Med*. – 2022. - №386(6). – С.531-543.

61. ECDC. Risk Related to Spread of New SARSCoV-2 Variants of Concern in the EU/EEA. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/COVID-19-risk-related-to-spread-of-new-SARS-CoV-2-variants-EU-EEA.pdf>
62. Enkirch T. Ferret models of viral pathogenesis. / T. Enkirch, V. von Messling // *Virology*. – 2015. - №479–480. – С.259–270.
63. Errico J.M. Structural mechanism of SARS-CoV-2 neutralization by two murine antibodies targeting the RBD. / J.M. Errico, H. Zhao, R.E. Chen [и др.]. // *Cell Rep*. – 2021. -№37(109881).
64. European Centre for Disease Prevention and Control. SARS-CoV-2 variants of concern as of 24 May 2021. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>
65. Faria N.R. Genomic Characterisation of an Emergent SARS-CoV-2 Lineage in Manaus: Preliminary Findings. / N.R. Faria, I.M. Claro, D. Candido [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586>
66. Finch C.L. Characteristic and quantifiable COVID-19-like abnormalities in CT- and PET/CT-imaged lungs of SARS-CoV-2-infected crab-eating macaques (*Macaca fascicularis*). / C.L. Finch, I. Crozier, J.H. Lee [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.096727>
67. Fischer F. Analysis of Constructed E Gene Mutants of Mouse Hepatitis Virus Confirms a Pivotal Role for E Protein in Coronavirus Assembly. / F. Fischer, C.F. Stegen, P.S. Masters, W.A. Samsonoff. // *J. Virol*. – 1998. - №72. – С.7885–7894.
68. Fischer R.J. ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) protects Syrian hamsters against SARS-CoV-2 B.1.351 and B.1.1.7. / R.J. Fischer, N. van Doremalen, D.R. Adney [и др.]. // *Nat Commun*. – 2021. - №12(1). – С.5868.
69. Frias-Staheli N. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. / N. Frias-Staheli, M. Dorner, S. Marukian [и др.]. // *J Virol*. – 2014. - №88. – С.2205–2218.

70. Frick D.N. Molecular basis for ADP-ribose binding to the Mac1 domain of SARS-CoV-2 nsp3. / D.N. Frick, R.S. Viridi, N. Vuksanovic, N. Dahal, N.R. Silvaggi. // *Biochemistry*. – 2020. – №59. – С.2608-2615.
71. Gao Y. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. / Y. Gao, L. Yan, Y. Huang [и др.]. // *Science*. – 2020. - №368. – С.779-782.
72. Gary E.N. A novel mouse AAV6 hACE2 transduction model of wild-type SARS-CoV-2 infection studied using synDNA immunogens. / E.N. Gary, B.M. Warner, E.M. Parzych [и др.]. // *iScience*. – 2021. - №24(7). – С.102699.
73. Geng Q. Novel virus-like nanoparticle vaccine effectively protects animal model from SARS-CoV-2 infection. / Q. Geng, W. Tai, V.K. Baxter [и др.]. // *PLoS Pathog*. – 2021. - №17(9). – С.e1009897.
74. Ghinai I. First known person-to-person transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in the USA. / I. Ghinai, T.D. McPherson, J.C. Hunter [и др.]. // *Lancet*. – 2020. - №395. – С.1137–1144.
75. Gonzalez Lopez Ledesma M.M. Temporal Increase in Neutralization Potency of SARS-CoV-2 Antibodies and Reduced Viral Variant Escape after Sputnik V Vaccination. / M.M. Gonzalez Lopez Ledesma, L. Sanchez, D.S. Ojeda [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2021.08.22.21262186>
76. Graña C. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. / C. Graña, L. Ghosn, T. Evrenoglou [и др.]. // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2022. - №12(12). – С. CD015477.
77. Gu H. Rapid adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice: novel mouse model for vaccine efficacy. / H. Gu, Q. Chen, G. Yang [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2020.05.02.073411>
78. Gu J. COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal–Oral Transmission. / J. Gu, B. Han, J. Wang. // *Gastroenterology*. - 2020.
79. Guo T. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). / T. Guo, Y. Fan, M. Chen [и др.]. // *JAMA Cardiol*. – 2020. - №5(7). – С.811-818.

80. Guo Z.D. Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020. // Z.D. Guo, Z.Y. Wang, S.F. Zhang [и др.]. // *Emerg Infect Dis.* – 2020. - №26(7). – С.1583-1591.
81. Gupta D. Structural and functional insights into the spike protein mutations of emerging SARS-CoV-2 variants. / D. Gupta, P. Sharma, M. Singh [и др.]. // *Cell Mol Life Sci.* - 2021. - №78(24). – С.7967–7989.
82. 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. / V.A. Gushchin, I.V. Dolzhikova, A.M. Shchetinin [и др.]. // *Vaccines (Basel).* – 2021. - №9(7). – С.779.
83. Halfmann P.J. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. / P.J. Halfmann, S. Iida, K. Iwatsuki-Horimoto [и др.]. // *Nature.* – 2022. - №603. – С.687–692.
84. Halfmann P.J. Transmission of SARS-CoV-2 in domestic cats. / P.J. Halfmann, M. Hatta, S. Chiba [и др.]. // *N Engl J Med.* – 2020. - №383(6). – С.592–594.
85. Han Y. The transmission and diagnosis of 2019 novel coronavirus infection disease (COVID-19): A Chinese perspective. / Y. Han, H. Yang. // *J. Med. Virol.* – 2020. - №92. – С.639–644.
86. Hassan A.O. A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies. / A.O. Hassan, J.B. Case, E.S. Winkler [и др.]. // *Cell.* - 2020. - №182. – С.744–753,e4.
87. Hassan A.O. A Single-Dose Intranasal ChAd Vaccine Protects Upper and Lower Respiratory Tracts against SARS-CoV-2. / A.O. Hassan, N.M. Kafai, I. P Dmitriev [и др.]. // *Cell.* – 2020. - №183(1). – С.169-184,e13.
88. Hassan A.O. An intranasal vaccine durably protects against SARS-CoV-2 variants in mice. / A.O. Hassan, S. Shrihari, M.J. Gorman [и др.]. // *Cell Rep.* – 2021. - №36(4). – С.109452.
89. Hoffmann M. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [и др.]. // *Cell.* – 2020. - №181. – С.271–280.

90. Hu D. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. / D. Hu, C. Zhu, L. Ai [и др.]. // *Emerging Microbes & Infections*. – 2018. - №7(1). – С.1-10
91. Huo J. Neutralization of SARS-CoV-2 by destruction of the prefusion spike. / J. Huo, Y. Zhao, J. Ren [и др.]. // *Cell Host Microbe*. – 2020. - №28. – С.445-454, e446.
92. Huo J. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. / J. Huo, A. Le Bas, R.R. Ruza [и др.]. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2020. - №27 - С.846-854.
93. Islam J.M. A review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites. / J.M. Islam, N.N. Islam, S.M. Alom. // *Immunobiology*. – 2023. - №228(1). – С.152302.
94. Israelow B. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. / B. Israelow, E. Song, T. Mao [и др.]. // *J Exp. Med*. – 2020. - №217. – С.e20201241.
95. Iwatsuki-Horimoto K. Syrian hamster as an animal model for the study of human influenza virus infection. / K. Iwatsuki-Horimoto, N. Nakajima, Y. Ichiko [и др.]. // *J Virol*. – 2018. - №92. – С.e01693-17.
96. Jangra S. A Combination Adjuvant for the Induction of Potent Antiviral Immune Responses for a Recombinant SARS-CoV-2 Protein Vaccine. / S. Jangra, J.J. Landers, R. Rathnasinghe [и др.]. // *Front Immunol*. – 2021. - №12. – С.729189.
97. Ji R.R. BNT162b2 Vaccine Encoding the SARS-CoV-2 P2 S Protects Transgenic hACE2 Mice against COVID-19. / R.R. Ji, Y. Qu, H. Zhu [и др.]. // *Vaccines (Basel)*. -2021. - №9(4). – С.324.
98. Jian S. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. / S. Jian, Y. Wan, C. Luo [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. - №117(21). – С.11727–11734.
99. Jin Z. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. / Z. Jin, X. Du, Y. Xu [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №582. – С.289-293.
100. Ju B. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. / B. Ju, Q. Zhang, J. Ge [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №584(7819). – С.115–119.

101. Ke Z. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. / Z. Ke, J. Oton, K. Qu [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №588. – С.498-502.
102. Keikha R. The evaluation of novel oral vaccines based on self-amplifying RNA lipid nanoparticles (saRNA LNPs), saRNA transfected *Lactobacillus plantarum* LNPs, and saRNA transfected *Lactobacillus plantarum* to neutralize SARS-CoV-2 variants alpha and delta. / R. Keikha, S.M. Hashemi-Shahri, A. Jebali // *Sci Rep*. – 2021. - №11(1). – С.21308.
103. Kern D.M. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 ORF3a in lipid nanodiscs. / D.M. Kern, B. Sorum, S.S. Mali [и др.]. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2021. - №28. – С.573-582.
104. Khoury D.S. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. // D.S. Khoury, D. Cromer, A. Reynaldi [и др.]. // *Nat Med*. – 2021. - №27. – С.1205–1211.
105. Kidd M. S-variant SARS-CoV-2 is associated with significantly higher viral load in samples tested by TaqPath polymerase chain reaction. / M. Kidd, A. Richter, A. Best [и др.]. // *J. Infect. Dis*. - 2021. - №223(10). – С.1666-1670.
106. Kim Y.I. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. / Y.I. Kim, S.G. Kim, S.M. Kim [и др.]. // *Cell Host Microbe*. – 2020. - №27. – С.704–709,e2.
107. Klein S. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. / S. Klein, M. Cortese, S.L. Winter [и др.]. // *Nat Commun*. – 2020. - №11. – С.1-10.
108. Klemm T. Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. / T. Klemm, G. Ebert, D.J. Calleja [и др.]. // *EMBO J*. – 2020. - №39. – С.1-17.
109. Knipe D.M. *Fields Virology*. / D.M. Knipe, P.M. Howley – USA, PA: Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, 2013.
110. Knoops K. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. / K. Knoops, M. Kikkert, S.H.E. van den Worm [и др.]. // *PLOS Biol*. – 2008. - №6. – С.e226.

111. Korber B. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. / B. Korber, W.M. Fischer, S. Gnanakaran [и др.]. // *Cell*. – 2020. - №182(4). – С.812-827.e19.

112. Kotlyar A.M. Vertical transmission of coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. / A.M. Kotlyar, O. Grechukhina, A. Chen [и др.]. // *Am J Obstet Gynecol*. – 2021. - №224(1). – С.35-53.

113. Kramer K. J. Potent neutralization of SARS-CoV-2 variants of concern by an antibody with an uncommon genetic signature and structural mode of spike recognition. / K.J. Kramer, N.V. Johnson, A.R. Shiakolas [и др.]. // *Cell Rep*. – 2021. - №37(109784).

114. Ku M.W. Brain cross-protection against SARS-CoV-2 variants by a lentiviral vaccine in new transgenic mice. / M.W. Ku, P. Authié, M. Bourguine [и др.]. // *EMBO Mol Med*. – 2021. - №e14459.

115. Kulkarni R. Vaccinia virus-based vaccines confer protective immunity against SARS-CoV-2 virus in Syrian hamsters. / R. Kulkarni, W.C. Chen, Y. Lee [и др.]. // *PLoS One*. – 2021. - №16(9). – С.e0257191.

116. Lambe T. ChAdOx1 nCoV-19 protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaque and ferret challenge models. / T. Lambe, A.J. Spencer, K.M. Thomas [и др.]. // *Commun Biol*. – 2021. - №4(1). – С.915.

117. Lan J. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. / J. Lan, J. Ge, J. Yu [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №581. – С.215-220.

118. Lapa D. Retention of Neutralizing response against SARS-CoV-2 Omicron variant in Sputnik V vaccinated individuals. / D. Lapa, D.M. Grousova, G. Matusali [и др.]. // *Vaccines (Basel)*. – 2022. - №10(5). – С.817.

119. Lauer S.A. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. / S.A. Lauer, K.H. Grantz, Q. Bi [и др.]. // *Ann Intern Med*. – 2020. - №172(9). – С.577-582.

120. Lee J. Crystallographic structure of wild-type SARS-CoV-2 main protease acyl-enzyme intermediate with physiological C-terminal autoprocessing site. / J. Lee, L.J. Worrall, M. Vuckovic [и др.]. // *Nat Commun.* – 2020. - №11. – С.1-9.
121. Lee J.S. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. / J.S. Lee, S. Park, H.W. Jeong [и др.]. // *Science Immunology.* – 2020. – №5(49). С.eabd1554.
122. Lei L. The phenotypic changes of gammadelta T cells in COVID-19 patients. / L. Lei, H. Qian, X. Yang [и др.]. // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* – 2020. - №24(19). – С.11603–11606.
123. Letko M. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. / M. Letko, A. Marzi, V. Munster. // *Nat. Microbiol.* – 2020. - №5. – С.562–569.
124. Leung K. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. / K. Leung, M.H. Shum, G.M. Leung, T.T. Lam, J.T. Wu // *Euro Surveill.* – 2021. -№26(1). – С.2002106.
125. Li J. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. / J. Li, D.Q. Huang, B. Zou [и др.]. // *J Med Virol.* – 2021. - №93(3). – С.1449-1458.
126. Li Q. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus-infected pneumonia. / Q. Li Q, X. Guan, P. Wu. // *N Engl J Med.* – 2020. - №382(13) – С.1199–1207.
127. Li Q. SARS-CoV-2 501Y.V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. / Q. Li, J. Nie, J. Wu [и др.]. // *Cell.* – 2021. – №184(9). – С.2362-2371.
128. Liao M. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. / M. Liao, Y. Liu, J. Yuan [и др.]. // *Nature Medicine.* – 2020. - №26(6). – С.842–844.
129. Lin M.H. Structural, biophysical, and biochemical elucidation of the SARS-CoV-2 nonstructural protein 3 macro domain. / M.H. Lin, S.C. Chang, Y.C. Chiu [и др.]. // *ACS Infect Dis.* – 2020. - №6. – С.2970-2978.

130. Liu C. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET. / C. Liu, L. Mendonça, Y. Yang [и др.]. // Structure. – 2020. – №28. – С.1218-1224.e1214.

131. Logunov D.Y. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, D.V. Shcheblyakov [и др.]. // Lancet. – 2021. - №397(10275). – С. 671-681.

132. Logunov D.Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, O.V. Zubkova [и др.]. // Lancet. – 2020. - №396(10255). – С.887-897.

133. Long Q.X. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. / Q.X. Long, B.Z. Liu, H.J. Deng [и др.]. // Nat Med. - 2020. - № 26. – С.845–848.

134. Lu R. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. / R. Lu, X. Zhao, J. Li. // Lancet. – 2020. - №395(10224). – С.565–574.

135. Luo W. Circulating levels of IL-2, IL-4, TNF-alpha, IFN-gamma, and C-reactive protein are not associated with severity of COVID-19 symptoms. / W. Luo, J.W. Zhang, W. Zhang, Y.L. Lin, Q. Wang // Journal of Medical Virology. -2020. - №93(1). - С.89-91.

136. Lv Z. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. / Z. Lv, Y.Q. Deng, Q. Ye [и др.]. // Science. – 2020. – №369. – С.1505-1509.

137. Malone B. Structural basis for backtracking by the SARS-CoV-2 replication-transcription complex. / B. Malone, J. Chen, Q. Wang [и др.]. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2021. - №118.

138. Mandala V.S. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. / V.S. Mandala, M.J. McKay, A.A. Shcherbakov [и др.]. // Nat Struct Mol Biol. – 2020. - №27. – С.1202-1208.

139. Martinez D.R. Chimeric spike mRNA vaccines protect against Sarbecovirus challenge in mice. / D.R. Martinez, A. Schäfer, S.R. Leist [и др.]. // *Science*. – 2021. - №373(6558). – С.991-998.
140. Masters P.S. The Molecular Biology of Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*. / Elsevier. – 2006. - №66. – С.193–292.
141. Matchett W.E. Cutting Edge: Nucleocapsid Vaccine Elicits Spike-Independent SARS-CoV-2 Protective Immunity. / W.E. Matchett, V. Joag, J.M. Stolley [и др.]. // *J Immunol*. – 2021. - №207(2). – С.376-379.
142. McCallum M. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. / M. McCallum, A. De Marco, F.A. Lempp [и др.]. // *Cell*. – 2021. - №184(9). – С.2332-2347,e16.
143. McCray Jr. P.B. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. / P.B. McCray Jr., L. Pewe, C. Wohlford-Lenane [и др.]. // *J Virol*. – 2007. - №81. – С.813–821.
144. Miao J. Syrian hamster as an animal model for the study on infectious diseases. / J. Miao, L.S. Chard, Z. Wang, Y. Wang // *Front. Immunol*. – 2019. - №10. – С.2329.
145. Michalska K. Crystal structures of SARS-CoV-2 ADP-ribose phosphatase: from the apo form to ligand complexes. / K. Michalska, Y. Kim, R. Jedrzejczak [и др.]. // *IUCrJ*. – 2020. – №7. – С. 814-824.
146. Mizumoto K. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. / K. Mizumoto, K. Kagaya, A. Zarebski, G. Chowell. // *Euro Surveill*. – 2020. - №25(10).
147. Montalti M. ROCCA observational study: Early results on safety of Sputnik V vaccine (Gam-COVID-Vac) in the Republic of San Marino using active surveillance. / M. Montalti, G. Soldà, Z. Di Valerio [и др.]. // *EClinicalMedicine*. - 2021. - №38. - С.101027.
148. Mousavizadeh L. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. / L. Mousavizadeh, S. Ghasemi. // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* - 2020.

149. Mu J. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. / J. Mu, J. Xu, L. Zhang [и др.]. // *Sci China Life*. – 2020. - №63. – С.1413-1416.
150. Mubarak A. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Infection, Immunological Response, and Vaccine Development. / A. Mubarak, W. Alturaiki, M.G. Hemida // *J Immunol Res*. – 2019. - №2019. – С. 6491738.
151. Muñoz-Fontela C. Animal models for COVID-19. / C. Muñoz-Fontela, W.E. Dowling, S.G.P Funnell [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №586(7830). – С.509-515.
152. Munster V.J. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. / V.J. Munster, F. Feldmann, B.N. Williamson [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №585. – С.268–272.
153. Napoli P.E. The Ocular Surface and the Coronavirus Disease 2019: Does a Dual ‘Ocular Route’ Exist? / P.E. Napoli, M. Nioi, E. d’Aloja, M. Fossarello. // *J Clin Med*. – 2020. - №9. – С.1269.
154. Naveca F. Phylogenetic Relationship of SARS-CoV-2 Sequences from Amazonas with Emerging Brazilian Variants Harboring Mutations E484K and N501Y in the Spike Protein. / F. Naveca, V. Nascimento, V. Souza [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585>
155. NextStrain. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with global subsampling. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global?f_clade_membership=19A&label=clade:19A
156. Ni L. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. / L. Ni, F. Ye, M.L. Cheng [и др.]. // *Immunity*. – 2020. - №52(6). – С.971–977 e973.
157. Ni X. Structural insights into plasticity and discovery of remdesivir metabolite GS-441524 binding in SARS-CoV-2 macrodomain. / X. Ni, M. Schröder, V. Olieric [и др.]. // *ACS Med Chem Lett*. – 2021. - №12. – С. 603-609.

158. Nishiura H. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). / H. Nishiura, T. Kobayashi, T. Miyama [и др.]. // *Int J Infect Dis.* – 2020. - №94. – С.154-155.

159. NYTimes. How Gamaleya's Vaccine Works. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/gamaleya-covid-19-vaccine.html>

160. NYTimes. How the Pfizer-BioNTech Vaccine Works. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/pfizer-biontech-covid-19-vaccine.html>

161. Ogando N.S. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. / N.S. Ogando, T.J. Dalebout, J.C. Zevenhoven-Dobbe [и др.]. // *Microbiology.* - 2020.

162. Oreshkova N. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. / N. Oreshkova, R.J. Molenaar, S. Vreman [и др.]. // *Euro Surveill.* – 2020. - №25(23). – С.2001005.

163. Osipiuk J. Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors. / J. Osipiuk, S.A. Azizi, S. Dvorkin [и др.]. // *Nat Commun.* – 2021. - №12. – С.1-9.

164. Osterrieder N. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters. / N. Osterrieder, L.D. Bertzbach, K. Dietert [и др.]. // *Viruses.* – 2020. - №12(7). – С.779.

165. Ou X. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. / X. Ou, Y. Liu, X. Lei [и др.]. // *Nat Commun.* – 2020. - №11. – С.1620.

166. Pagotto V. Active monitoring of early safety of Sputnik V vaccine in Buenos Aires, Argentina. / V. Pagotto, A. Ferloni, M.M. Soriano [и др.]. // *MEDICINA (Buenos Aires).* – 2021. - №81. – С.408-414.

167. Pan X. RBD-homodimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, elicits immunogenicity and protection in rodents and nonhuman primates. / X. Pan, J. Shi, X. Hu [и др.]. // *Cell Discov.* – 2021. - №7(1). – С.82.

168. Park A. Type I and type III interferons - induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. / A. Park, A. Iwasaki // *Cell Host & Microbe*. – 2020. – №27(6). – С.870–878.
169. Peng Q. Structural basis of SARS-CoV-2 polymerase inhibition by favipiravir. / Q. Peng, R. Peng, B. Yuan [и др.]. // *Innovation (US)*. – 2021. - №2(100080).
170. Peng Y. Song Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. / Y. Peng, N. Du, Y. Lei [и др.]. // *EMBO J*. – 2020. - №39. – С.1-12.
171. Plante J.A. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. / J.A. Plante, Y. Liu, J. Liu [и др.]. // *Nature*. – 2021. -№592(7852). – С.116-121.
172. Polack F.P. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. / F.P. Polack, S.J. Thomas, N. Kitchin [и др.]. // *N Engl J Med*. – 2020. - №383. – С.2603-2615.
173. Qin C. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. / C. Qin, L. Zhou, Z. Hu [и др.]. // *Clin Infect Dis*. - 2020. - №71(15). – С.762-768.
174. Rambaut A. Preliminary Genomic Characterisation of an Emergent SARS-CoV-2 Lineage in the UK Defined by a Novel set of Spike Mutations. / A. Rambaut, N. Loman [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>
175. Rathnasinghe R. Comparison of transgenic and adenovirus hACE2 mouse models for SARS-CoV-2 infection. / R. Rathnasinghe, S. Strohmeier, F. Amanat [и др.]. // *Emerg Microbes Infect*. – 2020. - №9(1). – С.2433-2445.
176. Reed L.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. / L.J. Reed, H. Muench // *Am J Hyg*. – 1938. - №27. – С.493.
177. Richard M. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. / M. Richard, A. Kok, D. de Meulder [и др.]. // *Nat Commun*. – 2020. - №11(3496).

178. Riddell S. The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. / S. Riddell, S. Goldie, A. Hill, D. Eagles, T.W. Drew. // *Virology*. – 2020. - №17(1). – С.145.
179. Robbiani D.F. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. / D.F. Robbiani, C. Gaebler, F. Muecksch [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №584. – С.437-442.
180. Rockx B. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. / B. Rockx, T. Kuiken, S. Herfst [и др.]. // *Science*. – 2020. - №368. – С.1012–1015.
181. Rossi A.H. Sputnik V vaccine elicits seroconversion and neutralizing capacity to SARS-CoV-2 after a single dose. / A.H. Rossi, D.S. Ojeda, A. Varese A [и др.]. // *Cell Reports Medicine*. - 2021. - №2(8). - С.100359.
182. Russell M.W. Mucosal immunity: The missing link in comprehending SARS-CoV-2 infection and transmission. / M.W. Russell, J. Mestecky // *Frontiers in Immunology*. – 2022. - №13. – С.957107.
183. Ryan K.A. Dose-dependent response to infection with SARS-CoV-2 in the ferret model and evidence of protective immunity. / K.A. Ryan, K.R. Bewley, S.A. Fotheringham [и др.]. // *Nature Communications*. – 2021. - №12(1). – С.81.
184. Sadoff J. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. / J. Sadoff, G. Gray, A. Vandebosch [и др.]. // *New England Journal of Medicine*. – 2021. - №384(23). – С.2187-2201.
185. Safety and Immunogenicity Study of a SARS-CoV-2 (COVID-19) Variant Vaccine (mRNA-1273.351) in Naïve and Previously Vaccinated Adults. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04785144. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04785144?term=mRNA-1273.351&city=&rank=1>
186. Schlottau K. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. / K. Schlottau, M. Rissmann, A. Graaf [и др.]. // *Lancet Microbes*. – 2020. - №1(5). – С.e218-e225.

187. Schubert K. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. / K. Schubert, E.D. Karousis, A. Jomaa [и др.]. // *Nat Struct Mol Biol.* – 2020. - №27. – С.959-966.
188. Sethna P.B. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. / P.B. Sethna, S.L. Hung, D.A. Brian // *Nat. Acad. Sci.* – 1989. - №86. – С.5626–5630.
189. Shang J. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. / J. Shang, G. Ye, K. Shi [и др.]. // *Nature.* – 2020. - №581. – С.221-224.
190. Shao W. Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants of concern in real-world: a literature review and meta-analysis. / W. Shao, X. Chen, C. Zheng [и др.]. // *Emerg Microbes Infect.* – 2022. - №11(1). - 2383-2392.
191. Shkoda A.S. Sputnik V Effectiveness against Hospitalization with COVID-19 during Omicron Dominance. / A.S. Shkoda, V.A. Gushchin, D.A. Ogarkova [и др.]. // *Vaccines.* – 2022. - №10. – С.938.
192. Shi J. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. / J. Shi, Z. Wen, G. Zhong [и др.]. // *Science.* – 2020. – №368(6494). – С.1016–1020.
193. Shin D. Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. / D. Shin, R. Mukherjee, D. Grewe [и др.]. // *Nature.* – 2020. - №587. – С.657-662.
194. Shinde V. Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. / V. Shinde, S. Bhikha, Z. Hoosain [и др.]. // *N Engl J Med.* – 2021. - №384(20). – С.1899-1909.
195. Simon-Loriere E. Towards SARS-CoV-2 serotypes? / E. Simon-Loriere, O. Schwartz // *Nat Rev Microbiol.* – 2022. - №20(4). – С.187-188.
196. Spengler J.R. Severity of disease in humanized mice infected with Ebola virus or Reston virus is associated with magnitude of early viral replication in liver. / J.R. Spengler, G. Saturday, K.J. Lavender [и др.]. // *J Infect. Dis.* – 2018. - №217. – С.58–63.
197. Starr T.N. Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. / T.N. Starr, A.J.

Greaney, A.S. Dingens, J.D. Bloom // *Cell Reports Medicine*. – 2021. - №2(4). – C.100255.

198. Starr T.N. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape. / T.N. Starr, N. Czudnochowski, Z. Liu [и др.]. // *Nature*. – 2021. - №597. – С.97-102.

199. Stokes E.K. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance - United States, January 22-May 30, 2020. / E.K. Stokes, L.D. Zambrano, K.N. Anderson [и др.]. // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. – 2020. - №69(24). - С.759-765.

200. Stowe J. Effectiveness of COVID-19 vaccines against Omicron and Delta hospitalisation, a test negative case-control study. / J. Stowe, N. Andrews, F. Kirsebom [и др.]. // *Nat Commun*. – 2022. - №13. – С.5736.

201. Sun D. Potent neutralizing nanobodies resist convergent circulating variants of SARS-CoV-2 by targeting diverse and conserved epitopes. / D. Sun, Z. Sang, Y.J. Kim [и др.]. // *Nat Commun*. – 2021. - №12(4676).

202. Sun S.H. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. / S.H. Sun, Q. Chen, H.J. Gu [и др.]. // *Cell Host Microbe*. – 2020. - №28. - С.124–133, e4.

203. Sun W. The self-assembled nanoparticle-based trimeric RBD mRNA vaccine elicits robust and durable protective immunity against SARS-CoV-2 in mice. / W. Sun, L. He, H. Zhang [и др.]. // *Signal Transduct Target Ther*. – 2021. - №6(1). – С.340.

204. Sutton G. Assembly intermediates of orthoreovirus captured in the cell. / G. Sutton, D. Sun, X. Fu [и др.]. // *Nat Commun*. – 2020. - №11. – С.1-7.

205. Tegally H. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. / H. Tegally, E. Wilkinson, M. Giovanetti [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640>

206. Thoms M. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. / M. Thoms, R. Buschauer, M. Ameismeier [и др.]. // *Science*. – 2020. - №369. – С.1249-1255.

207. Tian J.H. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. / J.H. Tian, N. Patel, R. Haupt [и др.]. // *Nat Commun.* – 2021. - №12(1). – С.372.
208. Tseng C.T.K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. / C.T.K. Tseng, C. Huang, P. Newman [и др.]. // *J Virol.* – 2007. - №81. – С.1162–1173.
209. Turoňová B. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. / B. Turoňová, M. Sikora, C. Schürmann [и др.]. // *Science.* – 2020. - №370. – С.203-208.
210. Ullrich S. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. / S. Ullrich, C. Nitsche. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2020. - №30(127377).
211. Vabret N. Immunology of COVID-19: Current state of the science. / N. Vabret, G.J. Britton, C. Gruber [и др.]. // *Immunity.* – 2020. - №52(6). – С.910–941.
212. van Doremalen N. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. / N. van Doremalen, T. Bushmaker, D.H. Morris [и др.]. // *N Engl J Med.* – 2020. - №382(16). – С.1564-1567.
213. Victorino F, Sojka DK, Brodsky KS, McNamee EN, Masterson JC, Homann D, Yokoyama WM, Eltzschig HK, Clambey ET. Tissue-resident NK cells mediate ischemic kidney injury and are not depleted by anti-Asialo-GM1 antibody. / F. Victorino, D.K. Sojka, K.S. Brodsky [и др.]. // *The Journal of Immunology.* – 2015. - №195(10). – С.4973–4985.
214. Volz E. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity. / E. Volz, V. Hill, J.T. McCrone [и др.]. // *Cell.* – 2021. -№184(1). – С.64-75,e11.
215. Volz E. Transmission of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England: insights from linking epidemiological and genetic data. / E. Volz, S. Mishra // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2020.12.30.20249034> (2021).
216. Voysey M. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled

trials in Brazil, South Africa, and the UK. / M. Voysey, S.A.C. Clemens, S.A. Madhi [и др.]. // *Lancet*. – 2021. - №397(10269). – С.99-111.

217. Walls A.C. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. / A.C. Walls, Y. Park, M.A. Tortorici [и др.]. // *J Cell*. – 2020. - №181. – С.281–292.

218. Wan Y. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. / Y. Wan, J. Shang, R. Graham, R.S. Baric, F. Li // *J Virol*. – 2020. - №94. – С.e00127-20.

219. Wang K. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. / K. Wang, W. Chen, Y.S. Zhou [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2020.03.14.988345>

220. Wang Q. Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 polymerase. / Q. Wang, J. Wu, H. Wang [и др.]. // *Cell*. - 2020. - №182. – С.417-428,e413.

221. Wang W. Definition and risks of cytokine release syndrome in 11 critically ill COVID-19 patients with pneumonia: Analysis of disease characteristics. / W. Wang, X. Liu, S. Wu [и др.]. // *Journal of Infectious Diseases*. – 2020. - №222(9). – С.1444–1451.

222. Weiskopf D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. / D. Weiskopf, K.S. Schmitz, M.P. Raadsen [и др.]. // *Science Immunology*. – 2020. - №5(48). – С. eabd2071.

223. Wibmer C.K. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. / C. K. Wibmer, F. Ayres, T. Hermanus [и др.]. // *Nat Med*. – 2021. - №27. – С.622–625.

224. Wilk A.J. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. / A.J. Wilk, A. Rustagi, N.Q. Zhao [и др.]. // *Nature Medicine*. – 2020. - №26(7). – С.1070–1076.

225. Wold W.S.M. Chapter three – Syrian hamster as an animal model to study oncolytic adenoviruses and to evaluate the efficacy of antiviral compounds. / W.S.M. Wold, K. Toth // *Adv Cancer Res.* – 2012. - №115. – С.69–92.

226. Wolfel R. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. / R. Wolfel, V.M. Corman, W. Guggemos [и др.]. // *Nature.* – 2020. -№581(7809). – С.465–469.

227. World Health Organization. Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://covid19.who.int>

228. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

229. World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>

230. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).

231. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

232. World Health Organization. WHO statement on novel coronavirus in Thailand [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/news-room/detail/13-01-2020-who-statement-on-novel-coronavirus-in-thailand>

233. Worobey M. The emergence of SARS-CoV-2 in Europe and North America. / M. Worobey, J. Pekar, B.B. Larsen [и др.]. // *Science.* – 2020. -№370(6516). – С.564-570.

234. Wrapp D. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. / D. Wrapp, N. Wang, K.S. Corbett [и др.]. // *Science*. – 2020. - №367 – С.1260-1263.

235. Wu K. Variant SARS-CoV-2 mRNA vaccines confer broad neutralization as primary or booster series in mice. / K. Wu, A. Choi, M. Koch [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2021.04.13.439482>

236. Xu C. Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM. / C. Xu, Y. Wang, C. Liu [и др.]. // *Sci Adv*. – 2021. - №7. – С.1-14.

237. Xu K. Recombinant chimpanzee adenovirus AdC7 expressing dimeric tandem-repeat spike protein RBD protects mice against COVID-19. / K. Xu, Y. An, Q. Li [и др.]. // *Emerg Microbes Infect*. – 2021. - №10(1). – С.1574-1588.

238. Xu X. Immunological responses against SARS-coronavirus infection in humans. / X. Xu, X. Gao. // *Cell Mol Immunol*. – 2004. - №1(2). - С.119-122.

239. Yan L. Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. / L. Yan, Y. Zhang, J. Ge [и др.]. // *Nat Commun*. – 2020. - №11. – С.1-6.

240. Yan L. Cryo-EM structure of an extended SARS-CoV-2 replication and transcription complex reveals an intermediate state in cap synthesis. / L. Yan, J. Ge, L. Zheng [и др.]. // *Cell*. – 2021. - №184. – С.184-193,e110.

241. Yan R. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. / R. Yan, Y. Zhang, Y. Li, L. Xia, Y. Guo, Q. Zhou. // *Science*. – 2020. - №367. – С.1444-1448.

242. Yang A.P. The diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. / A.P. Yang, J.P. Liu, W.Q. Tao, H.M. Li. // *Int Immunopharmacol*. – 2020. - №84. – С.106504.

243. Yang T.J. Impacts on the structure-function relationship of SARS-CoV-2 spike by B.1.1.7 mutations. / T.J. Yang, P.Y. Yu, Y.C. Chang [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1101/2021.05.11.443686>

244. Yang Z. A non-ACE2 competing human single-domain antibody confers broad neutralization against SARS-CoV-2 and circulating variants. / Z. Yang, Y. Wang, Y. Jin [и др.]. // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. - №6. – С.378.
245. Yao H. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. / H. Yao, Y. Song, Y. Chen [и др.]. // *Cell.* – 2020. - №183. – С.730-738.e713.
246. Yeo C. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? / C. Yeo, S. Kaushal, D. Yeo. // *Lancet Gastroenterol Hepatol.* – 2020. - №5(4). – С.335-337.
247. Yuan S. Nonstructural protein 1 of SARS-CoV-2 is a potent pathogenicity factor redirecting host protein synthesis machinery toward viral RNA. / S. Yuan, L. Peng, J.J. Park [и др.]. // *Mol Cell.* – 2020. - №80. – С.1055-1066,e1056.
248. Zhang F. IFN- gamma and TNF- alpha drive a CXCL10 + CCL2 + macrophage phenotype expanded in severe COVID-19 and other diseases with tissue inflammation. / F. Zhang, J.R. Mears, L. Shakib [и др.]. // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.05.238360v1>
249. Zhang L. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. / L. Zhang, D. Lin, X. Sun [и др.]. // *Science.* – 2020. – №368. – С.409-412.
250. Zhang Y.N. Different pathogenesis of SARS-CoV-2 Omicron variant in wild-type laboratory mice and hamsters. / Y.N. Zhang, Z.R. Zhang, H.Q. Zhang [и др.]. // *Sig Transduct Target Ther.* - 2022. - №7. - С.62.
251. Zhao J. Rapid generation of a mouse model for Middle East respiratory syndrome. / J. Zhao, K. Li, C. Wohlford-Lenane [и др.]. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2014. - №111. – С.4970–4975.
252. Zheng M. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. / M. Zheng, Y. Gao, G. Wang [и др.]. // *Cellular & Molecular Immunology.* – 2020. - №17(5). – С.533–535.
253. Zhou D. Structural basis for the neutralization of SARS-CoV-2 by an antibody from a convalescent patient. / D. Zhou, H.M.E. Duyvesteyn, C.P. Chen [и др.]. // *Nat Struct Mol Biol.* – 2020. - №27. – С.950-958.

254. Zhu J. Clinicopathological characteristics of 8697 patients with COVID-19 in China: a meta-analysis. / J. Zhu, Z. Zhong, P. Ji [и др.]. // *Fam Med Community Health*. – 2020. - №8(2).

255. Zhu N. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. // N. Zhu, D. Zhang, W. Wang. // *N Engl J Med*. – 2020. - №382(08). - С.727–733.

256. Zhu X. Cryo-electron microscopy structures of the N501Y SARS-CoV-2 spike protein in complex with ACE2 and 2 potent neutralizing antibodies. / X. Zhu, D. Mannar, S.S. Srivastava [и др.]. // *PLoS Biol*. – 2021. - №19. – С.1-17.

257. Zost S.J. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. / S.J. Zost, P. Gilchuk, J.B. Case [и др.]. // *Nature*. – 2020. - №584. – С.443-449.

258. Zuckerman N.S. A unique SARS-CoV-2 spike protein P681H variant detected in Israel. / N.S. Zuckerman, S. Fleishon, E. Bucris [и др.]. // *Vaccines*. – 2021. - №9(6). – С.616.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Преимущества и недостатки основных типов вакцин.

Тип вакцины	Платформа, описание	Преимущества	Недостатки
Вакцины на основе цельного вируса	Инактивированные вакцины: вирус, инактивированный с помощью химических реагентов или радиации	Надежная техника для производства; высокая стабильность; нет репликации инактивированного патогена; не противопоказан лицам с ослабленным иммунитетом и беременным женщинам	Ограниченная иммуногенность, может быть необходимо использование адъювантов; для формирования длительного иммунного ответа необходима многократная вакцинация; реактогенность; производство включает в себя работу с живым вирусом
	Живые аттенуированные вакцины: модифицированный/ослабленный живой вирус, не вызывающий заболевания у человека	Индукцируют длительный иммунный ответ; не нуждается в адъювантах; индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунного ответа	Противопоказан лицам с ослабленным иммунитетом и беременным женщинам; дорогостоящее производство; термоллабильность; возможность возврата к дикому типу; производство включает в себя работу с живым вирусом
Вакцины на основе вирусных компонентов	Субъединичные вакцины: вакцины на основе целевого вирусного антигена (как правило, с добавлением молекулярных адъювантов)	Неинфекционные; низкая реактогенность; ни на одном из этапов не используется живой вирус	Сниженная иммуногенность по сравнению с вакцинами на основе цельных вирусов; при сниженной иммуногенности необходимость использования адъювантов;

Тип вакцины	Платформа, описание	Преимущества	Недостатки
	Вакцины на основе вирусоподобных частиц: комплекс из нескольких вирусных белков, объединенных в конформацию, напоминающую вирусную частицу, но не несущую вирусный геном	Неинфекционные; ни на одном из этапов не используется живой вирус	формирование в основном гуморального иммунного ответа; дорогостоящее производство Относительно самое сложное и трудномасштабируемое производство; формирование в основном гуморального иммунного ответа
Вакцины на основе нуклеиновой кислоты, несущей целевой антиген	Вакцины на основе ДНК/РНК: нуклеиновая кислота, несущая последовательность целевого антигена, при попадании в клетку человека начинается экспрессия целевого антигена	Неинфекционные; простая разработка и быстрое производство; ни на одном из этапов не используется живой вирус. Для мРНК-вакцин - формирование защитного иммунитета происходит уже после 1-2 вакцинаций.	Нуждаются в специальной технологии по доставке нуклеиновой кислоты; нуждаются в особых условиях хранения; новая технология. Для препаратов на основе плазмидных ДНК – низкая иммуногенность, для формирования защитного иммунитета необходима многократная вакцинация.
	Вакцины на основе вирусного вектора: репликативно-дефектный или репликативно-компетентный вирус, не опасный для человека; конструкция несет в себе ген, кодирующий целевой	Хороший профиль безопасности; индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунного ответа; формирование защитного иммунитета	Предсуществующий иммунный ответ может ограничить эффективность вакцинации; многоступенчатое дорогостоящее производство

Тип вакцины	Платформа, описание	Преимущества	Недостатки
	антиген, при попадании в клетку человека начинается экспрессия целевого антигена	происходит уже после 1-2 вакцинаций; ни на одном из этапов не используется живой вирус	

Таблица А.2 – Вакцины, зарегистрированные или одобренные хотя бы одним национальным регулирующим органом для экстренного применения [COVID-19 Vaccine tracker. Approved vaccines., 2024].

Вакцина	Разработчик	Дата регистрации	Платформа	Эффективность	Количество стран, одобрявших вакцину для экстренного применения
ОДОБРЕНЫ В РФ					
Спутник Лайт	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава РФ	06.05.2021 в РФ	Вирусный вектор на основе аденовируса человека 26 серотипа	80%	26
Спутник V (Гам-КОВИД-Вак)		11.08.2020 в РФ	Вирусный вектор на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов	92%	74
Гам-КОВИД-Вак Лио		25.08.2020 в РФ		н/д	1
Гам-КОВИД-Вак М		24.11.2021 в РФ		н/д	1
Гам-КОВИД-Вак Д		14.04.2023 в РФ		н/д	1
Гам-КОВИД-Вак капли назальные		31.03.2022 в РФ		н/д	1

Вакцина	Разработчик	Дата регистрации	Платформа	Эффективность	Количество стран, одобивших вакцину для экстренного применения
ЭпиВак-Корона	ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора	13.10.2020 в РФ	Пептидная	н/д	4
КовиВак	ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»	19.02.2021 в РФ	Инактивированная	н/д	3
ОДОБРЕНЫ В ДРУГИХ СТРАНАХ					
AstraZeneca ChAdOx1-nCoV-19 (Vaxzevria, Covishield)	AstraZeneca; Оксфордский университет	30.12.2020 в Великобритании; 29.01.2021 в ЕС; 10.02.2021 в ВОЗ	Вирусный вектор на основе аденовируса шимпанзе	63%	49
Comirnaty BNT162b2 (Pfizer/ BioNTech)	BioNTech; Fosun Pharma; Pfizer	02.12.2020 в Великобритании; 21.12.2020 в ЕС; 31.12.2020 в ВОЗ	РНК-вакцина	95%	149
Janssen	Janssen Pharmaceutica; Johnson & Johnson	27.02.2021 в США; 11.03.2021 в ЕС; 12.03.2021 в	Вирусный вектор на основе аденовируса человека 26 серотипа	66,9%	113

Вакцина	Разработчик	Дата регистрации	Платформа	Эффективность	Количество стран, одобивших вакцину для экстренного применения
		ВОЗ			
Moderna mRNA-1273 (Spikevax)	Moderna; NIAID; BARDA	18.12.2020 в США; 6.01.2021 в ЕС	РНК-вакцина	94,5%	88
BBIBP-CorV	Sinopharm; China National Biotec Group; Beijing Institute of Bio. Prod.	09.12.2020 в ОАЭ	Инактивированная	79,34%	93
CoronaVac	Sinovac Biotech	6.02.2021 в Китае	Инактивированная с адьювантом Al(OH) ₃	50,34 % — в Бразилии, 65,3 % — в Индонезии, 91,25 % — в Турции	56
NVX-CoV2373 Nuvaxovid	Novavax; the Coalition for Epidemic Preparedness Innovations,	20.12.2021 в ЕС	Субъединичная на основе вирусоподобных частиц (вакцина на основе рекомбинантных наночастиц)	90,4%	40
Covaxin	Bharat Biotech	03.01.2021 в Индии	Инактивированная	80,6 %	14
Convidicea	CanSino Biologics; Beijing Institute of Bio. Prod.	25.06.2020 (для военнослужащ	Вирусный вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа	65,28 %	10

Вакцина	Разработчик	Дата регистрации	Платформа	Эффективность	Количество стран, одобивших вакцину для экстренного применения
		их Китая); 25.02.2021 в Китае			
WIBP-CorV	Sinopharm; China National Biotec Group; Wuhan Institute of Bio. Prod.	25.02.2021 в Китае	Инактивированная	72.8% от симптомати ческих случаев, 100% от тяжелых случаев	2
Abdala CIGB-66	Center for Genetic Engineering and Biotechnology	09.07.2021 на Кубе	Субъединичная	92.28%	6
Zifivax ZF-UZ-VAC-2001	Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical	01.03.2021 в Узбекистане	Субъединичная	82%	4
Soberana 02 FINLAY-FR-2	Finlay Institute	29.06.2021 в Иране 20.08.2021 на Кубе	Конъюгированная субъединичная	62%	4
QazVac (QazCovid-in)	НИИ проблем биобезопасности	13.01.2021 в Казахстане	Инактивированная	96%	2
Minhai KCONVAC	Shenzhen Kangtai Biological Products; Beijing Minhai Biotechnology	14.05.2021 в Китае	Инактивированная	н/д	2

Вакцина	Разработчик	Дата регистрации	Платформа	Эффективность	Количество стран, одобивших вакцину для экстренного применения
COVIran Barekat	Shifa Pharmed Industrial Co.	13.06.2021 в Иране	Инактивированная	93.5%	1
IMBCAMS Covidful	Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences	09.06.2021 в Китае	Инактивированная	н/д	1
MVC- COV1901	Taiwan's Medigen Vaccine Biologics and Dynavax Technologies	19.07.2021 в Тайване	Субъединичная	н/д	3
ZyCoV-D	Cadila Healthcare; Biotechnology Industry Research Assistance Council	01.07.2021 в Индии	ДНК-вакцина	66.6%	1
FAKHRAVAC MIVAC	Organization of Defensive Innovation and Research	09.09.2021 в Иране	Инактивированная	н/д	1
COVAX-19 SpikoGen	Vaxine; CinnaGen	06.10.2021 в Иране	Субъединичная	н/д	1
Razi Cov Pars	Razi Vaccine and Serum Research Institute	31.10.2021 в Иране	Субъединичная	н/д	1
Turkovac	Health Institutes of Turkey; Erciyes University	22.12.2021 в Турции	Инактивированная	н/д	1
Sinopharm	China National	27.12.2021 в	Субъединичная	н/д	1

Вакцина	Разработчик	Дата регистрации	Платформа	Эффективность	Количество стран, одобивших вакцину для экстренного применения
CNBG	Biotec Group (CNBG)	ОАЭ			
Corbevax	Texas Children's Hospital; Baylor College of Medicine; Biological E. Limited (BioE)	28.12.2021 в Индии	Субъединичная	н/д	1
Soberana Plus	Finlay Institute	20.08.2021 на Кубе	Конъюгированная субъединичная	91.2% при использовании в качестве ревакцинирующей дозы после Soberana 02 FINLAY-FR-2	2
CoVLP Covifenz	Medicago; GlaxoSmithKline (GSK)	24.02.2022 в Канаде	Вирусоподобные частицы	71%	1
VLA2001	Valneva SE; Dynavax Technologies	14.04.2022 в Великобритании	Инактивированная	н/д	1
Noora	Baqiyatallah University of Medical Sciences	01.03.2022 в Иране	Субъединичная	н/д	1

Вакцина	Разработчик	Дата регистрации	Платформа	Эффективность	Количество стран, одобивших вакцину для экстренного применения
NVSI-06-08 (Recombinant SARS-CoV-2 Vaccine (CHO Cell))	National Vaccine and Serum Institute	07.01.2022 в ОАЭ	Субъединичная	н/д	1

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю, к.б.н. Должиковой И.В. за всестороннюю помощь, поддержку и внимание. Особую благодарность выражаю академику РАН, д.б.н., заместителю директора ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Логунову Д.Ю. за ценные советы и рекомендации при выполнении диссертационной работы. Искренне благодарю д.б.н. Народицкого Б.С., к.б.н. Зубкову О.В., к.б.н. Тухватулина А.И., к.б.н. Джаруллаеву А.Ш., к.б.н. Щеплякова Д.В., к.б.н. Семихина А.С., к.б.н. Воронину О.Л., к.б.н. Щербинина Д.Н., к.б.н. Гущина В.А., к.б.н. Есмагамбетова И.Б. за помощь и ценные советы в работе. Отдельную благодарность выражаю сотрудникам лабораторий Государственной коллекции вирусов и клеточной микробиологии Зоркову И.Д., Илюхиной А.А., Шелкову А.Ю., Ботикову А.Г. и Ковыршиной А.В. за помощь в выполнении исследований. Также выражаю благодарность всем сотрудникам лабораторий Государственной коллекции вирусов, клеточной микробиологии, иммунобиотехнологии, молекулярной биотехнологии, анализа геномов, механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов и референсного центра по коронавирусной инфекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России за помощь и поддержку на всех этапах работы. Отдельную благодарность выражаю сотрудникам ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) Недорубову А.А. и к.м.н. Демяшкину Г.А. за помощь в выполнении гистологических исследований. Искренне благодарю Dr. Anna Rosa Garbuglia и всех сотрудников лаборатории вирусологии Национального института инфекционных заболеваний имени Ладзаро Спалланцани (Рим, Италия) за совместную работу по исследованию вируснейтрализующей активности сывороток вакцинированных Гам-КОВИД-Вак добровольцев в отношении варианта Омикрон.

Свою признательность выражаю ученому секретарю ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» к.б.н. Сысолятиной Е.В., ученому секретарю диссертационного совета 21.1.018.03. д.б.н. Ермолаевой С.А., а также д.м.н., профессору Русаковой Е.В., к.б.н. Кожевниковой Л.К., рецензенту к.м.н. Зубашеву И.К. и рецензенту к.б.н. Коноплевой М.В. за помощь в подготовке материала диссертации к защите.