

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

На правах рукописи

ЗУБКОВА Ольга Вадимовна

**РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННОЙ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНЫ
«ГАМ-КОВИД-ВАК» НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ
АДЕНОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА 26 И 5 СЕРОТИПОВ ДЛЯ
ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19**

3.2.7 – иммунология (биологические науки)

1.5.10 – вирусология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:
д. б. н., профессор, академик РАН
Гинцбург А. Л.

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	21
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	21
1.1 COVID-19.....	21
1.2 Общая характеристика SARS-CoV-2.....	25
1.2.1 Структура вириона и геномная организации SARS-CoV-2.....	27
1.2.2 Цикл репликации SARS-CoV-2.....	37
1.3. Вакцины против COVID-19.....	41
1.4 Гетерологичная прайм-буст вакцинация.....	58
1.5 Аденовирусные векторы как основа вакцин.....	66
1.6 Заключение к обзору литературы	76
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	78
2.1 Материалы исследования.....	78
2.1.1 Клеточные линии.....	78
2.1.2 Вирусы и бактериальные штаммы.....	78
2.1.3 Плазмидные векторы.....	78
2.1.4 Синтез нуклеотидных последовательностей, секвенирование.....	79
2.1.5 Лабораторные животные.....	79
2.1.6 Антитела и рекомбинантные белки.....	80
2.1.7 Реактивы и коммерческие наборы.....	80
2.1.8 Лабораторное оборудование.....	83
2.2 Методы исследования.....	84
2.2.1 Генно-инженерные методы.....	84
2.2.2 Биоинформатические методы.....	85
2.2.3 Бактериологические методы.....	85
2.2.4 Молекулярно-биологические методы.....	86
2.2.5 Физико-химические методы.....	89
2.2.6 Вирусологические методы.....	92
2.2.7 Иммунологические методы.....	95

2.2.8 Методы работы с лабораторными животными.....	98
2.2.9 Клинические исследования вакцины на добровольцах.....	101
2.2.10 Статистическая обработка результатов исследований.....	112
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	113
3.1 Конструирование и характеристика рекомбинантных векторов на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующих протективный антиген коронавируса SARS-CoV-2.....	113
3.1.1 Выбор протективного антигена и рекомбинантных векторов.....	113
3.1.2 Конструирование рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих гликопротеин S вируса SARS-CoV-2.....	118
3.1.2.1 Конструирование рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, экспрессирующего гликопротеин S вируса SARS-CoV-2.....	118
3.1.2.2 Конструирование рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, экспрессирующего гликопротеин S вируса SARS-CoV-2.....	124
3.1.3 Изучение физико-химических и молекулярно-биологических свойств rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2.....	128
3.1.4 Исследование иммуногенности рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих гликопротеин S вируса SARS-CoV-2.....	133
3.1.4.1 Исследование гуморального поствакцинального иммунного ответа у мышей.....	133
3.1.4.2 Исследование клеточного поствакцинального иммунного ответа у мышей.....	137
3.1.4.3 Исследование цитокинового профиля у вакцинированных мышей.....	138
3.1.4.4 Исследование гуморального поствакцинального иммунного ответа у мышей при различных схемах вакцинации.....	141
3.1.5 Исследование протективности рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих гликопротеин S вируса SARS-CoV-2.....	143
3.2 Доклинические исследования.....	145
3.2.1 Исследование иммуногенности.....	145

3.2.1.1	Исследование поствакцинального иммунного ответа у мышей.....	146
3.2.1.2	Исследование поствакцинального иммунного ответа у приматов.....	152
3.2.2	Исследование протективности.....	160
3.2.2.1	Исследование протективности вакцины на летальной модели сирийских хомячков с иммунодефицитом.....	160
3.2.2.2	Исследование протективности вакцины на летальной модели трансгенных мышей.....	162
3.2.3	Токсикологические исследования.....	164
3.2.3.1	Исследование острой токсичности.....	165
3.2.3.2	Исследование хронической токсичности.....	169
3.2.3.3	Исследование репродуктивной токсичности.....	171
3.2.3.4	Исследование эмбриотоксичности.....	172
3.2.3.5	Исследование иммунотоксичности.....	174
3.2.3.6	Исследование аллергизирующих свойств.....	179
3.2.3.7	Исследование биораспределения	177
3.3	Клинические исследования.....	179
3.3.1	Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» с участием здоровых добровольцев.....	179
3.3.1.1	Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности «Гам-КОВИД-Вак» (первый этап исследования).....	182
3.3.1.1.1	Оценка безопасности и переносимости отдельных компонентов вакцины.....	182
3.3.1.1.2	Оценка иммунологической эффективности отдельных компонентов вакцины.....	184
3.3.1.2	Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности «Гам-КОВИД-Вак» (второй этап исследования).....	196
3.3.1.2.1	Оценка безопасности и переносимости вакцины «Гам-КОВИД-Вак».....	196

3.3.1.2.2 Оценка иммунологической эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак».....	199
3.3.2 Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» при участии добровольцев в возрастной группе старше 60 лет.....	209
3.3.2.1 Оценка безопасности и переносимости вакцины «Гам-КОВИД-Вак».....	210
3.3.2.2 Оценка иммунологической эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак».....	213
3.3.3 Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое клиническое исследование эффективности, иммуногенности и безопасности комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в параллельных группах в профилактике коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.....	222
3.3.3.1 Оценка реактогенности и безопасности вакцины «Гам-КОВИД-Вак».....	224
3.3.3.2 Оценка иммунологической эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак».....	230
3.3.3.3 Оценка эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак».....	246
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	257
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	277
ВЫВОДЫ.....	279
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	281
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	284
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	359
Приложение А. Паспорта штаммов рекомбинантных аденовирусов.....	359
Приложение Б. Разрешения на проведение клинических исследований.....	361
Приложение В. Регистрационные удостоверения	364
Приложение Г. Патенты.....	366
Приложение Ж. Дипломы.....	377

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Новая коронавирусная инфекция обернулась беспрецедентной проблемой для всего мира. Первые сообщения об этой инфекции начали появляться в сети и различных неофициальных источниках еще в конце 2019 года. Они свидетельствовали о вспышке вирусных пневмоний, кластеризующихся в районе Хуананьского рынка морепродуктов в г. Ухань (провинция Хубэй, КНР) [Zhu, 2019; Zhu et al., 2020c; Du Toit, 2020]. Официальное сообщение о вспышке вирусной инфекции в данном регионе было сделано с небольшой задержкой 31 декабря 2019 года, и уже 9 января китайские ученые установили, что причиной является ранее неизвестный вариант коронавируса, родственного вирусу SARS-CoV, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), который был причиной вспышки коронавирусной инфекции в 2002 году в Южной Корее и ряде других азиатских стран. Новый коронавирус быстро распространился сначала на территории центрального Китая, а в марте был выявлен в США и различных странах ЕС [Rodriguez-Morales, 2020; Gralinski, 2020]. 11 февраля 2020 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) провела глобальный форум по новой коронавирусной инфекции (Global Research and Innovation Forum on the novel coronavirus), где возбудителю было присвоено название SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), инфекция была определена как COVID-19 (coronavirus disease 2019), а также была признана необходимость в разработке профилактических и терапевтических средств и выработаны первые рекомендации в их отношении [Zhu et al., 2020; Du Toit, 2020; Gorbalenya et al., 2020; Горенков и соавт., 2020]. Спустя месяц, 11 марта 2020 года, ВОЗ переквалифицировала чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения в пандемию COVID-19¹.

¹ URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

На территории Российской Федерации первые официально подтвержденные случаи заражения были зафиксированы 31 января 2020 года. Спустя несколько дней, 2 февраля, COVID-19 был внесен в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих. И уже в марте 2020 года, на фоне выраженного подъема заболеваемости COVID-19, Россия приостановила все типы транспортного сообщения с иностранными государствами, ввела комплекс ограничительных мер, а начиная с 30 марта 2020 года в Москве был объявлен режим самоизоляции (этому примеру впоследствии последовали и другие регионы страны). Предпринятые меры оказали определенное воздействие, но не смогли предотвратить массовое распространение вируса.

Практически с первых месяцев пандемии стало очевидным, что наряду с карантинными мерами, требуются дополнительные разработки, направленные на получение терапевтических и профилактических препаратов.

Вакцинация представляет собой наиболее эффективный способ предотвращения распространения инфекционных заболеваний, а ее проведение может снижать риск инфицирования, тяжелого течения болезни, госпитализаций, летального исхода или развития продолжительных осложнений. В связи с чем, одной из первостепенных задач здравоохранения стало создание вакцины для профилактики COVID-19, предназначенной не только для иммунизации групп высокого риска (медицинского персонала и лиц, находившихся в тесном контакте с заболевшими), но и для проведения массовой иммунизации.

Пандемия COVID-19 продемонстрировала, с одной стороны, уязвимость человечества перед новыми инфекционными заболеваниями, а с другой – показала важность наличия быстрых, масштабируемых технологий, позволяющих в короткие сроки разрабатывать и производить необходимые вакцинные препараты в масштабах не только страны, но и мира.

Степень разработанности темы. В начале 2020 года в ряде стран (Российской Федерации, Соединенных Штатах Америки, Китае, Великобритании, странах Евросоюза) стартовали интенсивные исследования по созданию вакцин для профилактики COVID-19. Ведущие международные и национальные

регулирующие органы (ВОЗ, ЕМА¹, FDA² и другие), проанализировав действующие нормативные документы и рекомендации, разработали новые или внесли изменения в существующие, с целью упрощения и ускорения процесса регистрации вакцин против COVID-19. В РФ в дополнение к уже имеющимся документам принято Постановление Правительства № 441³.

В мае 2020 г. ВОЗ сообщила о 159 кандидатных вакцинах против COVID-19, находящихся в стадии разработки, 5 из которых проходили I–II фазу клинических исследований (КИ). При создании этих вакцин использовались различные технологические платформы, каждая из которых обладает уникальными преимуществами, но и имеет свои недостатки [Calina et al., 2020; Keech et al., 2020; Goepfert et al., 2021; Ganneru et al., 2021; Yadav et al., 2021; Mohandas et al., 2021; Baden et al., 2021; Polack et al., 2020; Sadoff et al., 2021; Voysey et al., 2021].

Стоит отметить, что ключевые элементы векторных вакцин против COVID-19 были уже разработаны ранее применительно к другим вирусным заболеваниям, для которых отсутствовали эффективные средства защиты, например, для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) или болезни, вызываемой вирусом Эбола (БВВЭ) [Geisbert et al., 2011; Tapia et al., 2016; Dolzhikova et al., 2017; Venkatraman et al., 2018; Matz et al., 2019; Должикова и соавт., 2020; Ковыршина и соавт., 2020; Zhao et al., 2021].

Четыре типа вакцин (субъединичные, инактивированные, вирусные векторные вакцины и мРНК-вакцины) по результатам доклинических и клинических исследований оказались эффективными, на их долю приходилось более 80% всех создаваемых и изучаемых препаратов⁴.

¹ EMA initiatives for acceleration of development support and evaluation procedures for COVID-19 treatments and vaccines (EMA/213341/2020). EMA; 2020.

² Emergency use authorization of medical products and related authorities. Guidance for industry and other stakeholders. FDA; 2017.

³ Постановление Правительства Российской Федерации от 03.04.2020 № 441 (ред. от 01.09.2020) «Об особенностях обращения лекарственных препаратов для медицинского применения, которые предназначены для применения в условиях угрозы возникновения, возникновения и ликвидации чрезвычайной ситуации и для организации оказания медицинской помощи лицам, пострадавшим в результате чрезвычайных ситуаций, предупреждения чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний, представляющих опасность для окружающих, заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических, радиационных факторов».

⁴ URL: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-COVID-19-candidate-vaccines>.

В состав субъединичной вакцины компании Novavax входит стабилизированная тримерная молекула полноразмерного белка S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 [Logue et al., 2023; Keech et al., 2020]. В доклинических исследованиях (ДКИ) вакцины показана индукция как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, а также защита животных от инфицирования SARS-CoV-2 [Keech et al., 2020]. Клинические исследования (КИ) I-II фаз, проводимые в Австралии и США, показали, что вакцина обладает благоприятным профилем безопасности, а иммунный ответ в четыре раза превышает аналогичные показатели у лиц, перенесших COVID-19 [Keech et al., 2020]. В III фазе КИ, которые проходили в Великобритании, США и Мексике, продемонстрирована высокая эффективность вакцины [Heath et al., 2021; Dunkle et al., 2022].

Инактивированные вакцины, такие как Covilo, CoronaVac, Covaxin зарубежного производства и отечественная КовиВак, разработанная ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, в ходе доклинических исследований показали индукцию высоких уровней антител у различных видов животных и обеспечивали защиту от заражения вирусом SARS-CoV-2 [Wang et al., 2020; Gao et al., 2020; Ganneru et al., 2021; Yadav et al., 2021; Mohandas et al., 2021; Kruglov et al., 2024; Драпкина и соавт., 2022; Данилов и соавт., 2022]. Результаты клинических исследований показали, что сероконверсия через 42 дня после введения второй дозы вакцины наблюдалась у всех участников [Xia et al., 2021], а эффективность этого типа вакцин против симптоматического заболевания составила больше 50% [Al Kaabi et al., 2021; Palacios et al., 2020; Tanriover et al., 2021; Jara et al., 2021; Ella et al., 2021c].

Технологическая платформа на основе мРНК считается новым подходом в разработке вакцин против COVID-19, однако с 2000-х годов мРНК-вакцины прошли многочисленные исследования в качестве кандидатных препаратов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний [Jain et al., 2021; Alfagih et al., 2021]. мРНК-вакцины против COVID-19, разработанные компаниями BioNTech/Pfizer и Moderna, представляют собой мРНК, кодирующую

стабилизированную форму полноразмерного белка S вируса SARS-CoV-2, инкапсулированную в липидные наночастицы. Доклинические исследования продемонстрировали, что вакцина индуцирует длительные иммунные реакции и обеспечивает защиту мышей от инфекции SARS-CoV-2 [Corbett et al., 2020a; Corbett et al., 2020b]. Клинические исследования реактогенности и безопасности показали умеренную степень реактогенности, серьезные нежелательные явления были редкими, а их частота была аналогична частоте в группе плацебо [Jackson et al., 2020; Walsh et al., 2020]. Эффективность вакцины для лиц в возрасте 18 лет и старше в предотвращении заболевания COVID-19, включая тяжелое течение заболевания, составила 94,1% [Baden et al., 2021; Polack et al., 2020; Thomas et al., 2021].

К вакцинам на основе аденовирусных векторов относятся: вакцина Ad26.COV2.S компании Janssen/Johnson & Johnson; вакцина ChAdOx1 nCoV-19, разработанная Оксфордским университетом и компанией AstraZeneca; и вакцина Convidecia производства CanSino. Для создания вакцины Convidecia китайские ученые использовали рекомбинантный репликативно-дефектный аденовирус человека 5 серотипа (Ад5), экспрессирующий ген полноразмерного белка S вируса SARS-CoV-2 [Wu et al., 2020; Zhu et al., 2020a]. Вакцина Ad26.COV2.S содержит рекомбинантный репликативно-дефектный аденовирус человека 26 серотипа (Ад26), экспрессирующий стабилизированную форму белка S [Mercado et al., 2020; Hsieh et al., 2020]. AZD1222/Covishield представляет собой нерепликативный рекомбинантный аденовирус шимпанзе изолята Y25, который содержит ген полноразмерного белка S с адьювантной последовательностью (активатор тканевого плазминогена) [van Doremalen et al., 2020].

Аденовирусная платформа доказала свою безопасность в более чем 500 клинических исследованиях, проведенных до начала пандемии COVID-19. Вакцинные препараты на основе рекомбинантных аденовирусных векторов против БВВЭ получили более ста тысяч человек [Henaó-Restrepo et al., 2015; Henaó-Restrepo et al., 2017]. Более того, безопасное применение у людей доказано не только для рекомбинантных вакцин и препаратов на основе репликативно-

дефектных аденовирусов, но и в отношении живых аденовирусных вакцин. Опыт применения этих препаратов в армии США, где живыми аденовирусами 4 и 7 серотипов (Ад4 и Ад7) в течение многих лет проводится вакцинация новобранцев, показал безопасность вакцины и отсутствие какой-либо разницы в структуре соматических патологий у вакцинированных военных и представителей контрольной когорты, не получавшей вакцину [Lyons et al., 2008; Collins et al., 2020].

Сотрудниками центра ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России в рамках выполнения Государственного задания Минздрава России (регистрационный номер 114112770009) была разработана и в декабре 2015 года зарегистрирована для гражданского применения вакцина «ГамЭвак-Комби» против БВВЭ (№ РУ: ЛП-003390). «ГамЭвак-Комби» получена с применением двух рекомбинантных векторов, в частности на основе вируса везикулярного стоматита и Ад5, экспрессирующих модифицированный ген гликопротеина GP вируса Эбола вида Заир. В Республике Гвинея вакцина была испытана в рамках пострегистрационных исследований с участием более 2000 добровольцев [Logunov et al., 2025]. Результаты показали безопасность и эффективность препарата. Впервые в медицинской практике был применен прайм-буст подход, который позволил индуцировать длительный иммунный ответ у добровольцев (как минимум два года у более чем 90% участников) [Dolzhikova et al., 2017; Logunov et al., 2025].

В последующих исследованиях сотрудниками центра ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России также была разработана вакцина «Гам-БВРС-Вак» против бетакоронавируса MERS-CoV, родственного SARS-CoV-2 и вызывающего БВРС. В этой вакцине впервые был реализован подход гетерологичной прайм-буст иммунизации с использованием двух серотипов аденовирусов – Ад26 и Ад5 [Ожаровская и соавт., 2019; Должикова и соавт., 2020; Ковыршина и соавт., 2020]. Была продемонстрирована высокая эффективность и безопасность данного вакцинного препарата в доклинических исследованиях, а также высокая иммуногенность и безопасность в клинических исследованиях (II

фаза КИ была завершена к концу 2019 года) [Должикова и соавт., 2020]. Вакцинация «Гам-БВРС-Вак» проводилась по схеме прайм-буст иммунизации, при которой сначала вводился первый компонент – рекомбинантный Ад26, а затем, через 21 день, второй компонент – рекомбинантный Ад5. Таким образом, к моменту начала разработки вакцины против новой коронавирусной инфекции были решены основные регуляторные (оценка безопасности и эффективности) и технологические (производственные) вопросы в отношении рекомбинантных аденовирусов. И именно эта платформа стала первой и основной в качестве базы для создания вакцины против новой коронавирусной инфекции.

Цель данной работы – создание комбинированной векторной вакцины на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующих протективный антиген коронавируса SARS-CoV-2, для профилактики COVID-19, изучение ее безопасности и эффективности.

Задачи:

1. Выбрать протективный антиген коронавируса SARS-CoV-2 и сконструировать рекомбинантные векторы на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующие протективный антиген.
2. Провести доклинические исследования иммуногенности, эффективности и безопасности кандидатной вакцины.
3. Оценить безопасность и иммунологическую эффективность вакцины в рамках клинических исследований I-II фазы у добровольцев 18-60 лет.
4. Проанализировать безопасность и иммуногенность вакцины в рамках клинических исследований I-II фазы у добровольцев старше 60 лет.
5. Оценить профиль безопасности вакцины в рамках пострегистрационных клинических исследований.
6. Исследовать иммунологическую эффективность вакцины в рамках пострегистрационных клинических исследований.
7. Определить эпидемиологическую эффективность вакцины в рамках пострегистрационных клинических исследований.

Научная новизна. Впервые сконструированы векторы на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, кодирующие полноразмерный ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 с кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью для экспрессии в клетках млекопитающих (rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2). rAd26-S-CoV2 является репликативно-дефектным в результате делеции E1-области генома аденовируса. Дополнительно в геноме удалена E3-область для увеличения пакующей емкости. В геноме rAd26-S-CoV2 дополнительно проведена модификация E4-области для эффективной продукции рекомбинантного вируса в производственной клеточной линии HEK 293.

В экспериментах *in vivo* показана способность полученных рекомбинантных аденовирусов индуцировать гуморальный и клеточный иммунный ответ. Детальный анализ гуморального иммунного ответа продемонстрировал, что специфические IgG представлены всеми четырьмя изотипами с преобладанием изотипа IgG1 для rAd26-S-CoV2 и IgG1, IgG2a для rAd5-S-CoV2. Иммунизация животных препаратами рекомбинантных аденовирусов rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 повышает процент пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов после антигенной рестимуляции *in vitro*.

Впервые разработан состав кандидатной комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» для профилактики COVID-19 и определена схема иммунизации. «Гам-КОВИД-Вак» производится в виде жидкого замороженного препарата, состоящего из двух компонентов. Компонент I содержит $1 \pm 0,5 \times 10^{11}$ вирусных частиц rAd26-S-CoV2. Компонент II содержит $1 \pm 0,5 \times 10^{11}$ вирусных частиц rAd5-S-CoV2. Вакцина предназначена для внутримышечного введения. Вакцинация проводится в режиме прайм-буст: вначале вводится компонент I, затем, через 3 недели (21 день) – компонент II.

Впервые показано, что вакцина «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует формирование напряженного гуморального и клеточного иммунного ответа у различных видов животных (грызуны, нечеловекообразные приматы). Выявлен дозозависимый характер иммунного ответа: по мере увеличения дозы вакцины

возрастал титр специфических антител. Специфический иммунитет после вакцинации сохраняется на высоком уровне в течение не менее 12 месяцев.

Впервые доказана протективная активность вакцины «Гам-КОВИД-Вак», которая обеспечивает 100% защиту сирийских хомячков с индуцированным иммунодефицитом и 100% hACE2-трансгенных мышей от летальной инфекции SARS-CoV-2.

Проведенный полный комплекс доклинических исследований разработанной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» подтвердил ее безопасность, иммуногенность и защитную эффективность.

Впервые в рамках клинических исследований продемонстрирована безопасность и хорошая переносимость разработанной вакцины «Гам-КОВИД-Вак». У взрослых здоровых добровольцев 18–60 лет и добровольцев старше 60 лет, вакцинированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст, серьезных нежелательных явлений не обнаружено.

Впервые в рамках клинических исследований I – II фазы показано, что гетерологичная иммунизация в режиме прайм-буст позволяет сформировать более высокий специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ, чем при вакцинации каждым компонентом по отдельности. Показано отсутствие перекрестного иммунного ответа к векторам Ад26 и Ад5.

Впервые в рамках пострегистрационного клинического исследования показано, что вакцина обладает благоприятным профилем безопасности, непредвиденных серьезных нежелательных явлений не выявлено. Вакцинация добровольцев «Гам-КОВИД-Вак» способствует формированию напряженного поствакцинального гуморального иммунного ответа. Иммунизация в режиме прайм-буст приводит к формированию напряженного антигенспецифического клеточного звена противоинфекционного иммунитета.

Впервые в рамках пострегистрационного клинического исследования определена эпидемиологическая эффективность вакцины. С наибольшей эффективностью вакцина защищает от средней и тяжелой форм заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанная в настоящем исследовании технологическая платформа на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов отвечает задачам и потребностям системы здравоохранения РФ не только в отношении эпидемиологического благополучия населения по COVID-19, но и может быть использована для создания безопасных и эффективных вакцинных препаратов против широкого спектра патогенных микроорганизмов.

Штаммы рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующие ген гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2, депонированы в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России под номерами 2942 и 2941, соответственно.

На основании полученных результатов исследований разработана и утверждена в установленном порядке нормативная документация на производство и контроль качества, а также инструкция по применению вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

Детально изученные безопасность и иммуногенность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в доклинических исследованиях расширяют возможности применения препаратов на основе рекомбинантных аденовирусов в клинической практике.

Полученные данные об особенностях иммунного ответа на введение разработанной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» углубляют знания о формировании протективного иммунного ответа против новой коронавирусной инфекции, что позволяет использовать вакцину как эффективное средство для борьбы с пандемией.

Доказанная в данной работе низкая реактогенность, высокая иммуногенность и эффективность комбинированной векторной вакцины на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов позволяют использовать технологическую платформу для создания иммунобиологических

препаратов нового поколения против особо опасных и социально-значимых инфекционных заболеваний.

По результатам клинических исследований комбинированная векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» зарегистрирована и разрешена к клиническому применению (ЛП-006395 от 11.08.2020 г.).

Практическая ценность работы подкреплена 11 патентами РФ на изобретение, два из которых включены в базу победителей номинации Роспатента «100 лучших изобретений России» за второе полугодие 2020 года (патенты РФ RU 2731356 и RU 2731342 от 22.08.2020 г.).

Внедрение результатов исследования в практику. Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» зарегистрирована для медицинского применения (регистрационное удостоверение ЛП-006395 от 11 августа 2020 года) и включена в Национальный календарь профилактических прививок РФ по эпидемическим показаниям (приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2021 г. № 1122н).

Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» зарегистрирована в 74 странах мира.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования состоит из сочетания вирусологических, молекулярно-генетических, физико-химических, генно-инженерных, иммунологических и биоинформационных методов.

Положения, выносимые на защиту. Рекомбинантные аденовирусы человека 5 и 26 серотипов, экспрессирующие ген гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2, могут быть использованы для производства комбинированной векторной вакцины для профилактики COVID-19.

Полный комплекс проведенных доклинических исследований позволил доказать безопасность, иммуногенность и эффективность не только рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов в качестве компонентов вакцины, но и в условиях оригинального совместного использования в режиме прайм-буст иммунизации.

В ходе клинических исследований разработанная комбинированная векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» продемонстрировала благоприятный

профиль безопасности и переносимости, а также высокую иммуногенность у здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет.

Проведенные клинические исследования с участием добровольцев старше 60 подтвердили безопасность и хорошую переносимость вакцины "Гам-КОВИД-Вак". Схема прайм-буст иммунизации вызывает формирование выраженного и продолжительного гуморального и клеточного иммунного ответа.

Комбинированная векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» безопасна, обладает высокими иммуногенными и защитными свойствами, что позволило проводить массовую вакцинацию против COVID-19 в условиях пандемии. Вакцина «Гам-КОВИД-Вак», использующая технологическую платформу на основе рекомбинантных аденовирусных векторов 26 и 5 серотипов, стала первой в мире зарегистрированной вакциной для профилактики COVID-19.

Личный вклад автора. Автором лично выполнен аналитический обзор литературы по теме и проведены планирование и организация экспериментальных исследований. Автором лично осуществлено конструирование рекомбинантных аденовирусов человека 5 и 26 серотипов, экспрессирующих гликопротеин S коронавируса SARS-CoV-2. Автором лично проведено изучение физико-химических, молекулярно-биологических и иммунологических свойств сконструированных рекомбинантных аденовирусных векторов. Автором лично отработаны условия накопления рекомбинантных Ад5 и Ад26. Протективные свойства рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих гликопротеин S вируса SARS-CoV-2, изучены совместно с к.б.н. Должиковой И.В., зав. лаб. Государственной коллекции вирусов (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Секвенирование генов проводилось совместно с к.б.н. Вороиной О.Л., зав. лаб. анализа геномов (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Масштабирование технологии производства рекомбинантных аденовирусов была выполнена вместе с к.б.н. Семихиным А.С, зам. директор филиала «Медгамал» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Исследование клеточного иммунного ответа проводилось совместно с к.б.н. Тухватулиным А.И, зав. лаб. микоплазм и L-форм

бактерий (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Исследования иммуногенной и протективной активности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на макаках-резус были выполнены совместно с сотрудниками ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Исследования иммуногенной и протективной активности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на игрунках были выполнены совместно с сотрудниками ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Планирование доклинических и клинических исследований комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» проведены при непосредственном участии автора. Доклинические исследования проводились в сотрудничестве с центром доклинических исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Клинические исследования проводились совместно с Лубенец Н.Л., начальником отдела внедрения инновационных лекарственных средств и медицинских изделий в производство (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Во всех совместных исследованиях по теме диссертации, наряду с личным участием в их проведении, автору принадлежит обработка и интерпретация экспериментальных данных. Все материалы, использованные в диссертационной работе, проанализированы и обобщены лично автором.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работы основаны на проведении всех исследований на высоком методическом уровне с использованием современных методов анализа, качественных расходных материалов и оборудования. Достоверность результатов подтверждена статистическим анализом с использованием различных критериев описательной и аналитической статистики. Доклинические исследования выполнены в соответствии с Приказом №199н Министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Клинические исследования выполнены согласно рекомендациям ICH E6 «Надлежащая клиническая практика» и Правилам надлежащей клинической практики, установленным Евразийским экономическим союзом. Результаты исследования

подтверждены фактическим материалом, представленным в 74 рисунках, 27 таблицах и 5 приложениях.

Тема диссертации утверждена на ученом совете ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России 01 июня 2023 г. Диссертация была апробирована 14 мая 2025 г. на совместной научной конференции отделов генетики и молекулярной биологии бактерий, медицинской микробиологии, иммунологии и государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Основные положения диссертации были представлены на следующих российских и международных научных конференциях, форумах, научных школах: Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018); Международная конференция «Future biomedicine, proceedings of conference series» (Moscow, 2018); XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2019); Международная конференция «Perspective technologies in vaccination and immunotherapy» (Moscow, 2020); IX Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2022); XVI Международная научно-практическая конференция «Современные достижения медицинской науки» (Казань, 2022); Российская научно-практическая конференция «Управляемые и другие социально значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (Санкт-Петербург, 2023); IV международный форум «Дни вирусологии 2023», (Санкт-Петербург, 2023); международная конференция «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (Beijing, PRC, 2024).

По основным результатам диссертационного исследования опубликовано: 18 научных статей (в журналах рекомендованных ВАК РФ, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования) и 10 тезисов

международных и отечественных научных конференций. Получено 11 патентов на изобретения РФ, два из которых включены в базу победителей номинации Роспатента «100 лучших изобретений России» за второе полугодие 2020 года (патенты РФ RU 2731356 и RU 2731342 от 22.08.2020 г.).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 COVID-19

В конце 2019 года несколько медицинских учреждений в Ухане, провинция Хубэй, Китай, сообщили о пациентах с пневмонией неизвестной этиологии. Выделенный вирус имел гомологию более 85% с SARS-подобным коронавирусом летучих мышей линии В рода бетакоронавирус bat-SL-CoVZC45 и получил название новый коронавирус 2019 (2019-nCoV). 11 февраля 2020 года исследовательская группа Международного комитета по таксономии вирусов переименовала его в коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) [Gorbalenya et al., 2020; Горенков и соавт., 2020]. Вызываемая этим вирусом инфекция 12 января 2020 года была названа коронавирусной болезнью 2019 (COVID-19) [Zhu et al., 2020; Du Toit, 2020].

По состоянию на декабрь 2024 года в мире выявлено 777 126 421^{1,2} лабораторно подтвержденный случай COVID-19, умерло 7 079 925 человек.

Инкубационный период составляет от 2 до 14 дней; около половины инфицированных вирусом людей заболевают к 5-му дню, и примерно у 97% клинические признаки развиваются в течение 11 дней после заражения [Бобик и соавт., 2020; Горенков и соавт., 2020; Никифоров и соавт., 2020; Lauer et al., 2020; Kashani et al., 2022; Jiang et al., 2020]. Инфекционный период начинается примерно за два дня до появления клинических симптомов и заканчивается, когда прошло не менее десяти дней после их исчезновения.

Летальность при COVID-19 относительно ниже (2–4%), чем при ТОРС (9,6%) и БВРС (34,4%) [Cui et al., 2019; Zhu et al., 2020; Du Toit, 2020].

¹ URL: <https://covid19.who.int/>.

² URL: <https://стопкоронавирус.рф/>.

Согласно современным данным, COVID-19 признан полиорганным заболеванием с широким спектром клинических проявлений и может протекать бессимптомно, в легкой, средней или тяжелой форме, а также способен привести к летальному исходу [Nalbandian et al., 2021]. Формы течения инфекции не являются взаимоисключающими, и многие пациенты в ходе болезни переходят из одной в другую. Бессимптомное течение заключается в положительном результате теста на SARS-CoV-2, но при этом пациенты не имеют клинических проявлений. Чаще всего такая форма встречается у пациентов молодого и среднего возраста (младше 50 лет), женщин и лиц без сопутствующей патологии [Бобик и соавт., 2020; Meng et al., 2020]. Важно отметить, что у небольшого количества пациентов, изначально классифицированных как бессимптомные, через некоторое время после обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в носоглотке могут развиваться симптомы инфекции, и таких пациентов называют пресимптомными [Meng et al., 2020]. У большинства пациентов с COVID-19 основными клиническими симптомами являются сухой кашель, затрудненное дыхание и лихорадка. Эти симптомы могут развиваться при заражении различными вариантами SARS-CoV-2, включая Alpha, Delta и Omicron [Kashani et al., 2022, Ettaboina et al., 2021]. Также наблюдаются потеря обоняния (аносмия) и вкусовых ощущений (агевзия), которые признаются патогномичными признаками и часто предшествуют появлению других гриппоподобных симптомов. Несмотря на то, что большинство пациентов выздоравливают в течение нескольких недель, описаны случаи продолжительной anosмии и агевзии.

Появляется все больше сообщений о стойких и длительных эффектах после острого COVID-19, которые характеризуются сохранением клинических симптомов и/или отсроченными или долгосрочными осложнениями в течение нескольких месяцев после начала заболевания [Бобик и соавт., 2020; Nalbandian et al., 2021; Greenhalgh et al., 2020]. Основными длительными симптомами являются одышка и утомляемость. При этом зарегистрировано большое количество симптомов, затрагивающих несколько систем. К ним относятся когнитивная дисфункция (мозговой туман), психические расстройства (депрессия, тревога),

головная боль, миалгия, боль в суставах, боль в грудной клетке, нарушения вкуса и обоняния, хронический кашель, алопеция, бессонница и другие [Yong, 2021; Nalbandian et al., 2021]. У пациентов с тяжелым течением заболевания осложнения после COVID-19 наблюдаются в виде нарушения функции легких, печени, сердца, головного мозга, системы свертывания крови и почек [Wiersinga et al., 2020; Nalbandian et al., 2021].

Считается, что тяжесть течения COVID-19 связана с вирус-индуцированными цитопатическими эффектами и избеганием вирусом иммунных реакций хозяина [Prompetchara et al., 2020]. При легкой и средней форме COVID-19 первые дни инфекции характеризуются высокой вирусной нагрузкой, которая с течением времени неуклонно снижается. Тяжелая форма COVID-19 развивается примерно через неделю после начала заболевания, что указывает на дисрегуляцию иммунного ответа за счет гиперактивации иммунной системы и неконтролируемого выброса цитокинов («цитокиновый шторм»), а не прямого вирусного цитопатического эффекта [Абакушина, 2020; Ye et al., 2020]. Термин «цитокиновый шторм» описывает совокупность патологических иммунных реакций, которые в конечном итоге могут привести к полиорганной недостаточности и смерти [Ragab et al., 2020]. При проникновении вируса в организм возможна ненормальная активация различных антигенпрезентирующих клеток (АПК), дендритных клеток, макрофагов и лимфоцитов, что приводит к выделению большого количества провоспалительных цитокинов: ФНО α , ИЛ-1 β (интерлейкин 1 β), ИЛ-2, ИЛ-6, ИФН α (интерферон α), ИФН β (интерферон β), ИФН γ (интерферон γ), МСР-1 и ГМ-КСФ. В свою очередь, ГМ-КСФ, активируя моноциты, приводит к высвобождению ИЛ-6 и других факторов, которые снова воздействуют на иммунные клетки и активируют их [Абакушина, 2020; Ye et al., 2020].

Механизмы, ответственные за неконтролируемое высвобождение воспалительных факторов, до сих пор неясны, но существует несколько гипотез. Первая основана на том, что репликация вируса приводит к пироптозу и апоптозу, что, в свою очередь, сопровождается высвобождением провоспалительных

цитокинов и влияет на функции макрофагов и лимфоцитов [McGonagle et al., 2020], вызывая периферическую лимфопению [Tavakolpour et al., 2020]. Показано, что у пациентов с наличием «цитокинового шторма» наблюдается лимфопения, а иногда атрофия лимфатических узлов и селезенки [Qin et al., 2020]. Лимфопения также наблюдается при кори, лихорадке Эбола, лихорадке Ласса, инфекциях, вызванных респираторным синцитиальным вирусом [Болдырева, 2020]. Вторая гипотеза связана с адаптивным иммунитетом и выработкой нейтрализующих антител против поверхностного антигена вируса. Это предположение подтверждается ухудшением состояния некоторых пациентов на второй неделе заболевания, несмотря на снижение вирусной нагрузки [Xiong et al., 2020]. Развитие симптомов острой пневмонии совпадает с появлением вируснейтрализующих антител (ВНА) у 80 % пациентов [Peiris et al., 2003]. Исследования на животных показали, что специфические антитела при взаимодействии с антигеном вируса запускают воспалительные реакции, которые приводят к тяжелым повреждениям легких [Liu et al., 2019; Adhikari et al., 2020].

При попадании вируса в организм запускаются механизмы врожденного и адаптивного иммунитета [Смирнов и соавт., 2020]. Вирусная РНК распознается при помощи паттерн-распознающих рецепторов, включая толл-подобные (TLR), лектиноподобные рецепторы С-типа, NOD-подобные и RIG-I-подобные, что приводит к олигомеризации рецепторов и активации факторов транскрипции [Yi et al., 2020; Prompetchara et al., 2020]. Активация интерферон-регулирующего фактора приводит к запуску синтеза и выделения интерферонов I типа (ИФН α и β) и III типа [Смирнов и соавт., 2020]. Активация ядерного фактора κ B (NF- κ B) опосредует выработку воспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α) и хемокинов [Абакушина, 2020; Blanco-Melo et al., 2020]. В целом, эти реакции ограничивают распространение вируса и ускоряют фагоцитоз вирусных антигенов макрофагами [Абакушина, 2020].

В развитии адаптивного иммунитета центральную роль играют цитотоксические Т-клетки, относящиеся к субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов [Felsenstein et al., 2020; Wang et al., 2020]. Специфические CD8⁺ Т-лимфоциты

обеспечивают лизис инфицированных вирусом клеток за счет выработки цитотоксических гранул с перфорином и гранзимами, индуцируют апоптоз в инфицированных клетках и продуцируют провоспалительные и регуляторные медиаторы. Активированные CD4⁺ Т-лимфоциты дифференцируются в различные типы Т-хелперов и участвуют в процессах гуморального иммунного ответа, синтезируя ИФН γ , ИЛ-2, ФНО- α [Zhou et al., 2020].

Попадание вируса в организм приводит к активации В-лимфоцитов, плазматических клеток и выработке антител [Иванова и соавт., 2023]. Антигенспецифические антитела класса М и класса G (IgM и IgG) появляются достаточно рано, а их продукция поддерживается долгоживущими плазматическими клетками костного мозга, которые обнаруживаются даже через год после инфекции [Turner et al., 2021]. IgM и IgG имеют решающее значение для быстрой элиминации вируса [Абакушина, 2020]. IgM обнаруживаются через несколько дней после заражения, а пик концентрации приходится на 14-21 день [Long et al., 2020; Zhang et al., 2020]. Кроме того, показано, что специфические IgM присутствуют в сыворотке крови через месяц после заражения [Xiao et al., 2020]. IgG выявляются через 5-7 дней после заражения, достигая пика концентрации через две-три недели [Long et al., 2020; Zhang et al., 2020]. Доказано, что развитие адаптивного иммунитета способствует элиминации вируса SARS-CoV-2 и защищает от повторного заражения за счет формирования Т-лимфоцитов памяти.

1.2 Общая характеристика SARS-CoV-2

Согласно таксономии коронавирусы SARS-CoV-2 относятся к семейству *Coronaviridae* отряда *Nidovirales*. Это семейство подразделяется на три подсемейства: *Coronavirinae*, *Pitovirinae* и *Orthocoronavirinae*. Подсемейство *Orthocoronavirinae* на основе генетических характеристик делится на четыре рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. Альфакоронавирусы и бетакоронавирусы инфицируют только млекопитающих,

включая человека. Гаммакоронавирусы и дельтакоронавирусы инфицируют в основном птиц, но некоторые из них могут также заражать млекопитающих [Woo et al., 2012; Шестопалов и соавт., 2020]. Род *Alphacoronavirus* подразделяется на 13 подродов. Патогенные для человека коронавирусы HCoV-229E и HCoV-NL63 входят в подроды *Duvinacovirus* и *Setracovirus* соответственно и обычно вызывают легкие заболевания верхних дыхательных путей. Однако у младенцев, маленьких детей и пожилых людей они могут быть причиной более тяжелых инфекций [Su et al., 2016; Forni et al., 2017]. Род *Betacoronavirus* делится на пять подродов: *Embecovirus*, *Hibecovirus*, *Merbecovirus*, *Nobecovirus* и *Sarbecovirus*. Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) относится к подроду *Merbecovirus*, коронавирусы тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV и SARS-CoV-2) принадлежат к подроду *Sarbecovirus*, тогда как HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 являются членами подрода *Embecovirus* [Щелканов и соавт., 2020; Hu et al., 2021, Boni et al., 2020].

На основе данных о полногеномном секвенировании все патогенные для человека коронавирусы имеют животное происхождение. Считается, что SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-NL63 и HCoV-229E произошли от летучих мышей, которые, вероятно, являются важными резервуарными хозяевами. Патогенными для человека некоторые из этих вирусов стали через стадию промежуточных хозяев, таких как пальмовые цвететы для SARS-CoV и одногорбые верблюды для MERS-CoV [Corman et al., 2018; Ye et al., 2020]. HCoV-OC43 и HKU1, возможно, произошли от грызунов, которые могут быть их естественными хозяевами [Su et al., 2016; Forni et al., 2017], а крупный рогатый скот — возможным промежуточным хозяином для HCoV-OC43 [Corman et al., 2018; Ye et al., 2020].

Высокое генетическое сходство (96,2%) между SARS-CoV-2 и коронавирусом RaTG13, выделенным из летучих мышей *Rhinolophus affinis*, указывает на то, что SARS-CoV-2 мог возникнуть у них [Zhou et al., 2020; Шестопалов и соавт., 2020]. Кроме того, в Юго-Восточной Азии у малайских ящеров, известных как панголины (*Manis javanica*), были обнаружены

коронавирусы, сходство нуклеотидных последовательностей которых с SARS-CoV-2 составляет около 92% [Шестопапов и соавт., 2020; Wacharapluesadee et al., 2021; Xiao et al., 2020; Lam et al., 2020]. При этом они имеют примерно 90% гомологию с коронавирусом летучих мышей RaTG13. Несмотря на это сходство, между рецептор-связывающим доменом (RBD) SARS-CoV-2 и коронавирусом, инфицирующим малайских панголинов, гомология составляет 97,4%, что значительно выше, чем между коронавирусом летучих мышей (89,2%). Эволюционный путь SARS-CoV-2 у летучих мышей, панголинов и других млекопитающих еще предстоит установить. До сих пор нет единого мнения о непосредственном зоонозном происхождении SARS-CoV-2.

1.2.1 Структура вириона и геномная организация SARS-CoV-2

Коронавирусы являются оболочечными вирусами более или менее сферической формы 80-120 нм в диаметре. Термин «коронавирус» характеризует внешний вид вириона, на поверхности которого имеются лепесткообразные выступы длиной 17-20 нм, состоящие из сильно гликозилированного мембранного белка типа I, шиповидного белка S, создающих подобие солнечной короны [Пашенков, Хаитов, 2020; Lai, Cavanagh, 1997]. Коронавирусы подрода *Embecovirus* (MHV, HCoV-OC43, HCoV-NKU1) имеют под S шипами второй слой коротких выступов длиной 5-10 нм, образованных белком гемагглютенинэстеразой (HE), также относящимся к мембранному белку типа I [Guy et al., 2000; Patel et al., 1982; Dea, Tjissen, 1988]. Белки S и HE закреплены в оболочке – двойном липидном слое, образованном в результате отпочковывания вируса от внутренних мембран клетки. Помимо этих белков, с оболочкой связаны интегральный мембранный белок типа III (M), который охватывает ее три раза, и белок оболочки (E). Внутри оболочки находится спирально-симметричный нуклеокапсид размером от 14 до 16 нм, содержащий геномную РНК и белок N. Спиральный нуклеокапсид является ещё одной характерной особенностью семейства, так как спирально-симметричными нуклеокапсидами в основном

обладают вирусы с РНК отрицательной полярности [Masters, 2006; Macnaughton et al., 1978; Sturman et al., 1980; Wang et al., 2020]. Геном коронавирусов представлен несегментированной одноцепочечной РНК положительной полярности размером 27–32 тысяч пар оснований [Weiss, Navas-Martin, 2005]. Вирусная РНК является инфекционной и функционирует как мРНК.

Размер генома SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 составляет 29 903 пар нуклеотидов (п.н.) и имеет характерную для β -коронавирусов организацию (рисунок 1).

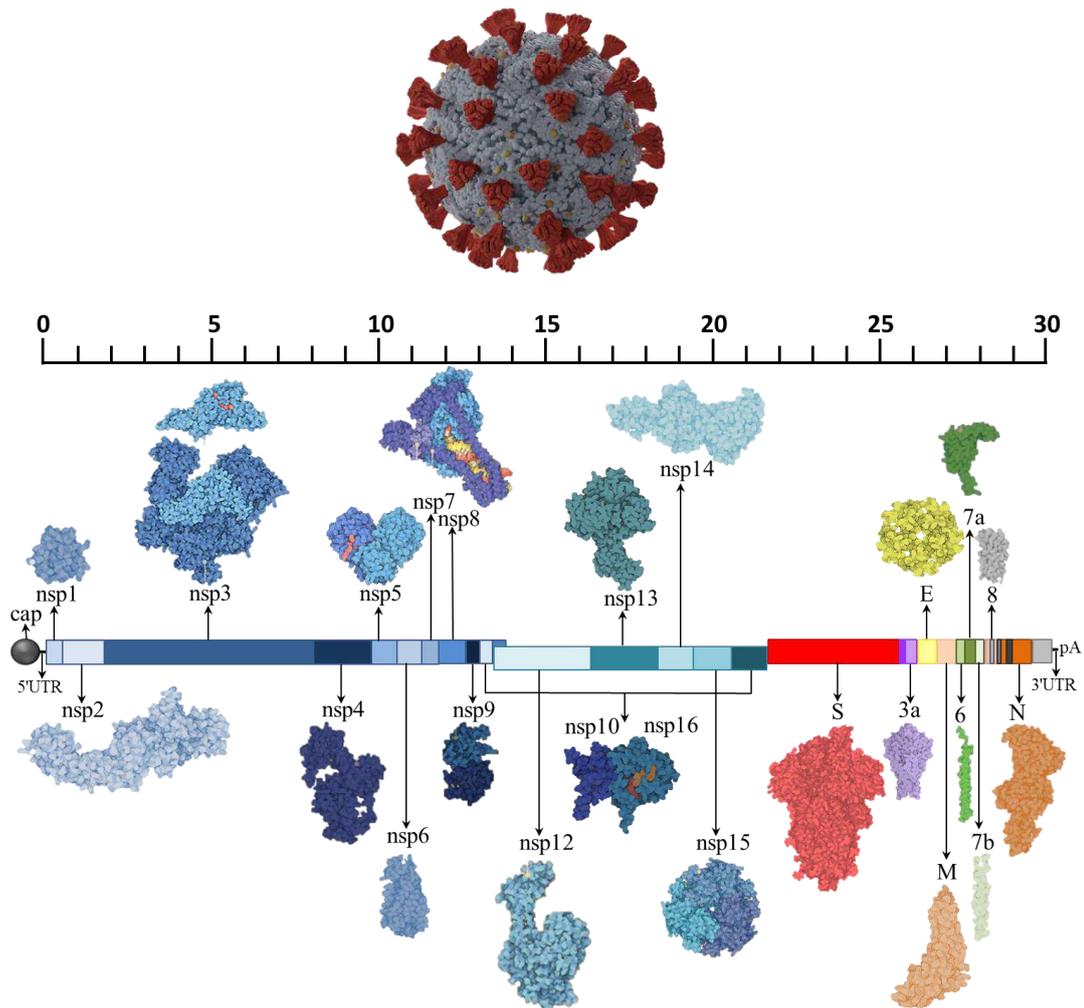


Рисунок 1 – Вирус SARS-CoV-2, структура генома и белков. Шкала характеризует размер вирусного генома (т.п.н.). Cap – кэп; pA – поли(А)-хвост, 5'UTR – 5'-нетранслируемая область, 3'UTR – 3'-нетранслируемая область, nsp – неструктурные белки, S – гликопротеин, E – белок оболочки, M – белок мембраны, N – белок нуклеокапсида, 3a, 6, 7a, 7b, 8 – вспомогательные белки.

5'-конец РНК экпирован, на 3'-конце расположен поли(А)-хвост (рА) длиной примерно 47 нуклеотидов. Такая организация геномной РНК структурно напоминает большинство эукариотических мРНК, но в отличие от них, геномы коронавирусов полицистронны – содержат несколько открытых рамок считывания (ОРС). В целом геном можно представить в виде схемы: 5'-кэп → лидер → 5'-нетранслируемая область (5'UTR) → 14 открытых рамок считывания → 3'-нетранслируемая область (3'UTR) → рА. Все ОРС в геноме кодируют три категории белков: неструктурные белки (nsp), структурные белки и вспомогательные белки. Гены вспомогательных белков вкраплены внутри генов структурных белков [Wang et al., 2020; Masters, 2006].

На каждом из концов генома находятся нетранслируемые области: 5'UTR длиной 265 нуклеотидов и 3'UTR длиной 229 нуклеотидов [Helmy et al., 2020; Agarwal et al., 2022]. 5'UTR содержит лидерную последовательность (70-90 нуклеотидов), в конце которой расположена регуляторная последовательность транскрипции. Кроме того, эта последовательность находится вначале каждого структурного или вспомогательного гена. Регуляторная последовательность транскрипции включает основную последовательность, состоящую из 6-8 нуклеотидов (5'-ACGAAC-3'), и переменные 5'- и 3'-фланкирующие последовательности [Yang, Leibowitz, 2015]. 3'UTR содержит структуры, обеспечивающие репликацию и синтез вирусной РНК.

С 5'-конца $\frac{2}{3}$ генома, что составляет около 21 000 п.н., находятся две перекрывающиеся ОРС (ОРС1а и ОРС1б), которые кодируют неструктурные белки. Область перекрытия содержит специфическую семинуклеотидную «скользящую» последовательность (5'-UUUAAAC-3') и структуру псевдоузла РНК, характерные для рибосомного сигнала сдвига рамки считывания. ОРС структурных и вспомогательных белков занимают $\frac{1}{3}$ генома, около 10 т.п.н. ближе к 3'-концу.

ОРС1аб кодирует 16 неструктурных белков. ОРС1а кодирует полипротеин pp1a длиной 4405 аминокислот (ак) с массой 450–500 кДа, тогда как вместе ОРС1а и ОРС1б кодируют полипротеин pp1аб размером 7096 ак с молекулярной

массой 750–800 кДа [Arya et al., 2021; Helmy et al., 2020]. Экспрессия pp1a происходит в результате движения рибосомы через структуру псевдоузла, которую она раскручивает до тех пор, пока не встретит стоп-кодон ORC1a. Для экспрессии полипротеина pp1ab требуется сдвиг рамки считывания (-1 сдвиг) из ORC1a в ORC1b, который происходит в «скользящей» последовательности 5'-UUUAAAC-3'. Рибосома останавливается, перемещается назад на один нуклеотид, затем снова расплавляет структуру псевдоузла и продолжает трансляцию, что приводит к экспрессии pp1ab [Wang et al., 2020; Ziebuhr, 2005; Ziebuhr, 2006]. pp1a и pp1ab подвергаются процессингу вирусными протеазами с образованием одиннадцати (для pp1a) или шестнадцати (для pp1ab) неструктурных белков, которые участвуют в регуляции репликации и транскрипции вирусной РНК. Некоторые из них являются обычными ферментами, выполняющими ключевые функции. К этим белкам относятся папаиноподобная протеаза (nsp3), 3С-подобная цистеиновая протеаза (nsp5), РНК-зависимая РНК-полимераза (nsp12) и хеликаза (nsp13). Однако другие представляют собой менее распространенные ферменты и связаны с уникальными характеристиками коронавируса, включая праймазу (nsp8), экзорибонуклеазу (nsp14), нидовирусную РНК-уридилат-специфическую эндорибонуклеазу (nsp15) и рибозо-2'-О-метилтрансферазу (nsp16).

За ОРС неструктурных белков в геноме SARS-CoV-2 расположены ОРС структурных белков, которые кодируют гликопротеин S, белок мембраны М, белок оболочки Е и белок нуклеокапсида N (рисунок 2). Структурные белки необходимы для сборки целостной вирусной частицы.

S-белок опосредует прикрепление вируса к рецепторам на поверхности клетки и способствует последующему слиянию между мембранами вируса и клетки. Он является довольно большим трансмембранным белком, состоящим из N-концевого эктодомена, заякоренного в вирусной мембране, и короткого С-концевого эндодомена [Bosch et al., 2003]. S-белок в виде тримеров в метастабильной конформации (конформации до слияния) прикрепляется к вирусной мембране [Delmas, Laude, 1990]. Мономер гликопротеина массой 126-

168 кДа сильно гликозилирован по N-связям, что увеличивает его молекулярную массу до 180-200 кДа [Wang et al., 2020].

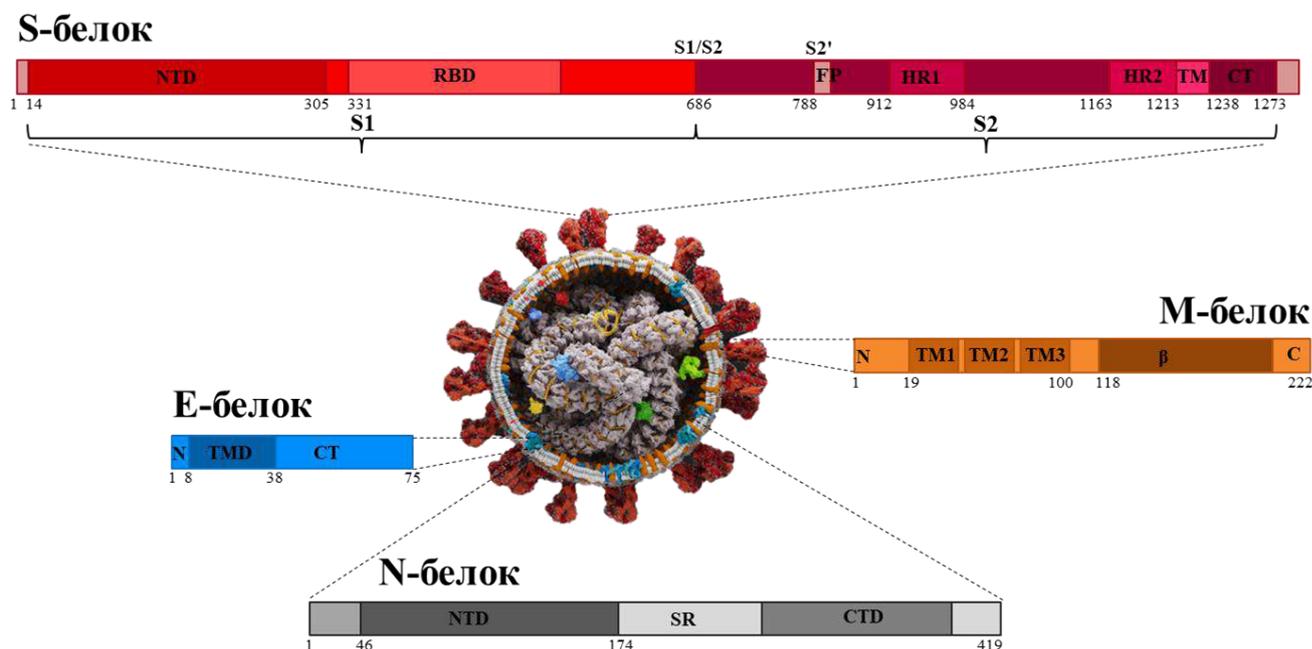


Рисунок 2 – Строение белков вируса SARS-CoV-2. Схематическая доменная организация белков вируса SARS-CoV-2. Для S-белка: S1, S2 – субъединица, NTD – N-концевой домен, RBD – рецептор-связывающий домен, FP – пептид слияния, HR – гептадный повтор, TM – трансмембранный домен, CT – цитоплазматический домен. Для E-белка: N – N-концевой домен, TMD – трансмембранный домен, CT – цитоплазматический C-концевой хвост. Для M-белка: N – концевой эктодомен, TM – трансмембранный домен, β – внутренний домен, C – концевой энтодомен. Для N-белка: NTD – N-концевой домен, SR – центральный участок, CTD – C-концевой домен.

Полноразмерный S-белок вируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 состоит из 1273 аминокислот и включает N-концевой сигнальный пептид (1-13 ак) и две субъединицы S1 (14-685 ак) и S2 (686-1273 ак) (рисунок 2). На границе субъединиц S1/S2 находится сайт расщепления фурин-подобными протеазами клетки-хозяина состоящий из четырех аминокислот RRAR, в позициях 681–684 [Wrapp et al., 2020; Walls et al., 2020]. Аналогичный сайт расщепления имеется у других коронавирусов человека HCoV-OC43 и HCoV-NKU1, а также

высокопатогенного коронавируса MERS-CoV [Hoffmann et al., 2020], однако отсутствует у SARS-CoV и родственных SARS-CoV бета-коронавирусов, обнаруженных у людей, циветт, енотовидных собак, панголинов и летучих мышей [Walls et al., 2020; Hoffmann et al., 2020; Belouzard et al., 2009; Lam et al., 2020; Zhang et al., 2020; Li et al., 2020]. Второй сайт расщепления (KPS/TKR) расположен в субъединице S2 [Hoffmann et al., 2020]. Расщепление S1/S2 субъединиц клеточными протеазами происходит во время созревания, что приводит к активации S-белка и способствует эффективному проникновению вируса в клетки [Hoffmann et al., 2020; Chongzhi et al., 2022]. В S1 субъединице выделяют два домена: N-концевой домен (NTD) (14–305 ак) и С-концевой домен (CTD), состоящий из рецептор-связывающего домена (RBD) (319–541 ак), несущего рецептор-связывающий мотив (RBM) (437–508 ак). В S2 субъединицу входят пептид слияния (FP) (788–806 ак), первый гептадный повтор (HR1) (912–984 ак), второй гептадный повтор (HR2) (1163–1213 ак), трансмембранный домен (TM) (1214–1237 ак) и цитоплазматический домен (CT) (1238–1273 ак).

N-концевой домен S1 субъединицы соединен линкером с рецептор-связывающим доменом. NTD и RBD взаимодействуют с клеточными рецепторами и определяют круг хозяев [Sironi et al., 2020]. RBD отвечает за связывание с пептидазным доменом ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), который используется в качестве рецептора для проникновения в клетки-мишени [Li et al., 2005; Walls et al., 2020; Yan et al., 2020; Tai et al., 2020]. Важно отметить, что аффинность RBD к связыванию с ACE2 у SARS-CoV-2 в 3–4 раза выше, чем у SARS-CoV, что объясняет более высокую инфекционность и трансмиссивность SARS-CoV-2 [Wrapp et al., 2020; Yan et al., 2020].

Субъединица S2 отвечает за процесс слияния вирусной и клеточной мембран. После связывания RBD с рецептором ACE2 сайт расщепления, расположенный в S2, открывается и расщепляется протеазами клетки-хозяина. Этот процесс имеет ключевое значение для вирусной инфекции. Пептид слияния, входящий в S2 субъединицу и состоящий из 15–20 консервативных аминокислот, в основном глицина или аланина, прикрепляется к мембране клетки-мишени и

обеспечивает слияние мембран, разрушая и соединяя липидные слои мембраны клетки-хозяина [Yuan et al., 2020; Ge, Freed, 2009]. Гептадные повторы в S2 состоят из повторяющегося гептапептида: HPPHCPС, где H — гидрофобный или традиционно объемный остаток, P — полярный или гидрофильный остаток, а C — любой другой заряженный остаток [Chambers et al., 1990]. Последовательности гептадных повторов различных коронавирусов в высокой степени гомологичны между собой. HR1 и HR2, взаимодействуя друг с другом, образуют структуру пучка из шести спиралей (6-НВ), известную как ядро слияния, тем самым непосредственно сближая вирусную оболочку и клеточную мембрану для слияния и проникновения вируса [Xia et al., 2020; Bosch et al., 2004]. HR1 расположен на С-конце пептида слияния, а HR2 — на N-конце трансмембранного домена. TM имеет решающее значение в тримеризации гликопротеина и прикреплении к вирусной мембране [Schroth-Diez et al., 2000]. Субъединица S2 заканчивается цитоплазматическим доменом или хвостом, который способствует закреплению тримера на вирусной мембране и участвует в межклеточном слиянии [Petit et al., 2005].

Е-белок (76 аминокислот) является минорным структурным белком (8-12 кДа) и в небольших количествах содержится в вирионе [Masters, 2006]. Аминокислотные последовательности Е-белка различных коронавирусов довольно сильно различаются, но имеют общее строение у различных родов β -коронавирусов: короткий гидрофильный N-конец (8-12 ак), за которым следует большой α -спиральный трансмембранный домен, содержащий гидрофобный участок (21-29 ак), и цитоплазматический гидрофильный С-концевой хвост (39-76 ак) (рисунок 2) [Parthasarathy et al., 2008]. Трансмембранный домен образует шпильку, закручивающуюся обратно через мембрану [Masters, 2006]. Собираясь в гомоолигомеры, начиная от димеров и заканчивая гексамерами, Е-белок обладает активностью ионного канала с плохой селективностью [Verdiá-Báguena et al., 2012]. Е-белок является интегральным мембранным белком локализованным преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме и комплексе Гольджи [Liao et al., 2006]. Он активно экспрессируется внутри зараженных клеток во время

цикла репликации. Однако лишь небольшая часть Е-белков встраивается в оболочку вириона [Venkatagopalan et al., 2015]. Кроме основной функции Е-белка, заключающейся в сборке и высвобождении вируса, он играет важную роль в патогенезе [Nieto-Torres et al., 2014; Castano-Rodriguez et al., 2018].

М-белок относится к гликопротеинам типа III и является мажорным структурным белком SARS-CoV-2. Считается, что он определяет форму вирусной оболочки [de Naan et al., 2000]. М-белок взаимодействует с другими структурными вирусными белками и играет основную роль в сборке коронавируса. Он формирует оболочку и обеспечивает основу, к которой прикрепляется нуклеокапсид для последующего почкования [Neuman et al., 2011]. Показано, что М-белок может активировать гуморальный и клеточный иммунные ответы [Liu et al., 2010]. Кроме того, он также был идентифицирован как негативный регулятор врожденного иммунного ответа [Fu et al., 2021].

В мономере М-белка с молекулярной массой от 25 до 30 кДа (221-226 аминокислот) за небольшим N-концевым эктодоменом, расположенным снаружи вириона или внутриклеточно в просвете эндоплазматического ретикулума, следуют три трансмембранных домена, встроенных в вирусную оболочку, и внутренний домен β -листа, обращенный к С-концу [Rottier et al., 1984; Zhang et al., 2022]. С-концевой эндодомен расположен внутри вириона или на цитоплазматической поверхности внутриклеточных мембран (рисунок 2) [Kuo et al., 2016]. Эктодомен М-белка обычно гликозилирован [Laude et al., 1992; de Naan et al., 2003]. М-белок не содержит сигнальной последовательности, так как первого или третьего трансмембранного домена достаточно, чтобы функционировать в качестве сигнала для встраивания и закрепления белка в его нативной ориентации в мембране [Locker et al., 1992; Machamer, Rose, 1987].

N-белок с молекулярной массой от 43 до 50 кДа является единственным белковым компонентом спирального нуклеокапсида и одним из наиболее распространенных структурных белков SARS-CoV-2. Основная роль N-белка заключается в связывании геномной РНК в виде «бусинок на нитке» с образованием длинного гибкого спирального рибонуклеопротеинового комплекса

(RNP) (~100 нм в длину и диаметром 10-15 нм). RNP поддерживает РНК в высокоупорядоченной конформации, необходимой для репликации и транскрипции вирусного генома [Masters, 2006].

N-белок сильно фосфорилирован и содержит три высококонсервативных участка: N-концевой РНК-связывающий домен (NTD), центральный линкерный участок, богатый аргининами и серинами (SR-домен) и С-концевой домен димеризации (CTD) (рисунок 2) [Kang et al., 2020; Zinzula et al., 2021]. NTD и SR-домен составляют большую часть молекулы. NTD отвечает за связывание с 3'-концом вирусной РНК. SR-домен участвует в клеточной передаче сигналов и первичном фосфорилировании [McBride et al., 2014]. Сайты фосфорилирования SR-домена функционируют при связывании М белка, гетероядерного рибонуклеопротеина и РНК с N белком [McBride et al., 2014]. CTD, который также называют доменом димеризации, представляет собой гидрофобный, богатый спиральями конец. Аминокислоты, входящие в его состав, ответственны за самоассоциацию с образованием гомодимеров и гомоолигомеров [McBride et al., 2014; Lo et al., 2013; Chang et al., 2013; Chang et al., 2006; Wootton et al., 2002]. Олигомеризация N-белка необходима для образования нуклеокапсида, который защищает вирусный геном от внеклеточных агентов [Surjit et al., 2004; Yu et al., 2006]. Для N-белка идентифицированы специфические РНК-субстраты, которые включают последовательности, регулирующие транскрипцию (TRS), 3'UTR геномной РНК и сигнал упаковки генома [Nelson et al., 2000; Zhou et al., 1996; Cologna et al., 2000]. РНК-связывающий домен N-белка взаимодействует с сигналом упаковки, с nsp3 и с М-белком [Hurst et al., 2013; Sturman et al., 1980]. Эти белковые взаимодействия служат для связывания вирусного генома с комплексом репликаза-транскриптаза и последующей упаковки инкапсулированного генома в вирусные частицы.

Между генами структурных белков расположены девять генов вспомогательных белков (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c и 10). Эти вспомогательные белки демонстрируют значительную изменчивость среди коронавирусов. Вспомогательные белки относятся к компонентам вириона и наряду с

неструктурными белками важны для репликации вируса. Кроме того, они участвуют во взаимодействии вируса с клетками-хозяевами, помогают ему уклоняться от иммунной системы и усиливают его вирулентность.

ОРС3а расположена между генами S- и E-белков и кодирует большой вспомогательный белок длиной 274 аа с тремя трансмембранными доменами, который упакован в вирионы. Белок 3а не требуется для репликации вируса, но участвует в его высвобождении и патогенезе [Lu et al., 2006; Gordon et al., 2020]. Он опосредует доставку S-белка, обеспечивая сигнал удержания в ЭПР/комплексе Гольджи. В клеточных моделях вирусной инфекции экспрессия ОРС3а индуцирует апоптоз [Gordon et al., 2020]. Продукт ОРС3b является антагонистом интерферона и участвует в патогенезе вируса [Gordon et al., 2020].

С-концевая область ОРС6 SARS-CoV-2, взаимодействуя с белком комплекса ядерных пор, кариоферином альфа-2, нарушает ядерный транспорт и ингибирует клеточную трансляцию. Этот белок является антагонистом интерферона I типа, подавляет индукцию и передачу сигналов интерферона хозяина [Gordon et al., 2020].

Белок ОРС7а является трансмембранным белком I типа длиной 122 аа и играет важную роль в жизненном цикле вируса (вызывает апоптоз клетки и подавляет экспрессию клеточных генов) и функционирует на ранних стадиях вирусной инфекции [Gordon et al., 2020; Kopecky-Bromberg et al., 2006].

Несмотря на то, что количество мутаций на 100 оснований относительно велико в генах ОРС6, ОРС7а и ОРС7b, продуцируемые ими белки консервативны с точки зрения аминокислотных замен [Laha et al., 2020].

Белок ОРС8 не является необходимым для репликации вируса *in vitro* и *in vivo*. Его основная функция заключается в активации инфламмосомы NLRP3 [Gordon et al., 2020].

1.2.2 Цикл репликации SARS-CoV-2

Для прикрепления коронавируса связывается с рецептором на клеточной поверхности, после чего проникает в эндосому, где происходит слияние вирусной и лизосомальной мембран. Механизм проникновения SARS-CoV-2 в клетку был активно изучен. RBD S1 субъединицы гликопротеина специфически распознает человеческий ACE2 в качестве рецептора [Li, 2015; Li et al., 2003; Li et al., 2005]. Помимо hACE2, SARS-CoV-2 также распознает ACE2 свиньи, хорька, макаки-резуса, циветты, кошки, панголина, кролика и собаки [Ni et al., 2020; Chandrashekar et al., 2020; Zhao et al., 2020], что подразумевает широкий круг хозяев. Однако различная восприимчивость разных видов животных к инфекции SARS-CoV-2 указывает на разную эффективность взаимодействия с рецептором [Liu et al., 2020; Rossi et al., 2020].

Анализ кристаллической структуры S-белка SARS-CoV-2 в комплексе с hACE2, выявил едва различимые, но функционально важные отличия между SARS-CoV-2 и SARS-CoV в распознавании рецептора [Rossi et al., 2020]. Несмотря на общее сходство, имеющиеся аминокислотные замены в RBD-домене (замена Val404 в SARS-CoV на Lys417 в SARS-CoV-2 и Leu472 в SARS-CoV на Phe486 в SARS-CoV-2) позволяют RBD SARS-CoV-2 с более высокой аффинностью связываться с hACE2, чем RBD SARS-CoV, даже несмотря на менее эффективную конформацию для связывания с рецептором [Yan et al., 2020]. Конформационное состояние RBD SARS-CoV-2 в основном находится в так называемом положении «вниз», тогда как конформационное состояние RBD SARS-CoV в равной степени находится как в положении «вниз», так и в положении «вверх» [Shang et al., 2020; Walls et al., 2020; Wrapp et al., 2020; Yuan et al., 2017]. Описанная конформация S белка SARS-CoV-2 играет роль в уклонении от иммунитета [Shang et al., 2020].

Для слияния мембраны вируса SARS-CoV-2 с мембраной клетки-хозяина, аналогично другим представителям данного семейства, необходимо

протеолитическое расщепление S-белка, которое осуществляется протеазами клетки (рисунок 3).

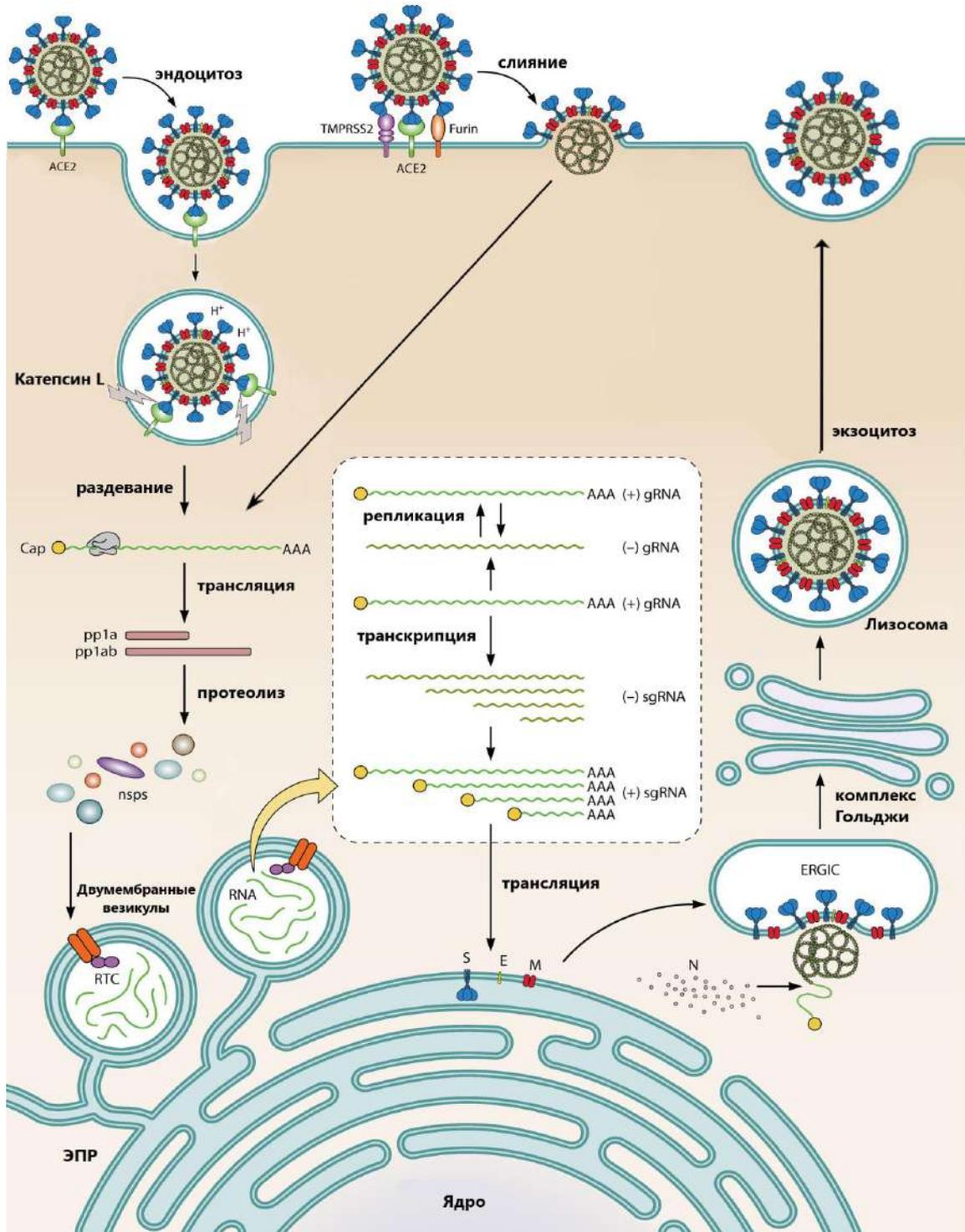


Рисунок 3 – Цикл репликации коронавируса SARS-CoV-2. Адаптировано из статьи [Kung et al., 2022].

Трансляция геномной РНК происходит в цитоплазме. Первоначально транслируются ORC1a и ORC1b. Полипептиды pp1a и pp1ab не присутствуют в

клетке в полноразмерном виде, а расщепляются на 11 и 16 неструктурных белков. Первые четыре неструктурных белка nsp1–nsp4 расщепляются вирусной протеазой (nsp3). Остальные неструктурные белки (nsp5–nsp16) расщепляются основной вирусной химотрипсин-подобной протеазой (nsp5) и одной или двумя папаин-подобными протеазами, за активность которых отвечают гены nsp3 и nsp5 [Jin et al., 2020].

Для остальных этапов репликации необходима реорганизация клеточной мембраны для синтеза РНК в органеллах вирусной репликации, которые представляют собой сеть, состоящую из двумембранных везикул [Zhang et al., 2020; Knoops et al., 2008]. Образование двумембранных везикул индуцируется совместным действием nsp3, nsp4, nsp6 и различных клеточных факторов [Zhang et al., 2020; Angelini et al., 2013; Oudshoorn et al., 2017]. Такая реорганизация не только позволяет концентрировать репликацию РНК, но и обеспечивает защиту промежуточных продуктов репликации в виде двухцепочечной РНК от действия врожденного иммунитета хозяина [Kumar et al., 1998; Nur, 2019].

В просвете двумембранных везикул вирусная РНК транскрибируется мультибелковым комплексом, основным компонентом которого является РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp). При этом почти все неструктурные белки играют роль в его структуре и функциях. Этот комплекс отвечает не только за транскрипцию всего генома, но и за транскрипцию многочисленных субгеномных мРНК, кодирующих структурные белки N, M, E и S. Он использует механизм прерывистой транскрипции для производства субгеномных мРНК, который реализуется на регуляторных последовательностях транскрипции, расположенных по всему геному в начале каждого гена [Sawicki et al., 2007]. Одной из самых важных характеристик мультибелкового комплекса является его исключительно высокая точность во время репликации. Скорость появления новых мутаций у коронавирусов на порядок ниже, чем у большинства других РНК-вирусов [Hartenian et al., 2020; Sanjuán et al., 2010]. Высокоточная репликация объясняется способностью мультибелкового комплекса возвращаться назад по зарождающейся цепи РНК и удалять ошибочно включенные рибонуклеотиды. Эта

функция обеспечивается вирусной геликазой nsp13 и 3'-5'-экзонуклеазой nsp14 [Malone et al., 2021; Lin et al., 2021]. Процессинг вирусных мРНК включает добавление 5'-кэпа и полиаденилирование 3'-конца, что обеспечивает стабильность вирусной мРНК, инициацию трансляции и уклонение от действия врожденной иммунной системы. Синтез 5'-кэпа осуществляют нуклеотидтрифосфатазная активность nsp13, С-концевая N7-метилтрансферазная активность nsp14 и 2'-О-метилование nsp16 [Hartenian et al., 2020; Romano et al., 2020].

Новообразованные геномные РНК и субгеномные мРНК затем экспортируются через молекулярные поры двумембранных везикул в цитоплазму. С субгеномных мРНК осуществляется трансляция вирусных белков. Белок N, как и неструктурные белки коронавируса, синтезируется в цитоплазме, тогда как белки вирусной оболочки синтезируются на мембране эндоплазматического ретикулума.

Для образования полноценного вириона SARS-CoV-2 необходимо, чтобы все компоненты вирусного генома и оболочки собирались в одно и то же время и в одном месте. Места сборки вируса располагаются в непосредственной близости от молекулярных пор двумембранных везикул, что способствует пространственно-временной координации процесса упаковки [Klein et al., 2020; Mendonça et al., 2021]. Геномные РНК, структурные и неструктурные белки SARS-CoV-2 транслоцируются в промежуточный компартмент эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи (ERGIC) [Snijder et al., 2020; Wolff et al., 2020].

Учитывая большой размер генома SARS-CoV-2, он должен быть сильно конденсирован перед заключением в вирусную оболочку. Это обеспечивается связыванием РНК с N-белком, который покрывает геномную РНК с образованием высокоупорядоченного рибонуклеопротеинового комплекса (RNP) [Klein et al., 2020]. После конденсации RNP сохраняется на цитоплазматической стороне ERGIC за счет взаимодействия с М-белком [Klein et al., 2020]. Олигомеризация и ассоциация М-белка с вирусным RNP и белками Е и S запускают сборку,

искривление мембраны и слияние вирусной оболочки с образованием полностью инкапсулированного и инфекционного вириона SARS-CoV-2 [Ghosh et al., 2020].

В отличие от большинства оболочечных вирусов, которые используют цитоплазматическую мембрану клетки-хозяина, вирионы SARS-CoV-2 отпочковываются от цистерн компартмента ERGIC [Klein et al., 2020; Cortese et al., 2020]. После сборки вириона завершающей фазой цикла репликации SARS-CoV-2 является высвобождение вирусных частиц во внеклеточную среду. Вирионы SARS-CoV-2 из ERGIC переносятся на плазматическую мембрану посредством лизосомного экзоцитоза [Klein et al., 2020; Chen et al., 2021].

1.3. ВАКЦИНЫ ПРОТИВ COVID-19

Знания и наработки, полученные в ходе исследований вирусов SARS-CoV и MERS, начавшихся почти два десятилетия назад, оказались актуальными для разработки вакцин против SARS-CoV-2 и, в первую очередь, для их производства в рекордно короткие сроки. Разработка различных типов вакцин демонстрирует огромный технологический прогресс, существующий сегодня. Для разработки вакцин против COVID-19 было использовано 7 основных технологических платформ (рисунок 4).

По данным ВОЗ¹ на 30 марта 2023 года, создано 59 субъединичных кандидатных вакцин, что составляет 32% от общего количества разработанных препаратов. 43 (23%) препарата используют технологию мРНК, 29 (18%) вакцин основаны на вирусных векторах, 22 (13%) – это инактивированные вакцины, 17 (9%) препаратов создано с использованием ДНК и 9 (6%) кандидатных вакцин включают другие типы технологических платформ (7 на основе вирусоподобных частиц, 2 – это живые аттенуированные вакцины). 199 препаратов находятся на стадии ДКИ, 183 вакцины проходят различные фазы КИ: 87 кандидатных вакцин исследуются в I-II фазе, 68 препаратов проходят III фазу и 11 – IV фазу.

¹ URL: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-COVID-19-candidate-vaccines>.

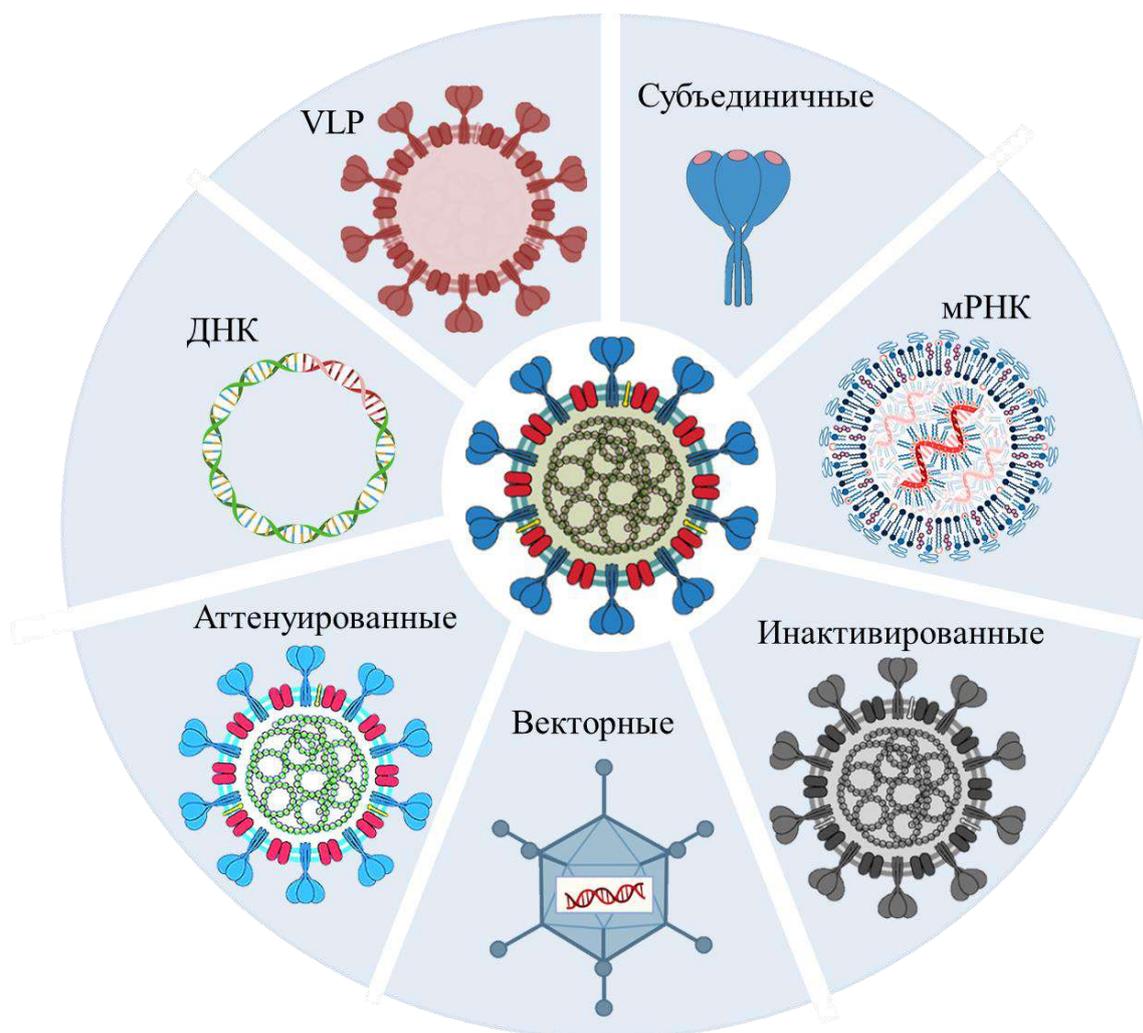


Рисунок 4 – Технологические платформы для разработки вакцин против COVID-19.

К настоящему моменту ряд вакцин получили не только разрешение на экстренное или временное использование, но и были зарегистрированы для медицинского клинического применения. Основными технологическими платформами, которые легли в основу этих вакцинных препаратов, стали: векторные вакцины на основе рекомбинантных аденовирусов, мРНК-вакцины, инактивированные и субъединичные вакцины (таблица 1).

Таблица 1 – Основные вакцины для профилактики COVID-19

Технологическая платформа	Название вакцины	Производитель	Доза (режим введения)	КИ	Эффективность
Субъединичные вакцины	Novavax (NVX-CoV2373, Nuvaxovid)	Novavax совместно с GlaxoSmithKline plc (GSK) и Sanofi	5 мкг рекомбинантного белка 2 + 50 мкг адьюванта (двукратно с интервалом в 21 день)	NCT04611802 NCT05249816 NCT05463068	90,4–100 %
Инактивированные вакцины	Covilo (BBIP-CorV)	Sinopharm	4 мкг (двукратно с интервалом в 21 день)	NCT04510207 NCT04560881 NCT04984408	79%
	CoronaVac	Sinovac	3 мкг (двукратно с интервалом в 14 дней)	NCT04456595 NCT04508075 NCT04582344 NCT04747821 NCT04754698 NCT04854408 NCT04884685 NCT04894227 NCT04956562 NCT04974164 NCT05367895	50-84%
	Covaxin (BBV152)	Bharat Biotech	6 мкг (двукратно с интервалом в 28 дней)	NCT04471519 NCT04918797	78%
	КовиВак	ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, ФГБНУ	3 мкг (двукратно с интервалом в 14 дней)	NCT05765773 NCT05407142 NCT05046548 NCT05715918 NCT05940194	46-80%

Технологическая платформа	Название вакцины	Производитель	Доза (режим введения)	КИ	Эффективность
				NCT04830800 NCT04981405	
мРНК-вакцины	Spikevax (mRNA-1273, Elasomeran)	Moderna	100 мкг (двукратно с интервалом в 28 дней)	NCT04283461 NCT04405076 NCT04470427 NCT04649151 NCT04813796 NCT04847050 NCT04854980 NCT04860297 NCT04927065 NCT04958304 NCT04958954 NCT05054218 NCT05137236 NCT05230953 NCT05280158 NCT05397223 NCT05894499 NCT05894525 NCT06113692 NCT06189053	94.1%
	Comirnaty (BNT162b2, Tozinameran)	Pfizer/BioNTech	30 мкг (двукратно с интервалом в 21 день)	NCT04368728 NCT04537949 NCT04649021 NCT04754594 NCT04756817	95%

Технологическая платформа	Название вакцины	Производитель	Доза (режим введения)	КИ	Эффективность
				NCT04816669 NCT04824638 NCT04852861 NCT04881396 NCT04887948 NCT04895982 NCT04952766 NCT05020145 NCT05047640 NCT05052307 NCT05076227 NCT05157230 NCT05231005 NCT05308680 NCT05310084 NCT05315856 NCT05516459 NCT05620251 NCT05621239 NCT06199934	
Векторные вакцины	Ad5-nCoV	CanSino Biological	5×10^{10} вирусных частиц	NCT04313127 NCT04341389 NCT04398147 NCT04526990 NCT04540419 NCT04552366 NCT04566770	65,7%

Технологическая платформа	Название вакцины	Производитель	Доза (режим введения)	КИ	Эффективность
				NCT04840992 NCT04916886 NCT05005156 NCT05313646	
	AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19)	AstraZeneca / Oxford University	$3,5-6,5 \times 10^{10}$ вирусных частиц (двукратно с интервалом в 28 дней)	NCT04324606 NCT04444674 NCT04516746 NCT04540393 NCT04568031 NCT04794946 NCT04961385 NCT05057897 NCT05059106 NCT05289206	62-90%
	JNJ-78436735 (Ad26.COV2. S)	Janssen Pharmaceutical	10^{11} вирусных частиц	NCT04436276 NCT04505722 NCT04509947 NCT04535453 NCT04614948 NCT04765384 NCT04894305 NCT04908722 NCT05109559	66%

Субъединичные вакцины содержат полные или фрагментированные рекомбинантные вирусные белки [Pollet et al., 2021]. В настоящее время III фаза клинических исследований проводится или завершена для 25 препаратов¹. К основным вакцинам из этой категории относятся: «Novavax» (NVX-CoV2373, NuvaXovid), производства Novavax совместно с британской компанией GlaxoSmithKline plc (GSK) и французской фармацевтической компанией Sanofi [Keech et al., 2020]; и «VidPrevtyn Beta» (VAT00008), разработанная Sanofi Pasteur в сотрудничестве с GSK [Goepfert et al., 2021; Sridhar et al., 2022].

В состав вакцины «Novavax» входит стабилизированная тримерная молекула полноразмерного белка S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1, содержащая три мутации. Сайт расщепления фурином в области соединения S1/S2, 682-RRAR-685, был мутирован на QQAQ (мутация 3Q) для повышения устойчивости к протеолитическому расщеплению. Дополнительно были введены две пролиновые мутации (мутации 2P), K986P и V987P, чтобы сохранить белок в конформации «до слияния» и обеспечить стабильность [Logue et al., 2023; Keech et al., 2020]. Искусственно синтезированная оптимизированная последовательность гена белка S под экспрессию в клетках насекомых с описанными выше мутациями была клонирована в бакуловирусный вектор [Tian et al., 2021]. Продукцию рекомбинантного белка проводили в клетках насекомых Sf9. Очищенные белки образуют термостабильные наночастицы размером 27,2 нм, которые с высокой аффинностью связываются с hACE2. В качестве адъюванта использован Matrix-M на основе сапонины [Tian et al., 2021], механизм действия которого был описан Reimer J.M. и соавторами [Reimer et al., 2012] и дополнительно охарактеризован Magnusson S.E. и соавторами [Magnusson et al., 2018].

¹ URL: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-COVID-19-candidate-vaccines>.

Вакцина «Novavax» обладает высокой стабильностью при хранении [Mascellino et al., 2021], а в ДКИ показала формирование S-специфических антител, антител, ингибирующих рецептор hACE2, и вируснейтрализующих антител. Индуцировала CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы и обеспечивала защиту животных от заражения вирусом SARS-CoV-2. По результатам КИ I-II фазы, которые были проведены в Австралии и США, введение вакцины «Novavax» хорошо переносилось добровольцами и вызывало иммунные ответы в 4 раза выше, чем у переболевших COVID-19 [Keech et al., 2020]. В III фазе клинических исследований, проведенных в Великобритании, США и Мексике, эффективность вакцины составила 89,7%, 90,4% и 92,6%, соответственно [Heath et al., 2021; Dunkle et al., 2022]. В настоящее время «Novavax» включена в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях, одобрена Карибской системой регулирования и разрешена для использования в 40 странах, включая США, Канаду, Мексику, Великобританию, страны ЕС и др¹.

Следующей технологической платформой, на основе которой в мире применено свыше 2 миллионов доз, являются инактивированные вакцины. К ним относятся: вакцина «Covilo» (BBIBP-CoV), разработанная компанией Sinopharm, вакцина «CoronaVac» производства Sinovac, вакцина «Covaxin» (BBV152) производства Bharat Biotech International и российская вакцина «КовиВак», разработанная в ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН.

Вакцина BBIBP-CoV включена в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях, одобрена Карибской системой регулирования и Целевой группой по регулированию в Африке, разрешена для применения в 93 странах². Штамм вируса SARS-CoV-2, названный NB02 и сертифицированный ВОЗ для производства вакцин, наращивали в клетках линии Vero по разработанной стратегии производства на основе нового микроносителя в корзиночном реакторе [Wang et al., 2020].

¹ URL: <https://covid19.trackvaccines.org>.

² Там же.

Для инактивации вируса использовали β -пропионолактон. Доклинические исследования показали, что двукратная вакцинация с использованием 2 мкг/дозу ВВІВР-CorV индуцировала высокие уровни нейтрализующих антител у разных видов животных и обеспечивала высокоэффективную защиту от SARS-CoV-2 у макак-резусов без наблюдаемого АДЕ эффекта [Wang et al., 2020]. По результатам клинических исследований уровень сероконверсии через 42 дня после введения второй дозы вакцины наблюдался у 100% добровольцев [Xia et al., 2021], а эффективность вакцины против симптоматического заболевания составила 78,1% [Al Kaabi et al., 2021].

Вакцина «CoronaVac» включена в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях, одобрена Карибской системой регулирования и Целевой группой по регулированию в Африке и разрешена для применения в 56 странах мира¹. Результаты ДКИ продемонстрировали, что «CoronaVac» индуцирует формирование вируснейтрализующих антител у животных и обеспечивает частичную или полную защиту от тяжелой пневмонии после заражения SARS-CoV-2 без наблюдаемого антителозависимого усиления инфекции [Gao et al., 2020]. Результаты клинических исследований III фазы, проведенные в Бразилии, Турции, Индонезии и Чили, показывают, что вакцина CoronaVac безопасна и индуцирует защитный иммунный ответ против симптоматического течения COVID-19 с эффективностью от 50% до 84% против [Palacios et al., 2020; Tanriover et al., 2021; Jara et al., 2021].

Индийская биотехнологическая компания Bharat Biotech International разработала инактивированную вакцину против COVID-19 «Covaxin» на основе цельновирсионного вакцинного штамма NIV-2020-770. Вакцина «Covaxin» включена в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях, одобрена Карибской системой регулирования и разрешена для применения в 14 странах².

¹ URL: <https://covid19.trackvaccines.org>.

² Там же.

Доклинические исследования на грызунах и приматах показали хорошую переносимость, иммунологическую эффективность и протективность [Ganneru et al., 2021; Yadav et al., 2021; Mohandas et al., 2021]. На основании промежуточных результатов клинических исследований I и II фазы по безопасности, реактогенности и иммуногенности различных составов, был выбран состав, содержащий инактивированный вирус и молекулы агониста толл-подобного рецептора 7/8 (имидазохиолин), адсорбированные на квасцах [Ella et al., 2021a; Ella et al., 2021b]. Вакцина «Covaxin» показала благоприятный профиль безопасности, серьезных нежелательных явлений зафиксировано не было. «Covaxin» индуцирует выработку антител, в том числе вируснейтрализующих. Иммунный ответ был смещен в сторону Th1 фенотипа, с соотношением IgG1/IgG4 выше 1 и повышенной выработкой ИФН γ [Ella et al., 2021b]. По результатам КИ III фазы эффективность вакцины составила 77,8% против симптоматического заболевания COVID-19 и 93,4% против тяжелой формы течения COVID-19 [Ella et al., 2021c].

Цельновирионная инактивированная вакцина «КовиВак», разработанная в ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, производится с использованием β -пропионолактона, что обеспечивает сокращение производственного процесса и получение вирионов с S-белком в конформации до слияния [Kozlovskaya et al., 2021]. По результатам ДКИ вакцина «КовиВак» показала свою безопасность и эффективность [Kozlovskaya et al., 2021; Kruglov et al., 2024]. Вакцина индуцировала образование ВНА у мышей, сирийских хомячков и обыкновенных игрунок. Более того, у мышей были обнаружены антитела к обоим основным структурным белкам S и N. На модели сирийских хомячков показана защитная эффективность. В отличие от контрольных животных, которые теряли вес до 6-го дня после заражения, животные, получившие две дозы вакцины, напротив, набирали вес, начиная с 3-го дня после заражения [Kozlovskaya et al., 2021]. Результаты КИ I/II фазы продемонстрировали хорошую переносимость и безопасность, а также более 85% случаев сероконверсии после полного курса

вакцинации (две дозы вакцины с интервалом в 21 день) [Gordeychuk et al., 2023]. Вакцина «КовиВак» разрешена для применения в РФ, Белоруссии и Камбодже¹.

Наибольшей защитной эффективностью от COVID-19, согласно опубликованным результатам клинических исследований и результатам гражданского оборота, обладают векторные и мРНК-вакцины [Baden et al., 2021; Polack et al., 2020; Sadoff et al., 2021; Voysey et al., 2021].

мРНК-вакцины, «Spikevax» (mRNA-1273, Elasmoran) компании Moderna и «Comirnaty» (BNT162b2, Tozinameran) компаний Pfizer/BioNTech включены в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях, одобрены Карибской системой регулирования и разрешены для применения в 88 и 149 странах мира², соответственно.

Технологическая платформа на основе мРНК считается новым подходом в разработке вакцин, но ученые уже давно их исследуют против различных вирусов, в том числе Зика, бешенства и гриппа [Jain et al., 2021; Alfagih et al., 2021]. Такие вакцины обладают хорошим профилем безопасности и высокой иммуногенностью, их производство является быстрым и малозатратным [Wu, Li, 2021; Alfagih et al., 2021]. С другой стороны, мРНК-вакцины против COVID-19 являются первыми лицензированными мРНК-вакцинами, разрешенными для клинического применения.

Вакцины на основе мРНК содержат инкапсулированные одноцепочечные молекулы мРНК со следующими модификациями: замена нуклеотида уридина на модифицированный псевдоуридин (Ψ), кэп на 5'-конце, 5'- и 3'-нетранслируемые области с регуляторными элементами трансляции и поли(А)-хвост [Kon et al., 2022; Blakney et al., 2021; Yilmaz, 2021]. Описанные модификации делают молекулу РНК стабильной, увеличивают эффективность трансляции и позволяют избежать деградации и врожденной иммуногенности после доставки в клетки [Nance, Meier, 2021; Alfagih et al., 2021].

¹ URL: <https://covid19.trackvaccines.org>.

² Там же.

Такие молекулы мРНК сохраняются в клетках организма менее двух дней, и, таким образом, исключается риск непредвиденной долговременной экспрессии и генетической интеграции [Mascellino et al., 2021; Yadav et al., 2020]. В системах производства мРНК отсутствуют примеси, поскольку они не содержат продуктов животного или клеточного происхождения.

Вакцина mRNA-1273, разработанная компанией Moderna, представляет собой мРНК, кодирующую стабилизированную форму полноразмерного белка S вируса SARS-CoV-2, инкапсулированную в липидные наночастицы. Доклиническое исследование продемонстрировало, что mRNA-1273 индуцирует устойчивые реакции нейтрализующих антител против вируса штамма Wuhan-Hu-1 и варианта D614G, а также ответы CD8⁺ Т-клеток у нескольких линий мышей и обеспечивает защиту легких мышей от инфекции SARS-CoV-2 [Corbett et al., 2020a]. Двукратная иммунизация приматов в дозах 10 или 100 мкг mRNA-1273 приводила к выработке нейтрализующих антител в титрах в 12 и 84 раза выше, чем в сыворотке человека, перенесшего COVID-19. Доза в 100 мкг защищала от репликации SARS-CoV-2 как в верхних (нос), так и в нижних (легкие) дыхательных путях [Corbett et al., 2020b]. Для оценки безопасности и иммуногенности компания Moderna провела I фазу КИ на здоровых взрослых добровольцах 18–55 лет. Исследовали три дозы вакцины 25, 100 или 250 мкг, которые вводили с интервалом в четыре недели [Jackson et al., 2020]. Более чем у половины участников были зарегистрированы ожидаемые нежелательные явления, включая боль в месте введения, головную боль, усталость, миалгию и озноб [Jackson et al., 2020]. Системные нежелательные явления были более частыми после второй вакцинации, особенно при самой высокой дозе, в частности лихорадка. Ни у одного участника не было лихорадки после первой вакцинации, тогда как после второй инъекции у 40% из группы с дозой 100 мкг и 57% из группы с дозой 250 мкг отмечалась лихорадка (38–38,9°C), а также один сильный приступ лихорадки (39,0–40,0°C) в группе 250 мкг [Jackson et al., 2020]. В целом вакцина имела «умеренную» степень реактогенности: реактогенность после одной дозы зарегистрирована у 54,9% участников (по сравнению с 42,2% в группе

плацебо), и этот показатель увеличился до 79,4% после второй дозы (по сравнению с 36,5% в группе плацебо). Серьезные нежелательные явления были редкими, а их частота была аналогична частоте в группе плацебо. Дозы 25 мкг и 100 мкг вызывали средние геометрические титры нейтрализующих антител и были сопоставимы или превышали титр в сыворотке выздоравливающих людей [Jackson et al., 2020]. Кроме того, проводилась I фаза КИ с участием пожилых людей, которые получили две инъекции по 25 или 100 мкг mRNA-1273 с интервалом в четыре недели [Anderson et al., 2020]. В этом исследовании показано, что нежелательные явления в основном были легкими или умеренными и были аналогичны профилю безопасности у молодых людей в возрасте 18–55 лет. Иммуногенность также была аналогичной [Anderson et al., 2020]. Данные иммуногенности через четыре месяца после первой вакцинации показали, что среднее значение нейтрализующих антител оставалось на высоком уровне, что указывает на стойкий гуморальный иммунный ответ [Widge et al., 2021]. Эффективность вакцины для лиц в возрасте 18 лет и старше была исследована в КИ III фазы, где показана 94,1% защита в предотвращении заболевания COVID-19, включая тяжелое заболевание [Baden et al., 2021].

Вакцина BNT162b2, разработанная компаниями BioNTech и Pfizer, представляет собой мРНК, кодирующую стабилизированную форму полноразмерного S-белка вируса SARS-CoV-2, инкапсулированную в липидные наночастицы. Для оценки профиля безопасности и иммуногенности BNT162b2 среди здоровых взрослых в возрасте 18–85 лет было проведено КИ I-II фазы в США [Walsh et al., 2020]. Результаты исследования показали, что BNT162b2 хорошо переносится и демонстрирует небольшую частоту и тяжесть системных явлений. Титры нейтрализующих антител были сопоставимы или превышали титры сывороток выздоравливающих людей [Walsh et al., 2020]. Результаты КИ III фазы продемонстрировали 95% эффективность в предотвращении заболевания COVID-19 [Polack et al., 2020]. Частота и серьезность нежелательных явлений были низкими и одинаковыми в вакцинированной группе и группе плацебо [Polack et al., 2020].

Таким образом, в КИ III фазы мРНК-вакцины оказались чрезвычайно эффективными: ранняя эффективность вакцины BNT162b2 составила 95%, а вакцины мРНК-1273 – 94%. Через 6 месяцев после вакцинации эти значения были 91 и 93% [Thomas et al., 2021; Baden et al., 2021].

Каждая из векторных вакцин одобрена Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA), Национальным управлением медицинской продукции Китая, Министерством здравоохранения России и/или ВОЗ. К вакцинам на основе аденовирусных векторов относятся: вакцина JNJ-78436735 или Ad26.COV2.S разработанная компанией Janssen/Johnson & Johnson, вакцина AZD-1222 или ChAdOx1 nCoV-19, разработанная Оксфордским университетом и компанией AstraZeneca, и вакцина «Convidecia» или Ad5-nCoV производства CanSino.

Вакцина JNJ-78436735 основана на репликативно-дефектном аденовирусе человека 26 серотипа, экспрессирующем ген стабилизированного белка S вируса SARS-CoV-2 с удаленным сайтом расщепления фурином [Mercado et al., 2020; Hsieh et al. 2020]. По результатам доклинических исследований иммунизация макак-резус дозой 10^{11} вирусных частиц (в.ч.) приводила к формированию высокого уровня специфических IgG антител, в том числе вируснейтрализующих, индуцировала CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный ответ и защищала животных от заражения SARS-CoV-2 [Mercado et al., 2020]. В исследованиях на хомяках вакцина показала высокую иммуногенность и протективность [Tostanoski et al., 2020]. У иммунизированных животных наблюдали устойчивые гуморальные и клеточные ответы. Клиническое исследование проводилось в 17 странах, включая США, Южную Африку, Мексику, Перу, Аргентину, Чили и др. Данные клинических исследований доказали от 57% (в Южной Африке) до 72% (в США) эффективность против COVID-19 от умеренного до тяжелого или критического течения. В частности, 72% эффективность была показана в клинических исследованиях в США, где доказана полная защита вакцинированных добровольцев от госпитализаций, связанных с COVID-19. В группе

вакцинированных не было зарегистрировано ни одного летального случая, связанного с COVID-19 [Sadoff et al., 2021]. Однако с марта 2021 года стали появляться сообщения о случаях тромбоза и тромбоцитопении у людей после вакцинации, а термин «вакцино-индуцированная иммунная тромботическая тромбоцитопения» (ВИТТ) получил наиболее широкое распространение для описания этого опасного для жизни синдрома [Yocum, Simon, 2021; Hwang et al., 2021; Warkentin, Pai, 2021]. Это привело к тому, что FDA рекомендовало приостановить использование вакцины Ad26.COV2.S¹. Согласно отчету консультативного комитета США по практике иммунизации (Advisory Committee on Immunization Practices – ACIP)² за декабрь 2021 года частота возникновения ВИТТ после вакцинации Ad26.COV2.S составила 1 случай на 263 тысячи введенных доз и относится к серьезным побочным эффектам. Дальнейшее применение вакцины было разрешено в соответствии с рекомендациями, выпущенными международным сообществом медицинских специалистов³ с целью повышения осведомленности врачей об особенностях данного осложнения.

Вакцина AZD1222, ранее называвшаяся ChAdOx1 nCoV-19, также известна под названиями «Oxford-AstraZeneca», «Covishield» и «Vaxzevria». Вакцина AZD1222 основана на репликативно-дефектном аденовирусе шимпанзе изолята Y25 (ChAdY25). В качестве целевого гена этот вектор кодирует лидерную последовательность активации тканевого плазминогена (tPA), слитую с 5'-концом оптимизированной последовательности S-белка вируса SARS-CoV-2 [van Doremalen et al., 2020]. Показано, что ChAdOx1 nCoV-19 обладает высокой иммуногенностью у мышей и нечеловеческих приматов, индуцируя формирование специфических антител, а также антиген-специфических ИФНγ-продуцирующих CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. Однократная вакцинация или двукратная в режиме прайм-буст защищает от инфекции нижних дыхательных путей после последующего заражения SARS-CoV-2 [van Doremalen et al., 2020].

¹ URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/joint-cdc-and-fda-statement-johnson-johnson-covid-19-vaccine>.

² URL: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/112667>.

³ Guidance produced from the Expert Haematology Panel (EHP) focussed on Covid-19 Vaccine induced Thrombosis and Thrombocytopenia (VITT).

Помимо мышей и макак-резус, вакцину ChAdOx1 nCoV-19 испытывали также на хорьках, у которых она индуцировала формирование нейтрализующих антител как против исходного штамма Wuhan-Hu-1, так и против варианта D614G, а также снижала выделение вируса SARS-CoV-2 после заражения [Marsh et al., 2021]. КИ показали, что вакцина имеет приемлемый профиль безопасности и была менее реактогенна у пожилых людей в сравнении с молодыми. Во всех возрастных группах вакцина индуцировала специфический адаптивный иммунный ответ через 28 дней после однократного введения. При введении второй дозы наблюдался бустерный эффект [Ramasamy et al., 2021; Folegatti et al., 2020]. КИ III фазы, проведенные в Великобритании, Бразилии и Южной Африке показали различную эффективность вакцины AZD1222. Эффективность против симптоматического заболевания при однократном введении составила 64,1% и 70,4% после двукратного применения [Voysey et al., 2021].

Так же как и в отношении вакцины Ad26.COV2.S Johnson & Johnson в феврале 2021 года стали появляться сообщения о том, что у людей, начиная с 5-го по 20-й дней после вакцинации AZD1222 развивался ВИТТ: тромбоз венозного синуса головного мозга, тромбоз висцеральных вен и другие необычные тяжелые тромботические явления в сочетании с тромбоцитопенией [Greinacher et al., 2021; Scully et al., 2021; Schultz et al., 2021]. Опубликованные оценки риска ВИТТ варьируются от 1 случая на 26 500 первых введенных доз ChAdOx1 nCoV-19 (сообщено в Норвегии) до 1 случая на 127 300 первых введенных доз ChAdOx1 nCoV-19 (сообщено в Австралии) [Schultz et al., 2021]. Данные, полученные в Великобритании, показывают, что риск ВИТТ после второй дозы вакцины AstraZeneca ниже, чем после первой дозы, и оценивается в 1 случай на 518181 вторых введенных доз ChAdOx1 nCoV-19¹. Обе вакцины (ChAdOx1 nCoV-19 и Ad26.COV2.S) производятся на человеческих клеточных линиях: ChAdOx1 nCoV-19 на клетках T-REx-293 (производная клеточная линия от HEK293), а Ad26.COV2.S на клетках PER.C6 TetR (человеческие эмбриональные клетки сетчатки).

¹ URL: <https://www.cbc.ca/news/health/astrazeneca-vaccine-paused-canada-blood-clot-vitt-1.6022821>.

Было показано, что вакцина ChAdOx1 nCoV-19 содержит большое количество белков клетки-хозяина, что, скорее всего и является причиной развития ВИТТ [Greinacher et al., 2021; Krutzke et al., 2021]. Одна доза вакцины ChAdOx1 nCoV-19 (500 мкл) содержит 19,1–33,8 мкг белков клетки-хозяина (54%), а для вакцины Ad26.COV2.S этот показатель равен 0,04–0,19 мкг (1,5%) [Michalik et al., 2022].

Вакцина Ad5-nCoV компании CanSino основана на репликативно-дефектном аденовирусе человека 5 серотипа и так же, как и вакцина ChAdOx1 nCoV-19 в качестве целевого гена содержит лидерную последовательность tPA, слитую с 5'-концом оптимизированной последовательности S-белка вируса SARS-CoV-2 [Wu et al., 2020; Zhu et al., 2020a].

В ДКИ показано, что при внутримышечном и интраназальном путях введения вакцина индуцирует выработку специфических антител, в том числе нейтрализующих. У мышей при внутримышечном введении детектированы ИФН γ -, ФНО α - или ИЛ-2-продуцирующие CD8⁺ Т-клетки. Вакцинированные животные были полностью защищены от SARS-CoV-2 [Wu et al., 2020; Feng et al., 2020].

В ходе I фазы КИ было проанализировано три дозы вакцины Ad5-nCoV (5×10^{10} , 1×10^{11} и $1,5 \times 10^{11}$ в.ч.) на добровольцах в возрасте 18–60 лет и было показано, что доза вакцины $1,5 \times 10^{11}$ в.ч. является более реактогенной. Во всех исследуемых дозах вакцина индуцирует RBD-специфические и SARS-CoV-2-нейтрализующие антитела, а также специфические Т-клетки, продуцирующие ИФН γ [Zhu et al., 2020b].

Также в этом исследовании показано, что пациенты, имеющие преysуществующие антитела к Ад5 в титре $\geq 1:200$, имели в среднем более низкие уровни иммунного ответа, чем пациенты с преysуществующими антителами к Ад5 в титре $< 1:200$. В ходе II фазы КИ с большим числом участников дополнительно проверялась иммуногенность и безопасность анализируемых в I фазе доз вакцины. Полученные данные показали, что дозы 5×10^{10} и 1×10^{11} в.ч. являются менее реактогенными и индуцируют сопоставимые уровни

гуморального и клеточного ответа, поэтому для дальнейшего исследования была выбрана доза 5×10^{10} в.ч. [Zhu et al., 2020a]. III фаза КИ проводилась в Аргентине, Чили, Мексике, Пакистане и Российской Федерации. В общей сложности 61,3% получателей вакцины и 20,0% получателей плацебо сообщили о нежелательных явлениях в месте инъекции ($p < 0,0001$), из которых наиболее частой была боль, о которой сообщили 59,0% получателей вакцины и 19,0% получателей плацебо. Вакцина обладала благоприятным профилем безопасности: 63,5% из группы вакцинированных и 46,4% из группы плацебо сообщили о нежелательном явлении, из которых наиболее распространенной была головная боль [Halperin et al., 2021]. Эффективность вакцины Ad5-nCoV против симптоматического COVID-19 составила 65,7%. Против тяжелого заболевания вакцина была эффективна на 91,7% (начиная с 28 дня после вакцинации) и на 96,0% – через 14 дней после вакцинации [Halperin et al., 2021].

1.4 ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ПРАЙМ-БУСТ ВАКЦИНАЦИЯ

Цель вакцинации – вызвать длительную иммунную память, чтобы обеспечивать защиту от инфекции или предотвратить заболевание в случае контакта с патогеном. Для достижения эффективной вакцинации обычно требуется многократная иммунизация. Традиционно одни и те же вакцины вводятся несколько раз. Такой подход называется гомологичной прайм-буст иммунизацией. Повторные введения одной и той же вакцины показали себя очень эффективными в усилении гуморального иммунного ответа, при этом оказались менее эффективными в усилении клеточного иммунитета [Ramshaw, Ramsay, 2000]. Проведенные за последние несколько десятилетий исследования продемонстрировали, что вакцинацию в режиме прайм-буст можно проводить с помощью различных типов или компонентов вакцин, содержащих одни и те же антигены – гетерологичная прайм-буст иммунизация [Excler, Plotkin, 1997; Ramshaw, Ramsay, 2000; Lu, 2006; Zagury et al., 1988]. Во многих случаях такая стратегия вакцинации по результатам доклинических и клинических

исследований оказалась наиболее эффективной в формировании высоких уровней Т-клеток памяти [Dunachie, Hill, 2003; Alekseeva, 2009]. Преимущества гетерологичной прайм-буст иммунизации заключаются в том, что: а) различные свойства вакцин имеют важное значение для индукции различных иммунных ответов; б) использование вакцин на основе разных технологических платформ приводит к снижению действия иммунитета к компонентам вакцины, которую использовали для праймирования; в) происходит индукция Т-клеток против наиболее иммунодоминантных эпитопов антигена [Kardani et al., 2016].

Цель гетерологичной прайм-буст вакцинации заключается в том, чтобы объединить иммунологические свойства различных вакцин и тем самым вызвать более сильный и сбалансированный гуморальный, клеточный и, в некоторых случаях, мукозальный иммунный ответ [Meng et al., 2013]. Кроме того, эта стратегия перенаправляет иммунный ответ на антигены, а не на векторы. Например, субъединичные вакцины вызывают формирование преимущественно гуморального иммунного ответа, в то время как рекомбинантные векторные вакцины и ДНК-вакцины являются эффективными средствами для индукции клеточного иммунитета [Nascimento, Leite, 2012]. Изучение стратегии гетерологичной прайм-буст иммунизации с использованием различных вакцин началось в 1992 году [Hu et al., 1992]. В этом исследовании на модели нечеловеческих приматов *Macaca fascicularis* было показано, что первичная иммунизация рекомбинантным вирусом коровьей оспы, экспрессирующим антиген gp160 вируса иммунодефицита обезьян (SIV), а затем бустирующая иммунизация этим же белком защищала животных от заражения SIV. Чуть ранее на грызунах этот коллектив авторов продемонстрировал, что праймирование живым рекомбинантным вирусом и бустирование субъединичным рекомбинантным белком были более эффективными, чем иммунизация одним иммуногеном [Hu et al., 1991]. В 1993 году Ли и соавт. продемонстрировали усиление клеточного иммунного ответа против малярии при использовании для праймирования и бустирования двух различных вирусных векторов [Li et al., 1993].

Существуют различные стратегии гетерологичной прайм-буст иммунизации: а) ДНК/вирусный вектор (праймирование ДНК-вакциной, бустирование с использованием вирусного вектора); б) вирусный вектор/вирусный вектор (использование для праймирования и бустирования вирусных векторов на основе разных технологических платформ); в) ДНК/белок или белок/ДНК (праймирование ДНК-вакциной, бустирование белковой вакциной или наоборот); г) белок/вирусный вектор или вирусный вектор/белок (праймирование белковой вакциной, бустирование с использованием вирусного вектора и наоборот); д) праймирование ДНК-вакциной или векторной, бустирование вирусоподобными частицами.

Применение подхода ДНК/вирусный вектор фокусируется в первую очередь на индукции Т-клеточного иммунного ответа. К вирусным векторам, которые используются в качестве буста, относятся аденовирусы, вирус осповакцины и вирус везикулярного стоматита [Vinner et al., 2003; Day, Kublin, 2013; Seaman et al., 2005; Hammond et al., 2001; Barouch et al., 2003; Egan et al., 2005; Makitalo et al., 2004; Allen et al., 2000; Nkolola et al., 2004]. Например, результаты клинических исследований в отношении вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) показывают, что праймирование ДНК-вакциной и бустирование поксвирусным вектором индуцируют полифункциональные и длительные Т-клеточные ответы на кодируемый антиген [Harari et al., 2008; Goepfert et al., 2011]. Однако такая стратегия не позволила индуцировать достаточно высокие уровни специфического иммунитета, необходимого для защиты, ни в доклинических, ни в клинических исследованиях [Ramshaw, Ramsay, 2000].

По мере разработки новых технологических платформ на основе рекомбинантных вирусов они начали тестироваться в стратегии прайм-буст иммунизации. Было показано, что использование различных вирусных векторов является эффективным подходом в борьбе с ВИЧ-инфекцией, позволяет обойти иммунный ответ к вектору и усиливает антиген-специфический иммунитет. На сегодняшний день в стратегии гетерологичной прайм-буст иммунизации на основе вирусных векторов протестированы модифицированный вирус

осповакцины Анкара (MVA), вирус оспы птиц, аденовирус (Ад), вирус гриппа и вирус везикулярного стоматита (VSV) [Gherardi et al., 2003; Gonzalo et al., 1999; Clements-Mann et al., 1998; Paris et al., 2010; Li et al., 1993]. Применение схемы вирус гриппа/вирус везикулярного стоматита или вирус осповакцины вызывало увеличение специфического иммунного ответа против ВИЧ-1 [Nakaya et al., 2003, Gonzalo et al., 1999].

Перспективность данного подхода показана и для других инфекционных заболеваний. На сегодняшний день самые передовые вакцины против БВВЭ прошли многочисленные клинические исследования и применяются в режиме гетерологичной прайм-буст вакцинации [Anywaine et al., 2019; Ewer et al., 2016; Tapia et al., 2016; Capone et al., 2013; Dolzhikova et al., 2017]. Наиболее эффективные платформы включают векторы на основе вируса везикулярного стоматита, аденовирусов человека 5, 26 серотипов и аденовируса шимпанзе, а также на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара [Matz et al., 2019]. Сочетание этих векторов реализовано в следующих схемах вакцинации: VSV/Ад5, Ад26/MVA и ChАд3/MVA. Результаты КИ показали, что все указанные схемы гетерологичной прайм-буст иммунизации вызывали более сильный В- и Т-клеточный иммунный ответ, а также обеспечивали значительное преимущество в отношении длительности сформированного иммунитета по сравнению с однократной или гомологичной вакцинацией [Venkatraman et al., 2018; Tapia et al., 2016; Dolzhikova et al., 2017; Milligan et al., 2016; Mutua et al., 2019]. Несмотря на то, что разработанные вакцины одобрены для клинического применения как региональными регуляторами, так и FDA, продолжаются разработки новых препаратов. Использование сначала вектора на основе аденовируса человека 5 серотипа, а затем вектора на основе вируса болезни Ньюкасла штамма LaSota также оказалось эффективным подходом для стимуляции специфического иммунитета против БВВЭ [Zhao et al., 2021].

Другим вариантом стратегии гетерологичной прайм-буст вакцинации для усиления антиген-специфических ответов служит использование вирусных векторов из одного семейства, но разных видов, например аденовирусов. На

сегодняшний день известно более 110 генотипов аденовирусов человека, которые разделены на семь видов. В ходе многочисленных испытаний вакцин на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа вида *Mastadenovirus caesari* (ранее называлась подгруппа С) показано не только формирование широкого гуморального и мощного клеточного иммунного ответа, но и защитная эффективность на различных животных моделях [Sullivan et al., 2000; Sullivan et al., 2003]. Поэтому кандидатные вакцины на основе Ад5 проходят широкомасштабные клинические исследования [Kim et al., 2018; Liebowitz et al., 2020; Peters et al., 2013; McIlwain et al., 2021; Zhu et al., 2020; Wu et al., 2017; Zhu et al., 2015; Shiver, Emini, 2004; Catanzaro et al., 2006; Graham et al., 2006; Koup et al., 2010]. Однако по результатам проведенных клинических исследований стал очевиден лимитирующий фактор использования Ад5 вектора для вакцинации. Это наличие вектор-специфических нейтрализующих антител у людей в результате естественно перенесенной аденовирусной инфекции, особенно в странах Африки и Юго-Восточной Азии [Barouch et al., 2011]. Не только в доклинических исследованиях на мышах и макаках-резусах, но и в клинических исследованиях было показано существенное подавление иммуногенности вакцин на основе Ад5 против ВИЧ-1 при наличии предсуществующего иммунитета [Sumida et al., 2004; Casimiro et al., 2003; McCoy et al., 2007; Catanzaro et al., 2006]. Кроме того, наличие нейтрализующих антител у большого процента людей характерно для всех аденовирусов вида *Mastadenovirus caesari*, включая 1, 2 и 6 серотипы. Поэтому в последнее десятилетие акцент сместился на использование стратегии гетерологичной прайм-буст иммунизации, сочетающей применение серотипов аденовирусов с низкой серопревалентностью (редко встречающихся в человеческой популяции) с Ад5, что позволяет преодолевать супрессивные эффекты предсуществующего иммунитета [Barouch et al., 2004; Abbink et al., 2007; Mast et al., 2010]. Учитывая большое разнообразие серотипов аденовирусов в природе, потенциально доступно множество различных вариантов. При этом оптимальные серотипы аденовирусных векторов для включения в такую схему вакцинации достоверно не определены. Однако они должны быть не только

высокоиммуногенными как в присутствии, так и при отсутствии предсуществующего иммунитета к Ад5, но и быть иммунологически разными, чтобы избежать действия перекрестно-реактивных вектор-специфических вируснейтрализующих антител. В связи с этим оптимальным является использование аденовирусов, относящихся к разным видам. Одним из первых альтернативных векторов стали применять аденовирус человека 35 серотипа (Ад35) вида *Mastadenovirus blackbeardi* (ранее называлась подгруппа В) [Nanda et al., 2005; Ophorst et al., 2006]. Ад35 векторы демонстрируют эффективную трансдукцию дендритных клеток человека и, таким образом, обладают способностью обеспечивать высокий уровень доставки и презентации антигена [de Gruijl et al., 2006; Lore et al., 2007]. При разработке вакцин против ВИЧ было показано, что при использовании схемы Ад35/Ад5 происходит эффективное праймирование и усиление гуморального иммунного ответа. Однако результаты крупных клинических исследований не смогли продемонстрировать протективную эффективность [Buchbinder et al., 2008; Gray et al., 2010; Gray et al., 2011; McMichael et al., 2013]. В другом исследовании показана иммуногенность вектора на основе аденовируса человека 11 серотипа (Ад11) вида *Mastadenovirus blackbeardi* в гетерологичной стратегии прайм-буст иммунизации в комбинации с Ад5 или Ад35 [Lemckert et al., 2005].

Следующим альтернативным серотипом, который начали изучать, стал аденовирус человека 26 серотипа (Ад26), который представляет собой интересный вектор, учитывая его способность индуцировать иммунный ответ у мышей [Abbink et al., 2007], нечеловеческих приматов [Liu et al., 2008; Liu et al., 2009] и людей [Barouch, 2009]. В исследованиях на модели нечеловеческих приматов векторы на основе Ад26 в сравнении с векторами на основе Ад5 индуцируют более широкий и полифункциональный клеточный иммунный ответ [Liu et al., 2008]. Ад26 продемонстрировал многообещающие результаты в ДКИ вакцины против ВИЧ [Barouch et al., 2015; Barouch et al., 2013; Stephenson et al., 2016]. Показано, что сочетание Ад26 с другими серотипами аденовирусов особенно подходит для усиления иммуногенности вакцин на их основе.

Гетерологичная иммунизация с использованием Ад26/Ад35 векторов против ВИЧ-1 на модели нечеловеческих приматов и в клинических исследованиях I фазы показала формирование высокого уровня антител [Baden et al., 2016]. Liu J. и соавторы показали, что прайм-буст вакцинация Ад26/Ад5 вызывает более сильные и полифункциональные клеточные иммунные ответы по сравнению с гомологичной вакцинацией Ад5/Ад5, а также может обеспечивать защиту от инфекции. Их результаты также демонстрируют важные различия в порядке использования Ад5 вектора. Показано, что Ад26 и Ад35 являются эффективными векторами для праймирования иммунного ответа, а бустирование аденовирусом альтернативного серотипа или Ад5 приводит к значительному усилению вторичного эффекторного ответа [Liu et al., 2009]. Гетерологичные схемы прайм-буст иммунизации, включающие использование Ад26, продолжают изучаться как при разработке вакцин против ВИЧ, так и против других инфекционных заболеваний. Так, например, иммунизация rAd26/rAd35 против вируса Эболы приводит к эффективному повышению гуморального и клеточного иммунного ответа и обеспечивает 100% защиту животных [Geisbert et al., 2011]. При этом однократная иммунизация вектором на основе Ад26 оказалась более эффективной, чем на основе Ад35, опосредуя выживание до 75% вакцинированных макаков при заражении их самой высокой дозой вируса Эболы. Разработанная у нас в России комбинированная векторная вакцина для профилактики БВРС на основе Ад26 и Ад5 показала формирование напряженного длительного поствакцинального гуморального иммунного ответа у грызунов и приматов и была протективна [Ковыршина и соавт., 2020]. Данная кандидатная вакцина успешно прошла I-II фазу клинических исследований.

Помимо аденовирусов человека в настоящее время активно исследуются аденовирусы приматов, в частности аденовирусы обезьян [Ожаровская и соавт., 2023; Dicks et al., 2012; Abbink et al., 2015; Reyes-Sandoval et al., 2004; Tatsis et al., 2007]. Новые векторы на основе аденовируса обезьян 23 серотипа (SAд23) и аденовируса человека 49 серотипа (Ад49) были исследованы в качестве кандидатной вакцины против COVID-19 в стратегии гетерологичной прайм-буст

иммунизации. Эксперименты на мышах и макаках показали, что вакцинация SAд23/Ад49 обеспечивает не только высокие уровни гуморального и клеточного иммунного ответа, но также формирует длительный и стойкий нейтрализующий гуморальный ответ против SARS-CoV-2. Гетерологичная прайм-буст иммунизация векторами на основе SAд23 и Ад49 имеет потенциальное преимущество, заключающееся в том, что ранее существовавший иммунитет к Ад5 вектору не влияет на первичную вакцинацию или последующее бустирование. Кроме того, для достижения эффективного иммунитета использовалась относительно низкая доза этих векторов (2×10^{10} в.ч.), что позволило уменьшить побочные реакции (никаких явных клинических симптомов или гистопатологических изменений не наблюдалось) [Luo et al., 2021].

В другом исследовании на макаках-резусах сравнили гетерологичную схему прайм-буст иммунизации с использованием двух векторов на основе аденовируса обезьян 68 (SAд68) и 1 (SAд1) серотипов, экспрессирующих антигены ВИЧ-1, с гомологичной схемой прайм-буст иммунизации, в которой дважды использовали вектор на основе Ад5. Существенной разницы в иммунном ответе не наблюдалось, однако наличие предиммунитета к Ад5 не влияло на индукцию иммунитета векторами на основе аденовирусов обезьян, в отличие от Ад5 [McCoy et al., 2007].

Недавно были исследованы векторы на основе аденовирусов макак-резус (RhАд), относящихся к виду *Mastadenovirus russelli* (ранее называлась подгруппа G). Серотипы аденовирусов вида *Mastadenovirus russelli* остаются плохо охарактеризованными по сравнению с другими серотипами. Только один аденовирус человека отнесен к этой подгруппе – аденовирус 52 серотипа (Ад52). Все остальные представлены аденовирусами макак-резус: серотипы 51-66 [Abbink et al., 2018]. Abbink P. и соавторы разработали векторы на основе трех серотипов аденовирусов макак-резус (RhАд51, RhАд52 и RhАд53) и оценили иммуногенность этих векторов у мышей. Векторы RhАд51, RhАд52 и RhАд53 экспрессировали целевые антигены и индуцировали гуморальный и клеточный иммунный ответ, сравнимый с иммунным ответом, наблюдаемым у Ад5, Ад26 и Ад35 [Abbink et al., 2015]. Несколько лет спустя они развили эту работу и оценили

иммуногенность этих векторов в гетерологичных схемах прайм-буст иммунизации. Было продемонстрировано, что RhAd-векторы обладают высокой иммуногенностью при наличии высоких уровней предсуществующего иммунитета к аденовирусам человека и могут быть объединены в эффективные схемы гетерологичной прайм-буст иммунизации с использованием как аденовирусов человека, так и аденовирусов макак-резус [Iampietro et al., 2018].

На основании не только высокого уровня, но и длительного антиген-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа в результате гетерологичной прайм-буст иммунизации, доказано, что такой режим вакцинации является оптимальным для формирования долгосрочного иммунитета.

Гетерологичная прайм-буст иммунизация с использованием как традиционных, так и новых подходов к вакцинации открывает значительные возможности для выявления уникальных иммунных ответов, позволяющих повысить иммуногенность и/или протективность.

1.5 АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ КАК ОСНОВА ВАКЦИН

Технологическая платформа на основе аденовирусных векторов (rAd) представляет собой универсальную платформу для разработки вакцинных препаратов благодаря их высокоиммуногенным свойствам, способным индуцировать различные иммунные ответы. Преимущества аденовируса в качестве вектора заключаются в хорошо изученном строении генома, который позволяет легко проводить молекулярно-генетические манипуляции, что привело к разработке эффективных систем конструирования. Кроме того, показано, что геном rAd стабилен при непрерывном пассировании в культуре клеток. Широкий клеточный тропизм и способность проникать как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки обеспечивают большой трансдуцирующий потенциал вектора [Черенова и соавт., 2017; Lee et al., 2017; Bangari et al., 2005]. Препараты на основе этой платформы обладают доказанным профилем безопасности и иммуногенности, характеризуются термостабильностью и длительным сроком

хранения [Kerstetter et al., 2020; Sayedahmed et al., 2019]. Современные технологии получения рекомбинантных аденовирусных векторов, которые развивались на протяжении многих лет, являются масштабируемыми, что позволяет экономически эффективно производить препараты в короткие сроки, предлагая миллиарды доз вакцины для клинического применения [Bangari, Mittal, 2006; Kerstetter et al., 2020; Sayedahmed et al., 2019].

Технология получения rAd основана на первом поколении векторов, которые были получены в результате удаления E1 и E3 областей вирусного генома. Делеция E1 области и замена ее экспрессирующей кассетой с целевым геном необходима для получения репликативно-дефектных векторов, так как эта область кодирует белки, участвующие в репликации вируса и экспрессии других ранних и поздних генов. В результате делеции аденовекторы не транскрибируют другие ранние и поздние вирусные белки в клетках-хозяевах. Этот факт способствует высокой экспрессии трансгена и представлению его молекулами МНС класса I, необходимыми для устойчивого иммунного ответа против трансгена [Yang et al., 1994a; Yang et al., 1994b]. Размножение E1-делетированного вектора происходит в специальных клеточных линиях, таких как 293, 911 или PER.C6, которые конститутивно экспрессируют продукты удаленной E1 области аденовируса [Graham et al., 1977; Fallaux F et al., 1996; Fallaux F et al., 1998]. Дальнейшее удаление E3 области обеспечивает увеличение пакующей емкости (около 8000 п.н.) и улучшение иммуногенных свойств вектора, поскольку белки E3 участвуют в подавлении механизмов клеточного иммунного ответа при попытке аденовируса ускользнуть от иммунной системы хозяина [Danthinne, Imperiale, 2000].

Аденовирусные векторы второго поколения обладают большей пакующей емкостью (около 10000 п.н.) за счет дополнительной делеции E2 и E4 областей генома и более длительной экспрессией трансгенов. Однако такие векторы характеризуются сниженной способностью к репликации в производственных клеточных линиях, что обуславливает уменьшение общего выхода рекомбинантного вируса [Wang, Finer, 1996].

Аденовирусные векторы третьего поколения обладают максимальной пакующей емкостью (около 36000 п.н.), так как содержат только сигнал упаковки и последовательности инвертированных концевых повторов [Kochanek et al., 1996; Parks et al., 1996]. Такие векторы являются хелпер-зависимыми, при наращивании необходимо присутствие в клетке вируса-помощника, который обеспечивает наработку всех вирус-специфических белков, необходимых для репликации и сборки аденовируса.

Современные векторы на основе аденовирусов делят на две категории: дефектные по репликации и компетентные по репликации. Репликативно-дефектные векторы размножаются только в перmissive клеточной линии. При заражении неpermissive клеток такие векторы могут экспрессировать только закодированный в их геноме трансген. Синтез вирусных белков, а следовательно, и сборка вирусных частиц в этих клетках не происходит. Репликативно-компетентные векторы проходят полный жизненный цикл вируса, включая репликацию генома и продукцию вирусного потомства. Такие векторы подразделяют на условно-реплицирующиеся и векторы с одним циклом репликации. Условно-реплицирующиеся аденовирусные векторы разработаны в первую очередь для лечения опухолей [Bischoff et al., 1996; Fueyo et al., 2000; Doronin et al., 2001; Bauerschmitz et al., 2006; Shashkova et al., 2007]. Такие векторы способны реплицироваться только в опухолевых клетках в результате замены вирусных промоторов E1 или E4 на опухолеспецифичные или путем мутации белков E1A или E1B, что приводит к блокированию их способности взаимодействовать с клеточными белками pRB, p53 или p300. Аденовекторы с одним циклом репликации получают путем делеции гена белка IIIa – ключевого вирусного белка, участвующего в сборке функционального вириона. Такие векторы сохраняют способность реплицировать свою ДНК, но без образования вирусного потомства [Crosby, Barry, 2014; Crosby et al., 2015; Crosby, Barry, 2017].

Аденовекторы индуцируют сбалансированный В- и Т-клеточный иммунный ответ и сами по себе являются хорошими адъювантами, поскольку белковые компоненты аденовирусной частицы распознаются различными типами паттерн-

распознающих рецепторов (TLR-зависимые и TLR-независимые механизмы). Активация этих рецепторов влечет за собой выработку провоспалительных цитокинов [Lasaro, Ertl, 2009; Sayedahmed et al., 2020; Zhu et al., 2007]. Врожденный иммунный ответ инициируется уже на стадии взаимодействия вируса с клеточными рецепторами, то есть до начала экспрессии целевого антигена или репликации вируса. Это взаимодействие запускает передачу сигналов через ядерный фактор каппа В (NF-κB), что, в свою очередь, приводит к увеличению синтеза провоспалительных цитокинов и хемокинов [Doronin et al., 2012; Atasheva, Shayakhmetov, 2022; Liu et al., 2017]. Уровни экспрессии цитокинов и хемокинов зависят от вида животного и дозы вектора. На мышинной модели показано повышение уровней цитокинов и хемокинов через 0,5–3 ч после введения вектора, которые достигают пика через 6–12 ч с последующим снижением до нормального уровня к 7–10 дню [Atasheva, Shayakhmetov, 2022].

rAd содержат молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами, которые распознаются паттерн-распознающими рецепторами, такими как Toll-подобные рецепторы (TLR). TLR, участвующие в распознавании аденовирусов, включают TLR2, TLR4 и расположенный в эндосомах TLR9 [Appledorn et al., 2008; Appledorn et al., 2009]. Они активируют транскрипцию противовирусных генов, включая фактор транскрипции NF-κB, митоген-активированные протеинкиназы и интерферон-регуляторные факторы. Распознавание генома аденовируса в эндосомах макрофагов, фибробластов и миелоидных дендритных клеток TLR9, который обнаруживает неметирированные мотивы CpG, активирует фактор транскрипции NF-κB и запускает сигнальный каскад, приводящий к последующей экспрессии цитокинов и хемокинов [Häcker et al., 2000; Aderem, Ulevitch, 2000; Coughlan, 2020]. В плазмацитоидных дендритных клетках активация TLR9 сопровождается секрецией ИФН α через MyD88-зависимый путь [Zhu et al., 2007]. После стимуляции MyD88 рекрутирует рецепторную киназу 1, ассоциированную с рецептором ИЛ-1 (IRAK1), и фактор-6, ассоциированный с рецептором ФНО (TRAF6). Комплекс IRAK1/TRAF6 активирует MAP-киназы и регуляторный фактор интерферона 7, который затем перемещается в ядро и

индуцирует экспрессию ИФН I типа [Kawai et al., 2004; Honda et al., 2004]. Важно отметить, что способность аденовирусов одновременно активировать несколько MyD88-сигнальных путей способствует высокой иммуногенности вакцин. Кроме того, гипервариабельная область, расположенная в аденовирусном гексоне, обладает сродством к факторам свертывания крови, зависящим от витамина К (факторы VII, IX и X) [Chéneau, Kremer, 2020]. Связанный с фактором X аденовирус инициирует опосредованный TLR4 врожденный ответ в мононуклеарных клетках [Doronin et al., 2012]. Активация врожденного иммунитета, опосредованная TLR-независимыми механизмами, управляется семействами факторов транскрипции IRF3, IRF7 и NF- κ B [Atasheva et al., 2019]. После разрыва эндосомальной мембраны аденовирусная ДНК активирует NOD-подобные рецепторы, которые являются важными компонентами цитозольной инфламмосомы NLRP3. Мультибелковый инфламмосомный комплекс активирует каспазу-1, что приводит к секреции интерлейкина-1 β (IL-1 β). IL-1 β через рецептор IL-1RI индуцирует сигнальные каскады провоспалительных цитокинов и хемокинов. Также к синтезу ИФН как в иммунных, так и в неиммунных клетках приводит распознавание цитозольной аденовирусной ДНК циклической гуанозинмонофосфат-АМФ-синтазой (cGAS) [Lam et al., 2014]. Связывание cGAS с ДНК активирует сигнальные пути с участием STING и киназы TBK1, что приводит к индукции IRF3-чувствительных генов, таких как интерфероны I типа [Burdette et al., 2011; Lam et al., 2014; Sun et al., 2013]. Экспрессия ИФН I типа обнаруживается через 4–6 ч после внутривенного введения вектора [Atasheva et al., 2019]. Кроме того, индукция ИФН I типа может ограничивать продолжительность экспрессии целевого гена в результате активации натуральных киллеров (NK), которые участвуют в быстрой элиминации клеток, трансдуцированных аденовектором [Zhu et al., 2008].

Профили врожденного иммунитета, индуцируемые аденовирусами различных серотипов, остаются на сегодняшний день достаточно плохо изученными. Показано, что вакцинации макак-резусов аденовекторами на основе Ад35, Ад26 и Ад48 индуцирует значительно больший врожденный клеточный

ответ, чем Ад5. В частности, Ад35, Ад26 и Ад48 индуцируют больше противовирусных (ИФН γ и ИП-10 (10 кДа белок, индуцированный ИФН γ)) и провоспалительных цитокинов (ИЛ-1РА (антагонист рецептора интерлейкина 1) и ИЛ-6) [Teigler et al., 2012]. В других исследованиях сообщалось, что в дендритных клетках человека Ад35 по сравнению с Ад5 индуцирует более высокие уровни ИФН γ и ИЛ-10, а также костимулирующих маркеров CD80 и CD40 [Loré et al., 2011, Adams et al., 2011].

Активация врожденного иммунитета параллельно с экспрессией антигена приводит к активации адаптивного В- и Т-клеточного иммунного ответа как к целевому антигену, так и к белкам аденовируса. После введения рекомбинантных аденовирусных векторов, несущих целевой антиген, последний начинает экспрессироваться как в неиммунных (мышечных клетках, фибробластах), так и в иммунных клетках (дендритных клетках, макрофагах). При экспрессии антигена неиммунными клетками происходит его поглощение АПК и перенос в дренирующие лимфатические узлы, что приводит к выработке специфических антител различных изотипов и подклассов [Jacobelli-Martinez, Nemerow, 2007; Coughlan, 2020; Lowenstein, Castro, 2003]. Экспрессия антигена в иммунных клетках (дендритных) с последующей его презентацией на МНС класса I и II и костимулирующих молекулах способствует активации и созреванию этих клеток, что впоследствии приводит к активации наивных Т-лимфоцитов с последующей дифференцировкой на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки [Lowenstein, Castro, 2003; Morelli et al., 2000]. Аденовекторы также опосредуют перекрестную презентацию антигена, явление, при котором АПК фагоцитируют антигены из других трансдуцированных клеток и посредством ретроградного транспорта презентуют их на молекулах МНС класса I [Amigorena, Savina, 2010]. Презентация антигена МНС I возможна и паренхиматозными клетками в месте инъекции [Bassett et al., 2011]. Затем АПК мигрируют в дренирующий лимфатический узел для презентации антигена наивным Т-лимфоцитам, что в дальнейшем приводит к их дифференцировке. Перекрестная презентация позволяет праймировать наивные Т-клетки, даже если дендритные клетки не были

непосредственно инфицированы. После иммунизации рекомбинантными аденовирусами целевой антиген становится доступен в дренирующих лимфатических узлах в течение нескольких месяцев [Yang et al., 2006; Tatsis et al., 2007]. Экспрессия антигена, которая необходима для поддержания Т-клеточного ответа в течение первых 2 месяцев после иммунизации, также приводит к сохранению популяции CD8⁺ Т-клеток [Finn et al., 2009].

Важно отметить, что параллельно с адаптивным иммунным ответом на целевой антиген индуцируются иммунные ответы к самому аденовирусу. Наличие аденовирус-нейтрализующих антител (Ад-ВНА) играет доминирующую роль в элиминации вируса. Помимо Ад-ВНА, критическую роль в клиренсе играет клеточный иммунитет, поскольку аденовирусные инфекции протекают более тяжело и иногда со смертельным исходом у пациентов с дисфункцией клеточного иммунитета [Flomenberg et al., 1994; Koneru B et al., 1987]. После трансдукции клеток, белки аденовирусного капсида подвергаются процессингу и представляются на АПК через молекулы МНС класса I и II, активируя CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки [Albert et al., 1998]. При этом, в отличие от Ад-ВНА, которые являются специфичными для каждого серотипа аденовируса, многие эпитопы аденовирусных белков, которые активируют Т-клетки, консервативны для аденовирусов внутри подгруппы [Smith et al., 1998]. CD4⁺ Т-клеточный эпитоп на гексоне аденовируса, H910-924, был идентифицирован как высококонсервативный эпитоп среди различных серотипов аденовирусов человека, а рентгенструктурный анализ показал, что он расположен в критической β-складчатой структуре, которая помогает формировать основу молекулы гексона [Olive et al., 2002; Rux, Burnett, 2000]. Распознавание этого эпитопа индуцирует активную пролиферацию Т-клеток [Tang et al., 2004]. Кроме того, четыре консервативных CD8⁺ Т-клеточных эпитопа на гексоне могут индуцировать перекрестный Т-клеточный иммунитет [Leen et al., 2004].

CD4⁺ и CD8⁺ специфические Т-клетки памяти к аденовирусным белкам существенно важны для долговременного клеточного иммунитета, который способствует быстрой экспансии этих клеток в ответ на выработку

противовирусных цитокинов и цитотоксических молекул после повторного заражения аденовирусом или иммунизации аденовектором [Kaech et al., 2003]. При этом только около 5–10% активированных Т-клеток станет долгоживущими Т-клетками памяти [Arens, Schoenberger, 2010]. Большинство специфических CD4+ Т-клеток обладают фенотипом центральной памяти, тогда как CD8+ Т-клетки проявляют эффекторный фенотип [Hutnick et al., 2010]. Такие специфические Т-клетки памяти обладают целым рядом функций, включая дегрануляцию и продукцию цитокинов [Loré et al., 2007].

Влияние иммунитета (предиммунитета) к аденовектору в результате перенесенной естественной инфекции или вакцинации на эффективность их дальнейшего применения может быть успешно преодолено путем использования менее распространенных серотипов аденовирусов человека, а также нечеловеческих аденовирусов.

На сегодняшний день аденовирусные векторы широко исследуются для разработки вакцин, и большое количество препаратов находится на различных стадиях КИ (таблица 2).

Таблица 2 – Вакцины на основе Ад векторов

Вектор	Против какого заболевания	1 фаза код (NCT...)	2 фаза код (NCT...)	3 фаза код (NCT...)
Аденовирус шимпанзе 3 серотипа (ChAd3)	Болезнь, вызываемая вирусом Эбола вида Заир	03583606 02289027 02267109	02289027	
	Болезнь, вызываемая вирусом Эбола вида Судан	04041570		
	Болезнь, вызываемая вирусом Марбург	03475056		
	Гепатит С	03688061		
Аденовирус шимпанзе изолята Y25 (ChAdOx)	COVID-19	04444674 04848441 04568031	04364035	04536051
	Гепатит В	04297917		
	Бешенство	04162600		

Вектор	Против какого заболевания	1 фаза код (NCT...)	2 фаза код (NCT...)	3 фаза код (NCT...)
	Грипп	01818362 01623518		
	Ближневосточный респираторный синдром	04170829 03399578		
	Лихорадка долины Рифт	04672824		
	Лихорадка чикунгунья и болезнь, вызываемая вирусом Зика	04440774 04015648		
	Лихорадка чикунгунья	03590392		
	ВИЧ-инфекция	04586673		
	Папилломавирусная инфекция	04607850		
Аденовирус человека 5 серотипа (Ад5)	ВИЧ-инфекция	00961883 00894114 00695877	00080106 00865566	
	Болезнь, вызываемая вирусом Эбола	02533791 02401373	02575456	
	COVID-19	04552366 04398147 04313127 04563702	04566770 04341389 04840992 04871841 04640233	04526990 04540419
	Болезнь, вызываемая вирусом Эбола вида Заир	02326194		
	Норовирусная инфекция	03897309 03125473 02868073		
	Грипп H1	03121339 01761123	02918006	
	Грипп H5N1	00755703		
	Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция	02830932		
	Аденовирус человека 26 серотипа (Ад26)	ВИЧ-инфекция	01103687 01215149 02315703 02935686 02788045 02919306 03307915 01103687 02218125	03929757 02598388 04186000 02416453 03060629 02788045 02919306

Вектор	Против какого заболевания	1 фаза код (NCT...)	2 фаза код (NCT...)	3 фаза код (NCT...)
		00618605		
	Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция	04354480 03795441 03606512 03303625 02440035 02561871	03303625 03334695 03502707	
	Грипп	03339713		
	Папилломавирусная инфекция	03610581	03610581	
	Болезнь, вызываемая вирусом Зика	03356561		
	Болезнь, вызываемая вирусом Эбола	02495246 02891980	04028349	02661464 04556526 02509494 04228783 02543567 02543268
	COVID-19	04436276 01215149 00851383 02099994	04535453 04686773 04684446 04453202 03606512 04765384 04713488 04871841 04640233	04614948 04642339 04505722 04741061 04838795
Аденовирус человека 35 серотипа (Ад35)	ВИЧ-инфекция	02366013	02099994	
	Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция	02561871 02440035		
Аденовирус человека 4 серотипа (Ад4)	Грипп H5N1	01443936 01006798		
	ВИЧ-инфекция	01806909 03878121 01989533 02771730 03408262		
Ad6NSmut	Гепатит С	01070407		
AdCh3NSmut	Гепатит С	01094873		
SC-Ad6	COVID-19	04839042		

Наиболее изученной системой для доставки генов является платформа на основе аденовируса человека 5 серотипа [Черенова и соавт., 2017а; Черенова и соавт., 2017б; Ginn et al., 2018]. В последние годы активное внимание исследователей было сосредоточено на разработке и изучении других серотипов аденовирусов человека (11, 26, 35), а также аденовирусов, выделенных от шимпанзе, крупного рогатого скота, собак и свиней [Abbink et al., 2007]. Существенные различия в биологических свойствах различных серотипов аденовирусов, включая различия в тропизме и запуске врожденных иммунных ответов, объясняют их иммунологические различия [Penaloza-MacMaster et al., 2013; Tan et al., 2013; Pillai et al., 2011].

1.6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Представленный обзор литературы отражает анализ данных современной отечественной и зарубежной литературы по проблеме COVID-19 и позволил обобщить имеющиеся сведения по общей характеристике вируса SARS-CoV-2 (его структуре, геномной организации и циклу репликации), разработке и применению вакцин для профилактики COVID-19, а также эффективности использования гетерологичной прайм-буст вакцинации.

Беспрецедентный масштаб пандемии COVID-19, унесшей жизни более 7 млн человек, показал острую необходимость в разработке вакцинных и терапевтических препаратов. 28 апреля (по результатам совещания с Президентом Российской Федерации, прошедшего 20 апреля, где были представлены основные перспективные разработки против SARS-CoV-2) Правительству РФ было дано поручение представить «план-график разработки вакцин для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19». С этого момента ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России перешел к изучению эффективности и безопасности существующих наработок в доклинических и клинических исследованиях.

Отсутствие безопасных и эффективных вакцин против COVID-19 явилось предпосылкой для проведения настоящего исследования, направленного на разработку комбинированной векторной вакцины на основе рекомбинантных вирусных векторов. При этом обоснована целесообразность применения аденовирусных векторов в режиме гетерологичной прайм-буст иммунизации, в рамках которой для праймирования и последующего бустирования иммунного ответа применяются разные, иммунологически непохожие вирусные векторы. Этот подход позволяет преодолеть возможное негативное влияние предсуществующего иммунитета к компонентам вектора, который вводится первым, и, таким образом, значительно увеличить силу и длительность иммунного ответа за счет более эффективного формирования клеток памяти.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Клеточные линии

Культура клеток НЕК 293 (клетки почки эмбриона человека, трансформированные аденовирусом человека 5 серотипа) и А549 (эпителиальные клетки аденокарциномы человека) получены из Российской коллекции клеточных линий позвоночных. Сертифицированная для производства вакцин суспензионная культура клеток НЕК 293 адаптирована к росту в бессывороточной среде CDM4НЕК293 (HyClone, США) с добавлением глутамина. Клетки Vero Е6 (эпителиальные клетки почки африканской зеленой мартышки) получены из АТСС, США (кат. номер CRL-1586).

2.1.2 Вирусы и бактериальные штаммы

В экспериментальной части работы были использованы лабораторные штаммы аденовируса человека 26 серотипа и аденовируса человека 5 серотипа, а также пандемический вирус SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 (hCoV-19/Russia/Moscow_PMVL-1/2020). Вирусы были получены из Государственной коллекции вирусов института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Работу с плазмидными векторами проводили в бактериальных клетках *Escherichia coli* лабораторных штаммов DH5 α (New England Biolabs, США) и BJ5183 (Stratagene, США).

2.1.3 Плазмидные векторы

Для получения рекомбинантных аденовирусов в работе использовали плазмиды на основе вектора pBR322, который получен из банка плазмид лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России.

2.1.4 Синтез нуклеотидных последовательностей

Праймеры и нуклеотидная последовательность полноразмерного гена белка S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1, оптимизированного под экспрессию в клетках млекопитающих, искусственно синтезированы в ЗАО «Евроген», Россия.

2.1.5 Лабораторные животные

Мыши линий C57BL/6 и BALB/c, получены из питомника ФИБХ РАН НПП «Питомник лабораторных животных г. Пущино». Трансгенные мыши K18-hACE2 (F1 потомство), полученные от скрещивания трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J (The Jackson Laboratory) с самками C57BL/6. Сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*) получены из питомника ФИБХ РАН НПП «Питомник лабораторных животных г. Пущино». Обезьяны вида обыкновенная игрунка (*Callithrix jacchus*) с подтвержденным статусом здоровья, рожденные и выращенные в условиях изолированного содержания в виварии, сертифицированном для работы с патогенами III–IV группы опасности, содержались в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Обезьяны вида макак-резус (*Macaca mulatta*), полученные из ФГБНУ «НИИ МП», содержались в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Содержание и обслуживание животных осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»; ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»; СП № 1045-73 по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев); «Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (2005), включая «Директиву Европейского Парламента и Совета 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года.

Работа с обезьянами вида обыкновенная игрунка была выполнена совместно с ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

Работа с обезьянами вида макак-резус была выполнена совместно с ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России.

Работа с животными была одобрена комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России (протокол № 9 от 16 апреля 2021 г., протокол № 24 от 21 апреля 2022 г.), Этическим комитетом ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (протокол №110520-1 от 11 мая 2020 г.).

2.1.6 Антитела и рекомбинантные белки

Для определения мышинных антигенспецифических антител (IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) использовали следующие вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: a9044, ab97240, ab97245, ab97250, ab97260 (Abscam, Великобритания). Для определения IgG антител обезьян использовали антитела кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, специфичные к IgG обезьяны (A2054, Sigma Aldrich, США). Для иммуноблотинга использовали антитела anti-human IgG HRP (A8667, MilliporeSigma, США). В работе использовали антитела, специфичные к маркерам CD3, CD4 и CD8, меченные флюорофорами для проточной цитофлюориметрии, фирмы BD Biosciences (США) (кат. номер 558431, 558625). Для повторной стимуляции иммунокомпетентных клеток *in vitro* использовали рекомбинантный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2 (Sino Biological, YP_009724390.1, КНР).

2.1.7 Реактивы и коммерческие наборы

В работе использовали рестриктазы, другие ферменты и соответствующие буферные растворы фирм Thermo Scientific (США), New England Biolabs (США), Promega (США).

Молекулярный вес фрагментов ДНК определяли с использованием маркеров молекулярного веса GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (SM#0313, Thermo

Fisher Scientific, США) и 1 kb DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия). В качестве стандарта молекулярных масс белков использовали Precision Plus Protein (Bio-Rad).

Для проведения электрофореза в агарозном геле использовали агарозу производства ПанЭко (Россия), бромистый этидий (PanReac AppliChem ITW Reagents, США) и 6X раствор с красителями для нанесения образцов ДНК на гель (Thermo Scientific, США). Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли набором для элюции ДНК из агарозного геля Cleanup Mini (Евроген, Россия).

Для приготовления растворов использовали соли и реактивы фирм Sigma (США, Германия), Serva (Германия), Merck (Германия), AppliChem (Германия, США), Диа-М (Россия) и ПанЭко (Россия).

Бактериальные клетки *E.coli* культивировали в жидких и агаризованных средах LB (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л), 2хYT (триптон 16 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, NaCl 5 г/л), SOB (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 0,5 г/л, 20 мМ MgSO₄) с использованием бакто-триптона, бактоагара и дрожжевого экстракта фирмы Difco (США).

Эукариотические клеточные линии культивировали в среде DMEM (минимальная среда Игла, модифицированная Дельбекко, NuClone, США) с добавлением 5% или 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота (NuClone, США), 25 мл 7,5 % бикарбоната натрия (ПанЭко, Россия), 146 мг L-глутамина (ПанЭко, Россия) и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия). Использовали раствор трипсин-ЭДТА 0,25% или 0,05% (ПанЭко, Россия).

Для очистки плазмидной ДНК использовали наборы Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) и QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Германия).

Для ПЦР использовали наборы ScreenMix-HS, qPCRmix-HS и qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Для постановки обратной транскрипции и ПЦР-РВ использовали набор реагентов OneTube RT-PCRmix (Евроген, Россия).

Тотальную РНК выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США). Тотальную ДНК выделяли набором Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, США).

Трансфекцию эукариотических клеток проводили с помощью Lipofectamine® 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific, США).

Тотальный белок в пробах определяли с помощью реактива Бредфорда (Sigma, США, Германия).

Для иммунобиологических методов (иммуноблот, ИФА) использовали лизирующий буфер Cell Culture Lysis Reagent (Promega, США), буфер для внесения образцов по Лэммли (Sigma), готовые полиакриламидные 10% гели Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Bio-Rad, США), маркер молекулярного веса Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, США), буфер для электрофореза Tris/glycine/SDS Running Buffer 10X (Bio-Rad, США), нитроцеллюлозная мембрана 0.45 µm (Bio-Rad, США), буфер для переноса белков на мембрану Tris-CAPS buffer (Bio-Rad, США), молоко сухое обезжиренное (AppliChem, США). Детекцию проводили с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) и проявляли на пленку Hyperfilm® ECL™ (Amersham, GE, Великобритания). Для проведения ИФА использовали тетраметилбензидин (НИИОПиК, Россия) и серную кислоту (Химмед, Россия). В работе использовали набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к RBD гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» по ТУ 21.20.23-090-01894956-2020 производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (филиал «Медгамал»), Россия (РЗН 2020/10393).

Спленоциты мыши выделяли, используя раствор фиколла с плотностью 1,09 г/мл (ПанЭко, Россия), а мононуклеарные клетки периферической крови – используя раствор фиколла с плотностью 1,077 г/мл. Мононуклеары периферической крови мармозет выделяли на среде для выделения лимфоцитов (LSM; MP biomedical, Солон, США).

Окраску клеток проводили с использованием набора Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) tracer kit (Invitrogen, США).

Концентрацию ИФН γ в среде измеряли методом ИФА с помощью коммерческих наборов mouse IFN- γ ELISA kit (Invitrogen, США), ELISpot Monkey IFN- γ plus (Mabtech, Швеция) и «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия) по инструкции производителя.

Для измерения цитокинов использовали набор «Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 8-plex Assay» (кат. номер M60000007, «BioRad», США).

2.1.8 Лабораторное оборудование

При выполнении исследования было использовано стандартное лабораторное оборудование для проведения молекулярно-генетических, биологических, вирусологических, иммунологических методов анализа: автоматические одноканальные и многоканальные пипетки переменного объема фирм Thermo Scientific (США), Gilson (Франция), Sartorius (Германия); дозатор пипеточный Midi Pro (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия); бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 класс II (тип А2) (ЗАО «Ламинарные системы», Россия); бокс биологической безопасности второго класса Esco SC-2-4A1 (Esco, Сингапур); CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония); автоклав настольный (Tuttnauer, Нидерланды); термостат воздушный TC1/20-СПУ (Россия); система для хранения в жидком азоте Locator 4 Plus, Thermo (Thermo Fisher Scientific, США); аналитические и электронные весы (Sartorius, Германия); морозильная камера -70 °С (Sanyo, Япония); система для очистки воды Milli Q (Millipore, США); баня водяная ПЭ-4312 (ООО «ЭКРОСХИМ», Россия), центрифуги фирм Sigma (США), Eppendorf (5424R и 5804R) (Германия) с охлаждением; ледогенератор (Frimont, Италия); холодильник-морозильник Liebherr ICN 3366 Premium NoFrost (Liebherr, Германия); магнитные мешалки фирм Bellco (США) и BioSan (Латвия); гомогенизатор Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция); термошейкер THERMOMIXER COMFORT (Eppendorf, Германия); программируемый твердотельный термостат «Гном» (ДНК-

Технология, Россия); система детектирования гелей Gel-Doc EZ System (Bio-Rad, США); ДНК-амплификатор T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США); ДНК-амплификатор детектирующий в режиме реального времени C1000 Thermo Cycler (Bio-Rad, США), спектрофотометр NanoDrop 2000c (Thermo, США); генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, США); наносайзер Zetasizer Nano ZS (ZEN3600, «Malvern», Великобритания); проточный цитофлуориметр BD FACS Aria III (BD Biosciences, США); камеры для горизонтального гель-электрофореза (Bio-Rad, США); источники тока «Эльф» (ДНК-Технология, Россия); камера для белкового фореза Mini-protean Tetra cell (Bio Rad Laboratories Inc., США); система для переноса белков Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio Rad Laboratories Inc., США); инвертированный микроскоп Olympus IX-71 (Olympus, Япония); микроскоп СКХ41SF (Olympus, Япония); рН-метр SEVENCompact S220K (Mettler Toledo International Inc, Швейцария); электропоратор MicroPulser (Bio-Rad, США); кюветы для электропорации Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes 165-2082 (Bio-Rad, США); кювета 10x10x45 мм («Sarstedt», Германия); хроматограф ÄKTA pilot 600 (Cytiva, США); биореактор SARTORIUS BIOSTAT RM 50 (Sartorius, Германия); планшетный спектрофотометр Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США); система мультиплексного анализа MAGPIX («Luminex», США).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Генно-инженерные методы

Гидролиз ДНК проводили специфическими эндонуклеазами рестрикции в буферных смесях согласно рекомендациям фирм-производителей. Результаты анализа оценивали с помощью электрофореза в горизонтальном агарозном геле с концентрацией агарозы 0,8-2%. Гели с разделенными фрагментами фотографировали, используя систему детектирования гелей Gel-Doc EZ System. Молекулярную массу фрагментов определяли с помощью маркеров молекулярного веса GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder и 1 kb DNA Ladder.

При клонировании фрагментов ДНК с выступающими концами использовали T4 полимеразу, для дефосфорилирования 5'-концов плазмидного вектора использовали щелочную фосфатазу (rSAP) согласно протоколу производителя. Лигирование фрагментов ДНК проводили с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 согласно протоколу из каталога производителя.

Выделение плазмид проводили с использованием наборов Plasmid Miniprep и QIAGEN® Plasmid Midi Kit согласно протоколам производителей. Чистоту и концентрацию полученных плазмид определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000с.

2.2.2 Биоинформатические методы

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей выполняли в программах BLAST и «Geneious» 10.0.9.

2.2.3 Бактериологические методы

*Получение компетентных клеток *E. coli* и трансформация*

Химические компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α готовили по методу, описанному Inoue [Inoue H. et al., 1990]. Полученную суспензию клеток разливали в стерильные пробирки по 200 мкл и хранили в холодильнике при температуре -70°C. Трансформацию клеток *E. coli* штамма DH5α плазмидной ДНК осуществляли методом SEM transformation [Inoue H. et al., 1990].

Электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма BJ5183 готовили согласно протоколу из руководства «MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide». Полученную суспензию клеток разливали в стерильные пробирки по 40 мкл и хранили в холодильнике при температуре -70°C. Для трансформации клеток *E. coli* штамма BJ5183 использовали метод электропорации.

Гомологичная рекомбинация в клетках *E. coli*

Для гомологичной рекомбинации между полным геномом аденовируса и плазмидным вектором, несущим плечи гомологии, брали 1 мкг полногеномной ДНК и 300-500 нг ДНК плазмидного вектора, линейаризованного с использованием соответствующей эндонуклеазы рестрикции. Препараты ДНК смешивали и трансформировали в клетки *E. coli* штамма BJ5183 с помощью электропорации.

Идентификация рекомбинантных клонов

Для отбора рекомбинантных клонов использовали селекцию на среде с соответствующим антибиотиком. Анализ рекомбинантных колоний проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), анализа подвижности плазмид, расщепления ДНК рестриктазами с образованием характерного набора фрагментов ДНК с последующим анализом в агарозном геле и полногеномным секвенированием.

2.2.4 Молекулярно-биологические методы

Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили в автоматическом режиме на термоциклере T100™ Thermal Cycler. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: ScreenMix-HS, 10 пмоль каждого праймера и исследуемый образец. До конечного объема смесь доводили стерильной деионизованной водой.

Программа амплификации: 1 этап – предварительная денатурация (95 °С 5 мин), 1 цикл; 2 этап – денатурация ДНК (95 °С 30 сек), отжиг праймеров (55-63 °С 30 сек) и элонгация (72 °С 30-90 сек), 25-30 циклов; 3 этап – финальная элонгация (72 °С 5 мин), 1 цикл. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности праймеров

Название праймера	Последовательность
ORF6-end-F	5'-TCA-CAG-AAC-CCT-AGT-ATT-CAA-CCT-G-3'
ORF6-end-R	5'-CTT-CAG-GAA-ATA-TGA-CTA-CGT-CCG-3'

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-РВ проводили в автоматическом режиме на приборе CFX 96 Real-Time PCR Detection System с использованием каналов красителей SYBR и HEX. Выбор цветового канала прибора осуществляли в соответствии с инструкцией к прибору и флуоресцентными характеристиками зонда. Реакцию ставили с использованием следующих реакционных смесей: qPCRMix-HS для зондов и qPCRMix-HS SYBR для интеркалирующего красителя. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 12,5 мкл qPCRMix-HS, 10 пмоль каждого праймера, 10 пмоль флуоресцентного зонда и исследуемый образец. До конечного объема смеси доводили стерильной деионизованной водой. При постановке ПЦР-РВ со смесью qPCRMix-HS SYBR зонд в смесь не добавляли.

Программа амплификации: 1 этап – предварительная денатурация (95 °C 5 мин), 1 цикл; 2 этап – денатурация ДНК (95 °C 15 сек), отжиг праймеров (60 °C 20 сек) и элонгация (72 °C 20 сек), 5 циклов; 3 этап – денатурация ДНК (95 °C 15 сек), отжиг праймеров (60 °C 20 сек) и элонгация с детекцией сигнала (считывание по каналам HEX, SYBR) (72 °C 20 сек), 35 циклов. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 4.

Анализ результатов ПЦР проводили автоматически с использованием программного обеспечения для ПЦР амплификатора. По каналу для красителя HEX регистрировали сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гексона аденовируса 26 или 5 серотипов. По каналу для красителя SYBR регистрировали сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК белка S вируса SARS-CoV-2 или фрагмента ДНК E1 области генома Ад5 или фрагмента ДНК клеток HEK293.

Таблица 4 – Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

Название праймера или зонда	Последовательность
Hex26_probe	5'-(R6G)-TAC-TCG-GGC-TCC-ATC-CCC-TAC-CTC-GA-(BHQ-2) -3'
Hex26_Real_F	5'-CCC-TCG-GCT-CGG-GTT-TCG-ACC-C-3'
Hex26_Real_R	5'-GTC-GTT-GCC-GGG-CCA-GCT-GAC-C-3'
Ad5-Probe	5'-(R6G)-CA-TCC-AGG-TGC-CTC-AGA-AGT-TCT-TTG-CCA-(BHQ-2) -3'
Real-Ad5F	5'-CTG-GGC-AAT-GGT-CGC-TAT-GT-3'
Real-Ad5R	5'-AGA-AGG-TGG-CGT-AAA-GGC-AAA-T-3'
Nov_S_F	5'-AAG-AAT-TTC-ACC-ACC-GCT-CCA-3'
Nov_S_R	5'-TTG-TTC-ACA-ATG-CCG-ATC-AC-3'
E1A_Ad5_3_F	5'-CCT-GAG-ACG-CCC-GAC-ATC-3'
E1A_Ad5_2_R	5'-CCA-CCA-ACT-CTC-ACG-GCA-A-3'
HEK-S2	5'-CTA-ACA-CGG-TGA-AAC-CCC-G-3'
HEK-A2	5'-CGC-CCA-GGC-TGG-AGT-G-3'

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ)

Для постановки обратной транскрипции и ПЦР-РВ использовали набор реагентов OneTube RT-PCRmix, реакции проводили по протоколу фирмы-производителя на приборе С1000 Thermo Cycler. Нуклеотидные последовательности праймеров и зонда представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

Название праймера или зонда	Последовательность
RdRp -F	5'-TGA-RAT-GGT-CAT-GTG-TGG-CGG-3'
RdRp-R	5'-CAR-ATG-TTA-AAS-ACA-CTA-TTA-GCA-TA-3'
RdRp-P	5'- (FAM)-CAG-GTG-GAA-CCT-CAT-CAG-GAG-ATG-C-(RTQ1) -3'

Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Нуклеотидную последовательность плазмидных и вирусных ДНК определяли методом полногеномного секвенирования на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyze.

Выделение тотальной ДНК из вирусного препарата

Тотальную ДНК выделяли с использованием набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit согласно протоколу производителя. На анализ брали 100 мкл вирусного препарата (очищенного вируса или вирусосодержащей суспензии). Чистоту и концентрацию ДНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000с.

Выделение РНК из вирусного препарата

Выделение РНК проводили с помощью реагента Trizol согласно протоколу производителя. Для лизиса добавляли 1 мл реагента Trizol на 100 мкл вирусного препарата. Чистоту и концентрацию РНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000с.

2.2.5 Физико-химические методы

Белковый электрофорез

Электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия согласно методике Лэммли [Laemmli U.K., 1970]. При электрофорезе в неденатурирующих невосстанавливающих условиях образцы смешивали с буфером для нанесения проб без 2-меркаптоэтанола и, не нагревая, вносили в лунки геля. В качестве стандарта молекулярных масс использовали Precision Plus Protein™.

Измерение размера частиц

Размер частиц определяли с использованием наносайзера Zetasizer Nano ZS (метод динамического рассеяния света, DLS). Препараты аденовирусов разводили

до концентрации 10^{10} в.ч./мл в профильтрованной (фильтр PES, размер пор 0,22 мкм) воде Milli-Q. Затем 1 мл частиц переносили в кювету 10x10x45 мм и проводили трехкратное измерение. Размер частиц рассчитывали с использованием программного обеспечения Zetasizer Software.

Хроматографическая очистка аденовирусов

Аденовирусы очищали на хроматографе ÄKTA pilot 600 в ходе трех последовательных стадий: диафильтрации с использованием мембран с пределом отсека до 300 кДа, хроматографии на анионообменном сорбенте и хроматографии на мультимодальном сорбенте.

После завершения лизиса клеток НЕК 293, зараженных аденовирусом, вирусодержащую жидкость сначала осветляли с применением глубинной фильтрации, затем очищали путём прохождения через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Первую стадию концентрирования/диафильтрации проводили на установке ультрафильтрации с использованием кассетных мембранных модулей с порогом отсека по молекулярной массе 300 кДа. Осветленный раствор аденовирусных частиц концентрировали в 10 раз и диафильтровали, используя 12-кратный объем раствора для диафильтрации.

На второй стадии очистку проводили на хроматографической колонне аксиального сжатия, заполненной анионообменным сорбентом. Диафильтрованный полупродукт аденовируса наносили на колонну со скоростью потока от 200 до 600 см/ч. Колонну с адсорбированным продуктом промывали 3-7 колонных объемов раствора для промывки. Элюцию целевого продукта проводили градиентно, постепенно повышая содержание высокосолевого раствора в растворе для промывки. Собирали целевой пик, содержащий аденовирус, при достижении оптической плотности 0,200-0,800 AU. Заканчивали сбор после снижения оптической плотности до 0,400 AU.

Третью стадию очистки проводили на хроматографической колонне аксиального сжатия, заполненной мультимодальным сорбентом. После анионообменной хроматографии полупродукт наносили на колонну со скоростью

потока от 200 до 600 см/ч. Собирали проскок нанесения, содержащий целевой продукт, при достижении оптической плотности 0,100 AU. Заканчивали сбор целевого продукта после снижения оптической плотности до 0,100 AU.

Процесс замены буфера на буфер готовой лекарственной формы с высоким содержанием соли проводили на установке ультрафильтрации с использованием кассетных мембранных модулей с порогом отсечения по молекулярной массе 300 кДа. Концентрированный раствор очищенных аденовирусных частиц диафильтровали 12-кратным объемом буфера готовой лекарственной формы.

Полученный полупродукт разводили до оптической плотности 1,6-1,8 ОЕ (260 нм) путем добавления буфера готовой лекарственной формы с низким содержанием соли. Затем в асептических условиях перистальтическим дозатором разливали в контейнеры, пропуская через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, хранили при температуре -18 °С в течение 30 дней.

Определение количества аденовирусных частиц

Измерение количества аденовирусных частиц проводили методом спектрофотометрии при длинах волн 260 нм и 280 нм, описанным Maizel с соавт. [Maizel et al., 1968]. На основании этого метода 1 ОЕ (оптическая единица) при длине волны 260 нм соответствует количеству $1,1 \times 10^{12}$ в. ч./мл.

Для образцов с ожидаемой концентрацией $0,5-2 \times 10^{12}$ в.ч./мл: в пробирку объемом 1,5 мл добавляли 500 мкл 0,2% SDS в формулирующем буфере и 500 мкл анализируемого образца. Тщательно перемешивали на микровстряхивателе типа «Vortex» в течение 20 секунд. Для образцов с ожидаемой концентрацией $>2 \times 10^{12}$ в.ч./мл: образец разводили формулирующим буфером до концентрации примерно 1×10^{12} в.ч./мл. Далее измеряли образец на спектрофотометре NanoDrop 2000с при длинах волн 260 (для ДНК), 280 (для белка) и 320 (базовая линия) нм.

Количество вирусных частиц рассчитывали по формуле:

$$\text{Количество вирусных частиц (в.ч./мл)} = 1,1 \times 10^{12} \times (A_{260} - A_{320}) \times DF,$$

где $1,1 \times 10^{12}$ = количество в.ч./мл в 1 ОЕ при измерении на длине волны 260 нм, DF – разведение образца.

Степень поглощения образца, измеренная при 260 нм, должна быть между 0,1 и 1,0 ОЕ. Среднее соотношение A260-A320/A280-A320 должно быть в пределах 1,1-1,4.

2.2.6 Вирусологические методы

Трансфекция клеток методом липофекции

Для трансфекции эукариотических клеток использовали реагент Lipofectamine® 2000 Reagent согласно протоколу производителя. Эффективность трансфекции оценивали посредством флуоресцентной микроскопии после трансфекции плазмидой pShuttle-EGFP, содержащей репортерный ген зеленого флуоресцентного белка EGFP.

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов

Рекомбинантные аденовирусы получали в результате трансфекции клеток линии HEK293 плазмидной конструкцией, несущей полноразмерный геном рекомбинантного аденовируса. Полногеномную плазмиду предварительно гидролизовали по PacI (для Ад5) или PacI+SwaI (для Ад26). В результате гидролиза вырезался фрагмент, содержащий сайт инициации репликации и ген резистентности к антибиотику. Трансфекцию ставили на 24-луночном планшете. Через 48 часов после трансфекции проводили пересев клеток на культуральный матрас площадью 25 см² для более быстрого оживления аденовирусов. Через 10 дней наблюдали цитопатическое действие вируса. Суспензию заражённых клеток, содержащую полученные вирусы, хранили при -70°C.

Накопление рекомбинантных аденовирусов

Рекомбинантные аденовирусы накапливали в суспензионной культуре клеток линии HEK 293 в биореакторе SARTORIUS BIOSTAT RM 50.

Устанавливали температуру, угол качания платформы и частоту качания, включали подачу газовой смеси. Вносили суспензию клеток HEK 293, полученную при выращивании в колбах Эрленмейера. Клетки культивировали в

течение 3-4 суток с ежедневным контролем температуры, угла качания платформы и частоты качания. По окончании процесса оценивали финальную концентрацию и долю жизнеспособных клеток.

Стерильный одноразовый мешок для культивирования устанавливался в биореактор с осевым исполнением и рабочим объемом от 60 до 200 литров. В него вносили стерильную питательную среду и суспензию клеток НЕК 293, полученную в волновом биореакторе объемом 20 литров. После 0–4 суток роста клеточной культуры вносили вирусодержащую жидкость. Инфицированные клетки культивировали в течение 60–80 часов при ежедневном мониторинге температуры, скорости перемешивания и уровня растворённого кислорода. По завершении процесса оценивали итоговую концентрацию и жизнеспособность клеток, стерильность материала, наличие полных вирусных капсидов, подлинность аденовирусного рекомбинантного вектора, а также специфическую безопасность (для компонента II) и активность (титр, ТЦД50/мл).

Лизис клеток

По завершении культивирования заражённые аденовирусом клетки НЕК 293 подвергали химическому лизису и ферментативной обработке. Для этого в биореактор добавляли ДНКазу (или нуклеазу), хлорид натрия и неионное поверхностно-активное вещество, после чего смесь инкубировали в течение 1–3 часов.

Накопление вируса SARS-CoV-2

Накопление вируса SARS-CoV-2 проводили в клетках линии Vero E6 в среде DMEM с 2% инактивированной FBS в роллерных установках. Клетки заражали при множественности инфекции MOI=0,01 и инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Через 72 часа собирали культуральную жидкость, осаждали клеточный дебрис центрифугированием при 9000g 10 мин +4°C. Культуральную жидкость, содержащую вирус, аликвотили, замораживали и хранили при -80°C.

Титрование вирусов методом ТЦД50

Титрование рекомбинантных аденовирусов проводили модифицированным методом титрования по конечным точкам путем определения 50% цитопатической дозы (ТЦД50) на культуре клеток НЕК 293 [Kanegae et al., 1994]. Последовательные 10-кратные разведения исходного материала вируса готовили в DMEM с 6% сывороткой и в объеме 100 мкл добавляли к клеткам НЕК 293 в 96-луночном планшете в 8 повторах. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 12-14 дней и визуально оценивали цитопатический эффект. Титр ТЦД50 рассчитывали по методу Рида и Менча.

Инфекционный титр вируса SARS-CoV-2 определяли на клетках Vero E6. Последовательные 10-кратные разведения исходного материала вируса готовили в DMEM с 2% инактивированной сывороткой и в объеме 100 мкл добавляли к клеткам Vero E6 в 96-луночном планшете в 6 повторах. Клетки инкубировали при 37 °C в 5% CO₂ в течение 96 часов и визуально оценивали цитопатический эффект. Титр ТЦД50 рассчитывали по методу Рида и Менча.

Реакция микронеutralизации

Реакцию микронеutralизации ставили в варианте постоянная доза вируса – разведения сыворотки крови. Сыворотки крови инкубировали при температуре 56 °C в течение 30 минут для удаления неспецифических ингибиторов.

Для определения титра ВНА к вирусу SARS-CoV-2 готовили двукратные разведения сыворотки (начиная с 1:5) в культуральной среде DMEM с 2% инактивированной эмбриональной сывороткой, далее смешивали со 100 ТЦД50 вируса SARS-CoV-2, инкубировали 1 час при 37 °C. По истечении срока инкубации в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл клеток Vero E6 (1×10^4). Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Через 96 часов проводили 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 в 2-х лунках из 3-х.

Для определения титра ВНА к аденовирусу (Ад26 или Ад5) готовили двукратные разведения сыворотки (начиная с 1:25) в культуральной бессывороточной среде DMEM, далее смешивали со 100 ТЦД50 рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген зеленого флуоресцентного белка (Ad26-EGFP или Ad5-EGFP) инкубировали 1 час при 37 °С. По истечении срока инкубации в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл клеток НЕК 293 (5×10^4). Клетки инкубировали при 37 °С в 5% CO₂. Через 48-96 часов проводили учет с использованием микроскопии в УФ-спектре. За титр ВНА исследуемой сыворотки принимали наибольшее ее разведение, которое подавляет на 50% от положительного контроля размножение вируса Ad26-EGFP или Ad5-EGFP.

2.2.7 Иммунологические методы

Определение экспрессии гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 методом иммуноблоттинга

Трансдуцированные рекомбинантными аденовирусами клетки A549 лизировали и осветляли центрифугированием при 15000 оборотах/минуту. Тотальный белок в пробах определяли с помощью реактива Бредфорда согласно инструкции производителя. Исследуемые пробы с одинаковым содержанием белка (10 мкг общего белка) смешивали с буфером для внесения по Лэммли и инкубировали в течение 10 минут при 98°C. Белки разделяли методом электрофореза с использованием 10% готового полиакриламидного геля и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. После блокировки мембраны добавляли моноклональные антитела к RBD гликопротеина S (полученные в лаборатории) в конечной концентрации 1 мкг/мл. Далее вносили антитела anti-human IgG HRP. Иммунодетекцию проводили с использованием субстрата Clarity™ Western ECL.

Определение специфических антител в сыворотке крови животных после иммунизации рекомбинантными аденовирусами методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Готовили двукратные разведения сыворотки крови иммунизированных животных в блокирующем буфере (разведения от 1:50). Образцы вносили в лунки 96-ти луночного ИФА-планшета из набора реагентов «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи». Далее добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Образование иммунных комплексов детектировали при добавлении раствора тетраметилбензидина. Реакцию останавливали добавлением 1М H₂SO₄, после чего оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 нм (OD₄₅₀). За титр IgG принимали наибольшее разведение сыворотки иммунизированного животного, в котором значение OD₄₅₀ в 2 раза и более превосходит значение контрольной сыворотки.

Определение T-клеточного ответа у иммунизированных животных по количеству пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ T-лимфоцитов in vitro

Выделение спленоцитов из селезенки или моноклеарной фракции клеток из периферической крови иммунизированных животных проводили методом центрифугирования в градиенте плотности раствора фикола, как описано Тухватулиным А.И. [Tukhvatulin A.I. et al., 2022]. Моноклеары мармозет получали, используя среду для выделения лимфоцитов по протоколу производителя, как описано Гордейчуком И.В. [Gordeychuk I.V. et al., 2018]. Для определения количества пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ T-лимфоцитов использовали метод окраски клеток красителем CFSE. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 2×10⁵ клеток на лунку, рестимулировали рекомбинантным S белком коронавируса SARS-CoV-2 (5 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки, к которым не добавляли антиген.

Через 96 часов после добавления антигена клетки собирали, промывали и окрашивали антителами, специфичными к CD3, CD4 и CD8, фиксировали в

растворе 1% параформальдегида. Пролиферирующие CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты определяли в клеточной смеси с использованием проточного цитофлуориметра BD FACS Aria III. Результирующий процент пролиферирующих клеток в каждом образце определяли путем вычитания результата, полученного при анализе нестимулированных клеток, из результата, полученного при анализе клеток, рестимулированных антигеном.

Определение Т-клеточного ответа у иммунизированных животных по продукции ИФН γ

Спленоциты или мононуклеарные клетки рассеивали на планшет, после чего добавляли в культуральную среду рекомбинантный S белок коронавируса SARS-CoV-2 (конечная концентрация белка 5 мкг/мл) для повторной стимуляции. Через 48 часов концентрацию ИФН γ в среде измеряли методом ИФА с помощью коммерческого набора (mouse IFN- γ ELISA kit или ELISpot Monkey IFN- γ plus) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность (ОП) определяли при длине волны 450 нм. Результирующий процент прироста концентрации ИФН- γ в каждом образце рассчитывали путем вычитания значения ОП нестимулированных клеток из значения ОП клеток, рестимулированных антигеном.

Определение концентрации цитокинов

Спленоциты или мононуклеарные клетки рассеивали на планшет, после чего добавляли в культуральную среду рекомбинантный S белок коронавируса SARS-CoV-2 (конечная концентрация белка 5 мкг/мл) для повторной стимуляции. Анализ цитокинов проводили в культуральной среде через 48 часов методом мультиплексного анализа с использованием набора Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 8-plex Assay согласно протоколу производителя. Учет результатов производили на приборе MAGPIX. Концентрацию цитокинов определяли с помощью программного обеспечения к прибору.

2.2.8 Методы работы с лабораторными животными

Исследования выполняли на мышах линий BALB/c, C57BL/6, Tg(K18-ACE2)2Pr1mn, на сирийских хомячках, макаках-резус, обыкновенных игрунках, крысах, кроликах, морских свинках. До начала эксперимента животные содержались в контролируемых условиях на стандартном пищевом рационе (соответствующего виду животного) в условиях вивария. Все животные имели свободный доступ к пище и воде. Ежедневно проводили визуальный клинический осмотр. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы не включали.

Перед началом эксперимента животные, отвечающие критериям включения, были распределены на группы. Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп, рассаживание животных осуществлялось случайным образом, используя в качестве критерия массу тела так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 10% от средней массы животных в одной группе. Маркировка клетки кодировала пол животных, дату начала введения препаратов, название группы.

Препараты вводили животным внутримышечно. Забор крови осуществляли у мышей из хвостовой вены, у приматов из бедренной вены, у крыс из яремной вены, у кроликов из ушной краевой вены.

Эвтаназию осуществляли с помощью CO₂-камеры (для мышей, крыс), методом дислокации шейных позвонков (для мышей), воздушной эмболией (для кроликов). Животные находились там до полной потери сознания.

Для оценки токсического влияния препарата на организм животных фиксировали интегральные показатели состояния (таблица 6).

Таблица 6 – Интегральные показатели общего состояния животных

Вид животного	Изучаемые показатели	Периодичность сбора данных
Мыши	Общее состояние (внешний вид, состояние шерсти, глаз, ушей, зубов, конечностей)	Ежедневно
	Двигательная активность	
	Физиологические функции (дыхание, слюноотделение, моча, экскрет)	
	Масса тела	На 7 и 14 сутки от начала эксперимента
	Масса внутренних органов	На 14 сутки от начала эксперимента
Кролики	Общее состояние (внешний вид, состояние шерсти, глаз, ушей, зубов, конечностей)	Ежедневно
	Двигательная активность	
	Физиологические функции (дыхание, слюноотделение, моча, экскрет)	
	Масса тела	На 7, 14 и 21 сутки от начала эксперимента острой токсичности На 7, 14, 30 и 44 сутки от начала эксперимента хронической токсичности
	Биохимия	На 21 сутки от начала эксперимента острой токсичности На 31 и 44 сутки от начала эксперимента хронической токсичности
	Гематология	На 21 сутки от начала эксперимента острой токсичности На 31 и 44 сутки от начала эксперимента хронической токсичности
	Коагулометрия	На 21 сутки от начала эксперимента острой токсичности На 31 и 44 сутки от начала эксперимента хронической токсичности
	Моча	На 21 сутки от начала эксперимента острой токсичности

Вид животного	Изучаемые показатели	Периодичность сбора данных
		На 31 и 44 сутки от начала эксперимента хронической токсичности
	Некропсия и гистология	На 21 сутки от начала эксперимента острой токсичности На 31 и 44 сутки от начала эксперимента хронической токсичности
Крысы	Общее состояние (внешний вид, состояние шерсти, глаз, ушей, зубов, конечностей)	Ежедневно
	Двигательная активность	
	Физиологические функции (дыхание, слюноотделение, моча, экскрет)	
	Поведение («открытое поле», «сужающаяся дорожка»)	На 30 и 43 сутки от начала эксперимента
	Масса тела	На 7, 14, 30 и 44 сутки от начала эксперимента
	Биохимия	На 31 и 44 сутки от начала эксперимента
	Гематология	На 31 и 44 сутки от начала эксперимента
	Коагулометрия	На 31 и 44 сутки от начала эксперимента
	Моча	На 31 и 44 сутки от начала эксперимента
	Некропсия и гистология	На 31 и 44 сутки от начала эксперимента
	ЭКГ	На 30 и 43 сутки от начала эксперимента

Работу с патогенным вирусом SARS-CoV-2 проводили в лаборатории Государственной Коллекции Вирусов.

Исследование протективной активности проводили на двух моделях летальной инфекции: на модели сирийских хомячков с индуцированным иммунодефицитом и на модели трансгенных мышей, несущих ген рецептора ACE2 человека (Tg(K18-ACE2)^{2PrImn}). Сирийским хомячкам в течение 7 суток

до заражения и каждые три дня после заражения вирусом SARS-CoV-2 вводили иммуносупрессанты. Для иммуносупрессии использовали дексаметазон (10 мг/кг, ежедневно в течение 7 суток до заражения) и циклофосфамид (150 мг/кг однократно за 3 суток до заражения, 100 мг/кг каждые три дня после заражения). Животных интраназально заражали вирусом SARS-CoV-2 в дозе 10^6 ТЦД50 на животное в объеме 100 мкл под легким эфирным наркозом. Наблюдение за состоянием животных осуществляли ежедневно на протяжении 40 дней после заражения. Трансгенных мышей Tg(K18-ACE2)2PrImn интраназально заражали вирусом SARS-CoV-2 в дозе 3×10^4 ТЦД50 на животное под легким эфирным наркозом. Наблюдение за состоянием животных осуществляли ежедневно на протяжении 30 дней после заражения.

2.2.9 Клинические исследования вакцины на добровольцах

Клинические исследования одобрены Министерством здравоохранения РФ (приложение Б), локальным этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России и были проведены на базе исследовательских центров, представленных в таблице 7.

Таблица 7 – Исследовательские центры, в которых проводились клинические исследования

Фаза КИ	Исследовательские центры
I-II	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, филиал №7, 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Новая, д.4
III-IV	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 220 Департамента здравоохранения города Москвы», 123022, г. Москва, ул. Загорёнова, д. 27
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 62 Департамента здравоохранения города Москвы», 125167, г. Москва, ул. Красноармейская, д. 18

Фаза КИ	Исследовательские центры
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени М.П. Кончаловского Департамента здравоохранения города Москвы», 124489, г. Москва, г. Зеленоград, Каштановая аллея, д. 2, стр. 1
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 2 Департамента здравоохранения города Москвы», 117556, г. Москва, ул. Фруктовая, д. 12
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 212 Департамента здравоохранения города Москвы», 119620, г. Москва, Солнцевский пр-т, д. 11А
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Консультативно-диагностическая поликлиника № 121 Департамента здравоохранения города Москвы», 117042, г. Москва, Южнобутовская ул., д. 87
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени М.Е. Жадкевича Департамента здравоохранения города Москвы», 121374, г. Москва, Можайское шоссе, д. 14
	Акционерное общество «Группа компаний «Медси», 123056, г. Москва, пер. Грузинский, д. 3 А
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы», 123182, г. Москва, ул. Пехотная, д. 3
	Общество с ограниченной ответственностью «НИАРМЕДИК ПЛЮС», 125252, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12
	Филиал компании с ограниченной ответственностью «Хадасса Медикал ЛТД», 151059, г. Москва, Бережковская наб., д. 16А, стр. 3, пом. 4
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 6 Департамента здравоохранения города Москвы», 127206, г. Москва, ул. Вучетича, д. 7Б
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 170 Департамента здравоохранения города Москвы», 117545, г. Москва, ул. Подольских Курсантов, д. 2, корп. 2
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Диагностический центр № 5 с поликлиническим отделением Департамента здравоохранения города Москвы», 127572, г. Москва, ул. Абрамцевская, д. 16

Фаза КИ	Исследовательские центры
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 46 Департамента здравоохранения города Москвы», 105064, г. Москва, ул. Казакова, д. 17 А
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 36 Департамента здравоохранения города Москвы», 109652, г. Москва, ул. Новомарьинская, д. 2
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 68 Департамента здравоохранения города Москвы», 119180, г. Москва, ул. Малая Якиманка, д. 22, стр. 1
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Диагностический клинический центр № 1 Департамента здравоохранения города Москвы», 117485, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 29, корп. 2
	Общество с ограниченной ответственностью «Клиника новых медицинских технологий АРХИМЕД V» (ООО «Клиника АРХИМЕД V»), 119261, г. Москва, ул. Вавилова, д. 68, корп. 2
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 109 Департамента здравоохранения города Москвы», 109548, г. Москва, ул. Гурьянова, д. 4, корп. 3
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 219 Департамента здравоохранения города Москвы», 123480, г. Москва, б-р Яна Райниса, д. 47
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 115 Департамента здравоохранения города Москвы», 123308, г. Москва, ул. Демьяна Бедного, д. 8
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 210 Департамента здравоохранения города Москвы», 115211, г. Москва, Каширское шоссе, д. 57, корп. 1
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 175 Департамента здравоохранения города Москвы», 105568, г. Москва, ул. Челябинская, д. 16, корп. 2, стр. 1
	Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 64 Департамента здравоохранения города Москвы», 107023, г. Москва, ул. Малая Семеновская, д. 13

Исследования выполнены согласно рекомендациям ICH E6 «Надлежащая клиническая практика» и Правилам Надлежащей клинической практики, установленным Евразийским Экономическим Союзом, и зарегистрированы на <http://www.clinicaltrials.gov/> под идентификаторами NCT04436471, NCT04587219 и NCT04530396.

Общая характеристика добровольцев

Первое клиническое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности состояло из двух этапов и включало скрининг, введение препарата и период наблюдения. Скрининг прошли 43 добровольца, 18 добровольцев (+2 дублера) были включены в первый этап и 20 добровольцев (+3 дублера) были включены во второй этап. Включение в группы проводили последовательно по мере подписания информированного согласия, рандомизации не предусматривалась. В случае выбытия добровольцев из исследования, проводилась их замена из группы дублеров.

Второе клиническое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата у добровольцев старше 60 лет включало скрининг, введение препарата и период наблюдения. Скрининг прошли 1323 добровольца, 110 были включены в исследование, рандомизации не было предусмотрено. Один доброволец (№124) выбыл до введения компонента I вследствие обнаружения положительного результата ПЦР-анализа на РНК SARS-CoV-2. Таким образом, терапию начали 109 добровольцев. Еще один доброволец (№076) получил компонент I вакцины, но выбыл до введения компонента II (т.к. заразился COVID-19). Оба компонента вакцины получили 108 добровольцев.

Третье клиническое исследование эффективности, иммуногенности и безопасности комбинированной векторной вакцины в параллельных группах включало скрининг, введение препарата и период наблюдения. Скрининг прошли 66565 субъектов, 33864 из которых были рандомизированы в соотношении 3:1 для включения в группу вакцины или группу плацебо с учетом стратификации по возрасту. Рандомизацию субъектов исследования осуществляли в пять

возрастных страт: 18-30 лет, 31-40 лет, 41-50 лет, 51-60 лет и старше 60 лет. Длительность участия в исследовании для одного субъекта составила 180 ± 14 дней после введения первой дозы препарата или плацебо. В исследовании был использован двойной слепой метод маскировки данных.

Критерии включения/невключения субъектов в КИ

Каждый потенциальный участник для включения в исследование должен был удовлетворять всем следующим критериям:

- мужчины и женщины в возрасте от 18 до 60 лет (для КИ у добровольцев старше 60 лет включительно, для пострегистрационного КИ в возрасте старше 18 лет включительно);
- письменное информированное согласие;
- индекс массы тела (ИМТ) составляет $18,5 \leq \text{ИМТ} \leq 30$ (для КИ у добровольцев старше 60 и пострегистрационного КИ этот критерий исключили);
- отрицательный результат исследования на SARS-CoV-2 методом ПЦР (на скрининге);
- отсутствие в анамнезе заболевания COVID-2019;
- отсутствие контакта добровольцев с заболевшими COVID-2019 в течение не менее 14 дней; отрицательный результат тестов на антитела IgM и IgG к SARS-CoV-2;
- согласие на применение эффективных методов контрацепции в ходе всего периода участия в исследовании; отсутствие острых инфекционных заболеваний в момент вакцинации и за 14 дней до момента вакцинации;
- отрицательный тест на беременность по результатам исследования крови или мочи (для женщин детородного возраста);
- отрицательные тесты на ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис или подтвержденная информация из анамнеза; отрицательный тест мочи на следы наркотиков;
- отрицательный тест на содержание алкоголя на визите скрининга;

- отсутствие злокачественных новообразований любого характера и локализации;
- отсутствие в анамнезе, а также по данным скринингового обследования патологии со стороны желудочно-кишечного тракта, печени, почек, сердечно-сосудистой системы, ЦНС, опорно-двигательного аппарата, мочеполовой, иммунной и эндокринной систем, крови, которая, с точки зрения исследователя и/или организатора исследования может оказывать влияние на безопасность добровольца и оценку результатов исследования (клинические, инструментальные и лабораторные исследования не выявили заболеваний или клинически значимых отклонений) (для КИ у добровольцев старше 60 и пострегистрационного КИ этот критерий исключили).

Потенциальный участник не включался в исследование при наличии хотя бы одного из нижеследующих критериев:

- участие добровольца в любом другом исследовании за последние 90 дней;
- любая вакцинация за последние 30 дней;
- наличие в анамнезе заболевания COVID-2019;
- положительный результат исследования на SARS-CoV-2 методом ПЦР (на скрининге);
- положительные результаты тестов на антитела IgM и IgG к SARS-CoV-2;
- персонал медицинских учреждений, находящийся в контакте с лицами, заболевшими COVID-2019;
- симптомы респираторного заболевания за последние 14 дней;
- введение иммуноглобулинов или других препаратов крови за последние 3 месяца;
- регулярное в прошлом или текущее использование наркотических препаратов;
- прием иммуносупрессивных препаратов и/или иммуномодуляторов в течение 6 месяцев до начала исследования;
- беременность или кормление грудью;
- обострение аллергических заболеваний на момент вакцинации;
- систолическое АД менее 100 мм рт.ст. или выше 139 мм рт.ст.;

- диастолическое АД менее 60 мм рт.ст. или выше 90 мм рт.ст.;
- ЧСС менее 60 уд/мин или более 100 уд/мин;
- отягощенный аллергологический анамнез (анафилактический шок, отек Квинке, полиморфная эксудативная экзема, атопия, сывороточная болезнь в анамнезе, гиперчувствительность или аллергические реакции на введение иммунобиологических препаратов, известные аллергические реакции на компоненты препарата и др.);
- аутоиммунные заболевания в анамнезе у самого добровольца и у родственников 1-2 степени родства; курение (более 10 сигарет в день);
- прием алкоголя, превышающий уровень низкого риска (не более 20 граммов чистого алкоголя в день, не более 5 дней в неделю, прием алкоголя в течение 48 часов до введения исследуемого препарата);
- плановая госпитализация и/или хирургическое вмешательство в период участия в исследовании, а также за 4 недели до предполагаемой даты введения препарата;
- наличие сопутствующего заболевания, которое может оказывать влияние на оценку результатов исследования;
- любые состояния, которые, по мнению врача-исследователя, могут быть противопоказанием к участию в исследовании.

Добровольцы 60 лет и старше и участвующие в пострегистрационном КИ не включались в исследование при наличии дополнительных критериев:

- терапия стероидами не завершившаяся за 30 дней до включения в исследование;
- перенесенный менее чем за один год до включения в исследование острый коронарный синдром или инсульт;
- туберкулез, хронические системные инфекции;
- наличие в анамнезе новообразований (коды МКБ C00-D09);
- донорская сдача крови или плазмы (в объеме 450 мл или более) менее чем за 2 месяца до включения в исследование;
- спленэктомия в анамнезе;

- нейтропения (снижение абсолютного числа нейтрофилов менее 1000/мм³), агранулоцитоз, значительная кровопотеря, тяжелая анемия (гемоглобин менее 80 г/л), иммунодефицит в анамнезе в течение 6 месяцев до включения в исследование;
- субъекты с активной формой заболевания, вызванного вирусом иммунодефицита человека, сифилисом, гепатитами В и С;
- анорексия, белковый дефицит любого происхождения;
- обширные татуировки на местах введения препарата (область дельтовидной мышцы), не позволяющие оценить местную реакцию на введение препарата;

Добровольцы могли быть исключены из исследования в следующих случаях:

- включение добровольца, не соответствующего критериям включения и имеющего какой-либо из критериев исключения, но не более чем на 2 визитах подряд;
- инфицирование вирусом SARS-CoV-2, определяемое методом ПЦР;
- грубое нарушение протокола;
- невозможность последующего наблюдения за добровольцем;
- добровольный выход из исследования;
- исследователем принято решение, что добровольца необходимо исключить в интересах самого добровольца;
- необходимость сопутствующей терапии препаратами, не разрешенными к применению в данном исследовании.

Добровольцы в пострегистрационном КИ прекращали получение препарата или плацебо по протоколу в связи со следующими состояниями: беременность (наблюдение в рамках протокола продолжается, происходит регистрация случая беременности и беременность наблюдается до разрешения); регистрация заболевания COVID-19 до второй вакцинации (наблюдение в рамках протокола продолжается).

Добровольцы, вакцинировавшиеся в рамках гражданского оборота, считались выбывшими из исследования.

Выбор доз и времени применения препарата для каждого добровольца

В рамках каждого этапа исследования все добровольцы получали одинаковую дозу исследуемой вакцины. На первом этапе препарат вводили однократно – в 1-й день, компонент I или компонент II в зависимости от группы, в которую распределен доброволец. При благоприятном профиле безопасности через 5 дней после введения исследуемого препарата главный исследователь принимал решение начать введение комбинированной вакцины (2 этап), о чем сообщал спонсору. Критериями перехода ко второму этапу являлись: отсутствие СНЯ; отсутствие НЯ тяжелой степени и потенциально угрожающих жизни более чем у трех из пяти добровольцев после первого введения вакцины, взаимосвязь которых с вакцинацией определена как «вероятная» или «определенная». На втором этапе препарат вводился дважды всем добровольцам – в 1-й день Компонент I и на 21-й день – Компонент II. Препарат не должен был вводиться второй раз на 21 день, если у добровольца: после первой вакцинации развилась аллергическая реакция; произошло обострение хронических заболеваний перед второй вакцинацией, в случае если врач-исследователь считает проведение дальнейшей вакцинации опасным для добровольца; выявлено острое инфекционное заболевание перед второй вакцинацией.

Исследуемый препарат вводили в условиях стационара, и с целью контроля состояния добровольцев они были госпитализированы в стационар накануне дня введения препарата. Наблюдение после введения препарата проводили в течение 5 суток.

В рамках пострегистрационного исследования все добровольцы получали одинаковую дозу исследуемой вакцины или плацебо. В 1-й день доброволец получал Компонент I, на 21-й день – Компонент II.

Оценка безопасности на добровольцах

Оценка безопасности и реактогенности вакцины была основана на регистрации НЯ в ходе исследования. Врач-исследователь собирал информацию о безопасности на основании следующих параметров: частота, выраженность и

связь с вакцинацией всех НЯ/СНЯ; частота и выраженность местных признаков и системных симптомов, связь с вакцинацией зарегистрированных общих признаков и симптомов, о которых сообщалось в течение периода наблюдения. Также оценивали изменения инструментальных (ЭКГ) и лабораторных показателей (клинический и биохимический анализ крови, общий анализ мочи), динамику жизненных показателей (АД, ЧСС, температура тела).

Реактогенные свойства вакцины оценивали по показателям местных (область введения препарата) и общих (системные реакции организма на введение препарата) реакций.

Оценку местных реакций в клиническом исследовании I-II фазы проводили в течение всего периода наблюдения: в день вакцинации местную реакцию регистрировали до введения, через 30 мин, 2, 6, 12 часов (при необходимости врач-исследователь мог проводить осмотр чаще), далее регистрацию местных реакций проводили при клиническом осмотре дважды в день во время прибывания в стационаре, а также на этапе наблюдения в соответствии с графиком визитов и процедур исследования.

Оценку местных реакций в клиническом исследовании III-IV фазы проводили в течение всего периода наблюдения: в день вакцинации местную реакцию регистрировали до введения и через 7 дней.

Регистрацию параметров безопасности осуществлял врач-исследователь с момента приема добровольцем первой дозы препарата в соответствии с требованиями протокола исследования.

Оценка иммуногенности на добровольцах

Напряженность иммунитета после введения изучаемого препарата оценивали путем определения титра антител с использованием набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к RBD гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», а также на основании антиген-специфического клеточного иммунного ответа. Для оценки иммунологической эффективности использован методологический подход

на основе сравнения со значениями показателей до введения исследуемого препарата.

Показатели напряженности гуморального иммунного ответа:

- показатель сероконверсии;
- средние геометрические титры антител, специфичных к гликопротеину S SARS-CoV-2;
- титры нейтрализующих антител;
- титры нейтрализующих антител к векторам.

Показатели напряженности клеточного иммунного ответа:

- процент пролиферирующих Т-лимфоцитов после рестимуляции гликопротеином S вируса SARS-CoV-2;
- прирост концентрации ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов после рестимуляции гликопротеином S вируса SARS-CoV-2.

Оценка эффективности на добровольцах

Основным критерием эффективности в данном исследовании была доля субъектов исследования с заболеванием COVID-19, развившимся в течение 6-ти месяцев после получения второй дозы вакцины или плацебо и подтвержденном методом ПЦР после планового завершения вакцинации (через 21 день после рандомизации). Для анализа этих данных был использован χ^2 -критерий.

Расчет эффективности был проведен в соответствии с протоколом исследования. Эффективность (VE) определяли на основании отношения шансов (OR), как $VE = (1 - OR) * 100\%$. Шансы заболевания в каждой группе рассчитывали как отношение числа заболевших к числу не заболевших.

2.2.10 Статистическая обработка результатов исследований

Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ GraphPad Prizm 8 (GraphPad Software, США), а также «Excel» («Microsoft», США). При анализе данных использовали U-критерий Манна-Уитни (для сравнения различных количественных показателей между двумя

независимыми группами) и Т-критерий Вилкоксона (для сравнения среднегеометрических титров антител до и после вакцинации внутри одной группы). Нормальность распределения определяли с помощью обобщенного теста Д'Агостино-Пирсона. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена использовали для связи между порядковыми переменными или количественными данными, которые не подчиняются нормальному распределению. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Конструирование и характеристика рекомбинантных векторов на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующих ген протективного антигена коронавируса SARS-CoV-2

3.1.1 Выбор протективного антигена и рекомбинантных векторов

Используя сведения из литературы и наш опыт по разработке вакцины для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома, на начальном этапе работы был осуществлен выбор протективного антигена и рекомбинантного вирусного вектора.

Среди четырех структурных белков вируса SARS-CoV-2 три способны вызывать специфический иммунный ответ и, следовательно, обладают защитным потенциалом. Для оценки протективных свойств данных белков нами были сконструированы рекомбинантные Ад5, несущие гены S-, M- или N-белка вируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 (rAd5-S, rAd5-M и rAd5-N, соответственно) [Должикова и соавт., 2024].

Исследование проводили на трансгенных мышах Tg(K18-ACE2)2Pr1mn. Для этого животных разделили на 4 группы по 10 животных в каждой. Животным внутримышечно двукратно с интервалом в 21 день вводили рекомбинантные аденовирусы (rAd5-S, rAd5-M или rAd5-N) в дозе 10^9 в.ч./животное. Через 7 дней после второго введения животных заражали вирусом SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1 интраназально в дозе 10^5 ТЦД₅₀. Оценку протективной эффективности антигенов проводили по двум параметрам: летальность и тяжесть течения инфекции (снижение веса) у иммунизированных животных в сравнении с контрольными (неиммунизированными) (рисунок 5).

У неиммунизированных животных начиная с 3-го дня после заражения вирусом SARS-CoV-2 фиксировали ухудшение общего самочувствия, прогрессирующее с течением времени.

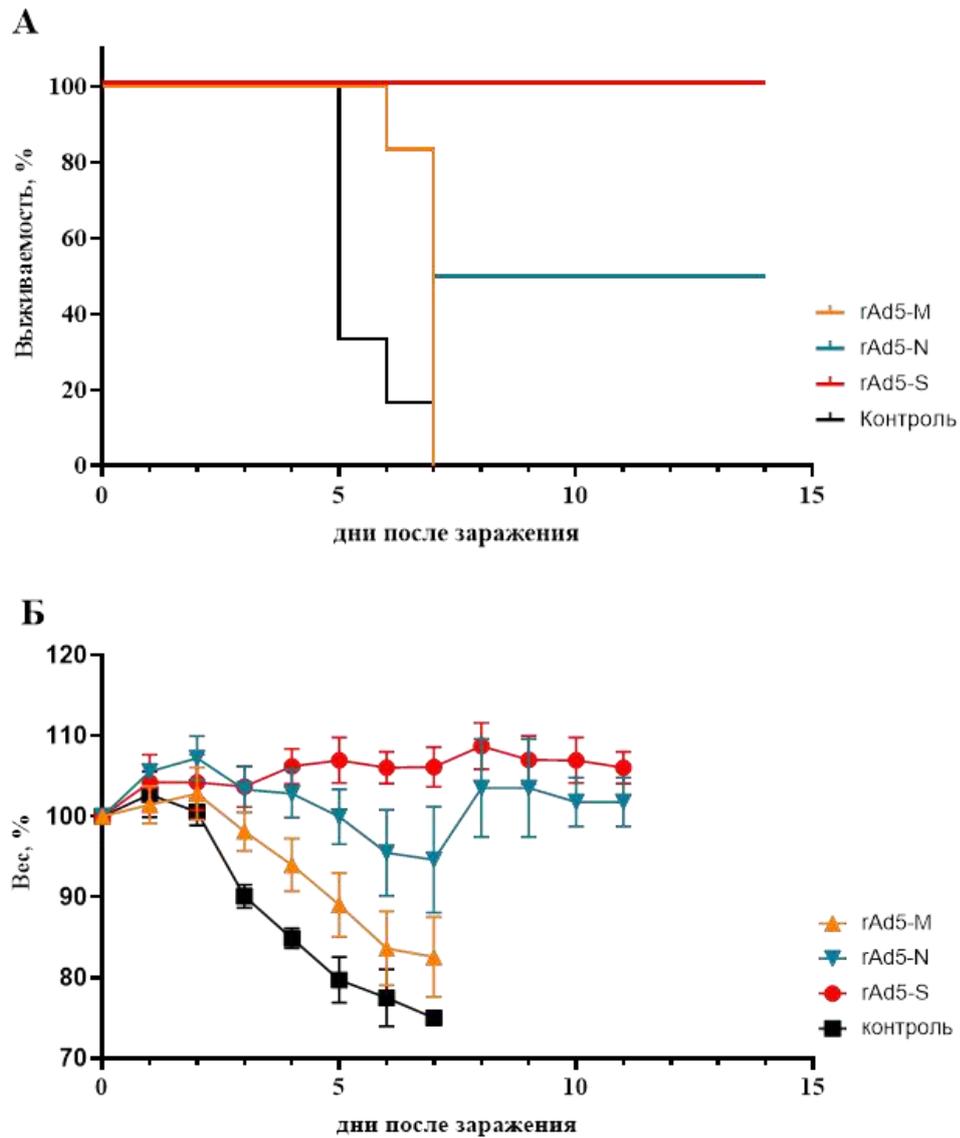


Рисунок 5 – Выживаемость (А) и динамика массы (Б) hACE2-трансгенных мышей, иммунизированных rAd5-S, rAd5-M и rAd5-N и контрольной групп после заражения вирусом SARS-CoV-2.

Начиная с 5-го дня после заражения наблюдали гибель, и к 7-му дню после заражения все животные в этой группе умерли (n=10). У животных, иммунизированных rAd5-M, также отмечали ухудшение общего состояния начиная с 3-го дня после заражения, и к 7-му дню детектирована 100% гибель. В группе животных, иммунизированных rAd5-N, наблюдалась аналогичная картина ухудшения общего состояния, однако к 7-му дню летальный исход зафиксирован у 50% животных (n=5 из 10). У животных, иммунизированных rAd5-S, после

заражения не наблюдали признаков ухудшения состояния, все животные (n=10) выжили, что свидетельствует о выраженном защитном эффекте гликопротеина S.

Таким образом, из трех структурных белков вируса SARS-CoV-2 только гликопротеин S позволяет сформировать протективный иммунный ответ, который защищает 100% животных от летальной инфекции.

Поверхностный гликопротеин S имеет важное значение в жизненном цикле коронавируса SARS-CoV-2 и обладает наибольшими протективными свойствами среди других белков, индуцируя В- и Т-клеточный иммунный ответ [Liu et al., 2020]. Вирион SARS-CoV-2 содержит от 15 до 40 молекул белка S в тримерной форме, хаотично распределенных по поверхности вирусной частицы [Saville et al., 2022]. При этом около 97% белков находится в неактивной форме, так называемой конформации до слияния. Кроме того, в этой конформации белок S обладает двумя состояниями рецептор-связывающего домена: открытым и закрытым. Для открытого состояния характерно экспонирование вверх одного или нескольких RBD на поверхности тримера. При разработке вакцин для профилактики ТОРС и БВРС было показано, что сохранение гликопротеина S в конформации до слияния повышает его стабильность и иммуногенность [Pallesen et al., 2017; Kirchdoerfer et al., 2018]. Стабилизация белка S достигается путем мутации двух аминокислот K986 и V987 в субъединице S2 между центральной спиралью и первым гептадным повтором на пролин (P) [Wrapp et al., 2020]. Это приводит к тому, что большое количество антител образуется к RBD-домену. При этом часть эпитопов, присущих нативной форме белка S, становится недоступной. Таким образом, иммунитет после вакцинации преимущественно формируется по отношению к RBD и в меньшей степени – к остальным частям молекулы. В связи с этим мы решили использовать нестабилизированную, нативную форму белка S.

Исходная последовательность гена гликопротеина S не является оптимальной для экспрессии в эукариотических клетках (индекс адаптации кодонов CAI (Codon Adaptation Index) равен 0,67). Поэтому была проведена оптимизация нуклеотидной последовательности полноразмерного гена гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 (рисунок 6).



Рисунок 6 – Выравнивание последовательности гена белка S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 (1) с полученной оптимизированной последовательностью синтетического гена (2), выполненное в программе Geneious Prime. Нуклеотиды, отличающиеся от последовательности нативного гена, выделены цветными прямоугольниками.

В оптимизированном гене CAI составил 0,94. Оптимизация нуклеотидной последовательности привела к увеличению GC-состава (с 37,3% до 56,7%), удалению внутренних сигналов терминации транскрипции (с 7 до 0), альтернативных донорных (с 11 до 1) и акцепторных (с 16 до 4) сайтов сплайсинга, а также прямых и инвертированных повторов (с 37 до 3). К гену с 5'-конца была добавлена полная последовательность Козак, а с 3'-конца последовательность, состоящая из двух наиболее частотных терминирующих кодонов – TGA и TAA [Зубкова и соавт., 2024б]. Оптимизированная последовательность гена гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 была искусственно синтезирована.

Далее был определен тип рекомбинантного вирусного вектора. Наиболее изученной технологической платформой, используемой для разработки вакцинных препаратов, являются рекомбинантные векторы на основе аденовирусов различных серотипов [Черенова и соавт., 2017а; Черенова и соавт., 2017б]. Преимущества аденовирусных векторов заключаются в их молекулярно-генетических, физико-химических и биологических свойствах. Геномы различных серотипов аденовирусов хорошо изучены, что позволяет легко проводить их модификации. Препараты на основе аденовирусных векторов обладают доказанным профилем безопасности, высокой иммуногенностью, термостабильностью и длительным сроком хранения [Kerstetter et al., 2020; Sayedahmed et al., 2019].

Из множества существующих аденовирусов наиболее детально изучены аденовирусы человека 5 и 26 серотипов. Для формирования выраженного и длительного адаптивного иммунитета многообещающим приемом является гетерологичная вакцинация в режиме прайм-буст, когда для первичной и вторичной иммунизации используют различные вирусные векторы. Такая схема была успешно реализована при разработке вакцины против БВРС [Должикова и соавт., 2020; Ковыршина и соавт., 2020]. В связи с этим Ад26 и Ад5 стали основой для создания рекомбинантных векторов.

3.1.2 Конструирование рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2

Рекомбинантные векторы на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующие ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, получали по технологии, описанной нами ранее [Logunov et al., 2007; Garas et al., 2014; Islamov et al., 2021]. Данная технология включает четыре этапа:

1 – разработка дизайна и получение плазмидных конструкций, несущих модифицированный (делеции E1- и E3-областей) геном аденовируса человека соответствующего серотипа;

2 – клонирование синтезированного гена в плазмиду, несущую пустую экспрессионную кассету (CMV-промотор, сигнал полиаденилирования) и последовательности (плечи) гомологии;

3 – получение плазмидных конструкций, несущих геном Ад26 или Ад5 (с удаленными E1- и E3-областями) и целевой ген методом гомологичной рекомбинации в бактериальных клетках *E. coli*;

4 – сборка и наращивание рекомбинантных аденовирусов.

3.1.2.1 Конструирование рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2

При помощи методов генной инженерии была сконструирована плазида pAd26-Ends, несущая начало и конец генома Ад26 (два плеча гомологии – левое и правое). В плазмиде pAd26-Ends левое плечо гомологии начинается с сайта рестрикции SmaI, включает последовательность генома Ад26 от 1 до 3962 нуклеотида (GenBank accession no. EF153474) с делецией E1-области (470 – 3400 п.н.) и заканчивается сайтом рестрикции MluI. В месте делеции E1-области располагаются сайты для рестриктаз PmeI и Bst1107I. Правое плечо размером 1075 п.н. (нуклеотиды с 34078 по 35152) начинается с сайта для рестриктазы MluI и заканчивается сайтом для рестриктазы PacI.

Для получения плазмидной конструкции, несущей полный геном Ад26 с делецией E1-области, из вирионов Ад26 «дикого типа» выделяли ДНК и смешивали с плазмидой pAd26-Ends, линейаризованной рестриктазой MluI (рисунок 7). В результате гомологичной рекомбинации была получена плазида pAd26-ΔE1.

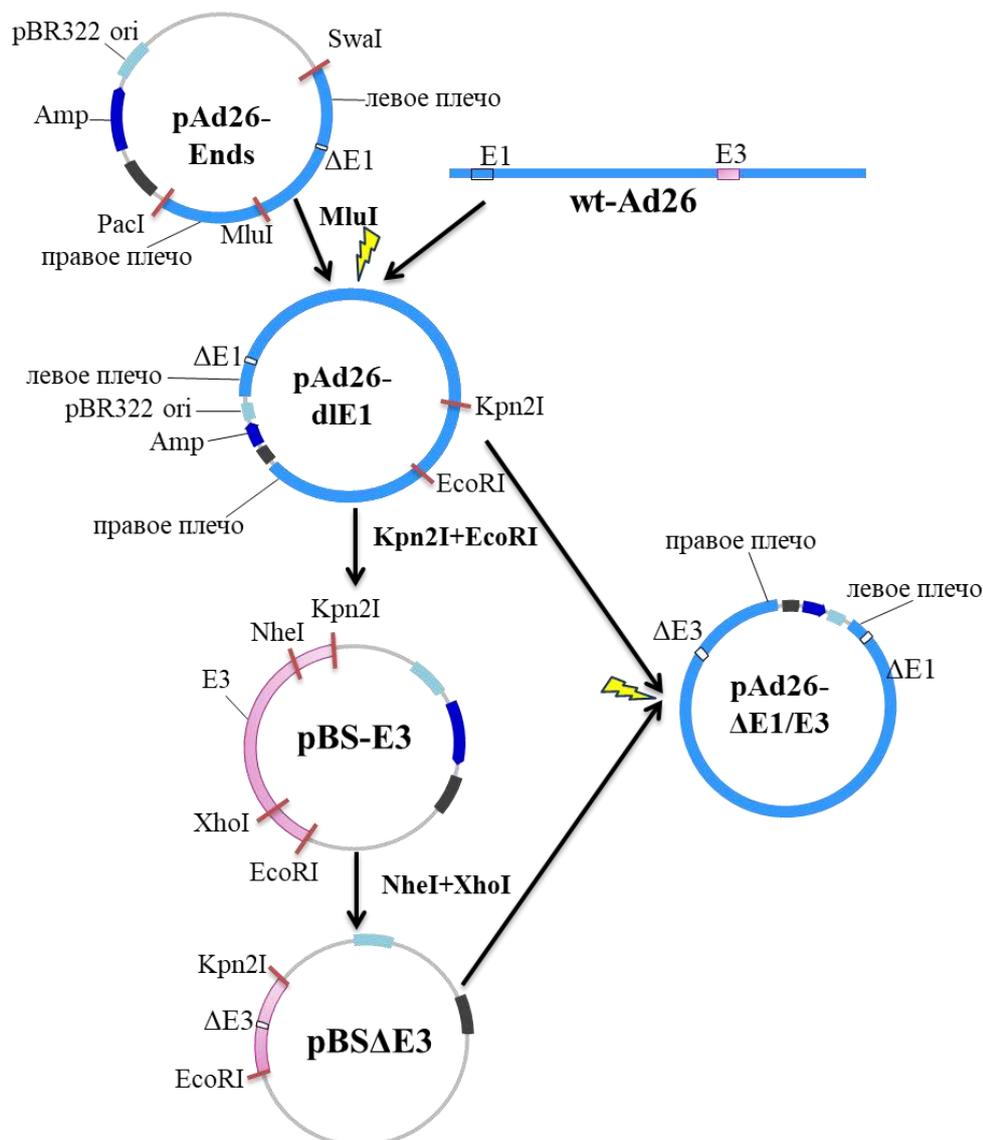


Рисунок 7 – Схема получения плазмиды, несущей полный геном Ад26 с делециями E1- и E3-областей.

Следующим этапом было удаление в сконструированной плазмиде pAd26-ΔE1 E3-области генома размером 3317 п.н. (27003 – 30319 п.н., GenBank accession no. EF153474) (рисунок 6). Из плазмиды pAd26-ΔE1 рестриктазами Kpn2I и EcoRI вырезали фрагмент генома. В нем с помощью NheI и XhoI делетировали E3-

область. Далее проводили гомологичную рекомбинацию между двумя плазмидами: pBS Δ E3 и pAd26- Δ E1. Таким образом, нами была получена плазмида pAd26- Δ E1/E3, содержащая геном аденовируса человека 26 серотипа с делециями E1- и E3-областей.

С использованием стандартных методов клонирования в сконструированной плазмиде pAd26- Δ E1/E3 была заменена последовательность, содержащая открытую рамку считывания 6 (ORF6) размером 989 п.н. (32213 – 33201 п.н., GenBank accession no. EF153474), на аналогичную последовательность из генома аденовируса человека 5 серотипа размером 1175 п.н. (32914 – 34089 п.н., GenBank accession no. AC_000008). Описанная замена необходима для того, чтобы рекомбинантный Ад26 был способен эффективно размножаться в культуре клеток НЕК 293. В результате была получена плазмида pAd26-only-null (рисунок 8).

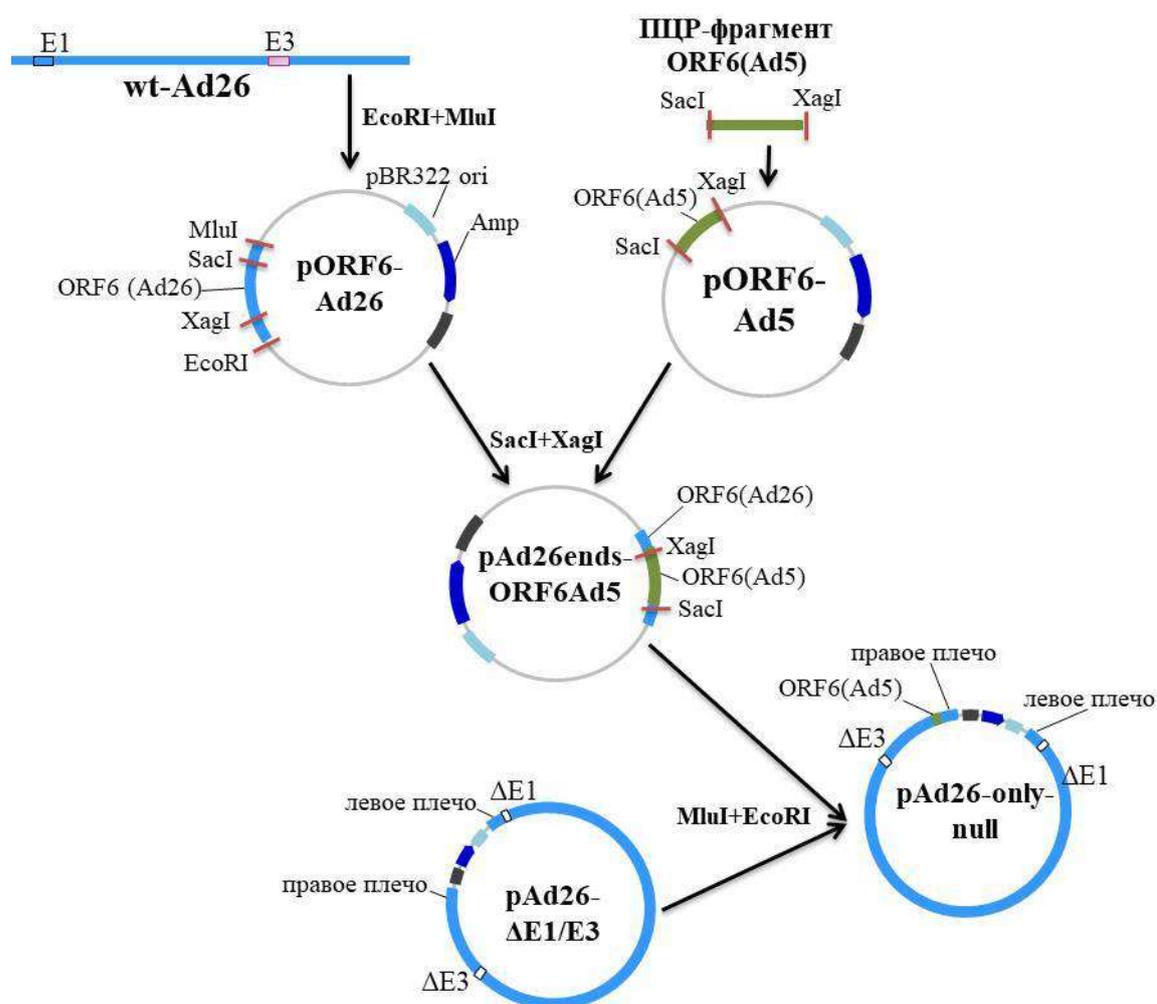


Рисунок 8 – Схема получения плазмиды, несущей полный геном Ад26 с делециями E1- и E3-областей и модификацией ORF6.

Следующим этапом было получение плазмидной конструкции pAd26-only-CMV-S-CoV2 (рисунок 9). Искусственно синтезированную последовательность гена гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 клонировали в плазмиду, несущую пустую экспрессионную кассету (CMV-промотор, сигнал полиаденилирования) и плечи гомологии Ад26. Далее плазмиду pAd26-only-null смешивали с линейаризованной плазмидой pArms-26-CMV-S-CoV2, и в результате гомологичной рекомбинации была получена плазида pAd26-only-CMV-S-CoV2, несущая полноразмерный геном Ад26 с модификацией ORC6 и делецией E1- и E3-областей. В сайте делеции E1-области содержится экспрессионная кассета с геном гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2.

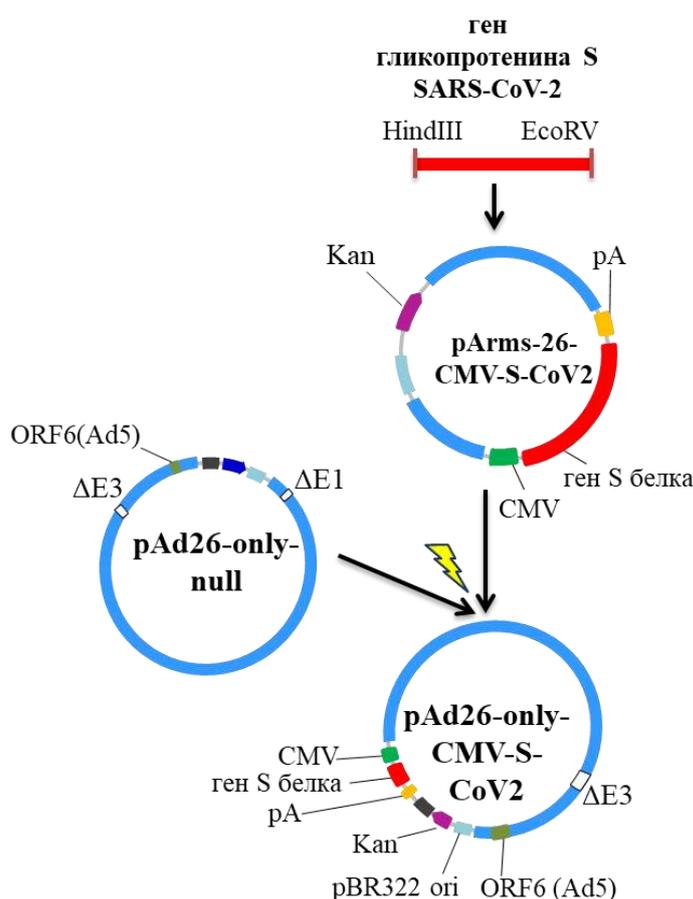


Рисунок 9 – Схема получения плазмиды, несущей полный геном Ад26 с делециями E1- и E3-областей, модификацией ORF6 и геном гликопротеина S вируса SARS-CoV-2.

На каждом этапе подлинность полученных плазмид подтверждали с помощью ПЦР и рестрикционного картирования.

Нуклеотидную последовательность конечной плазмидной конструкции рAd26-only-CMV-S-CoV2 (рисунок 10 А) определяли методами рестрикционного картирования и полногеномного секвенирования.

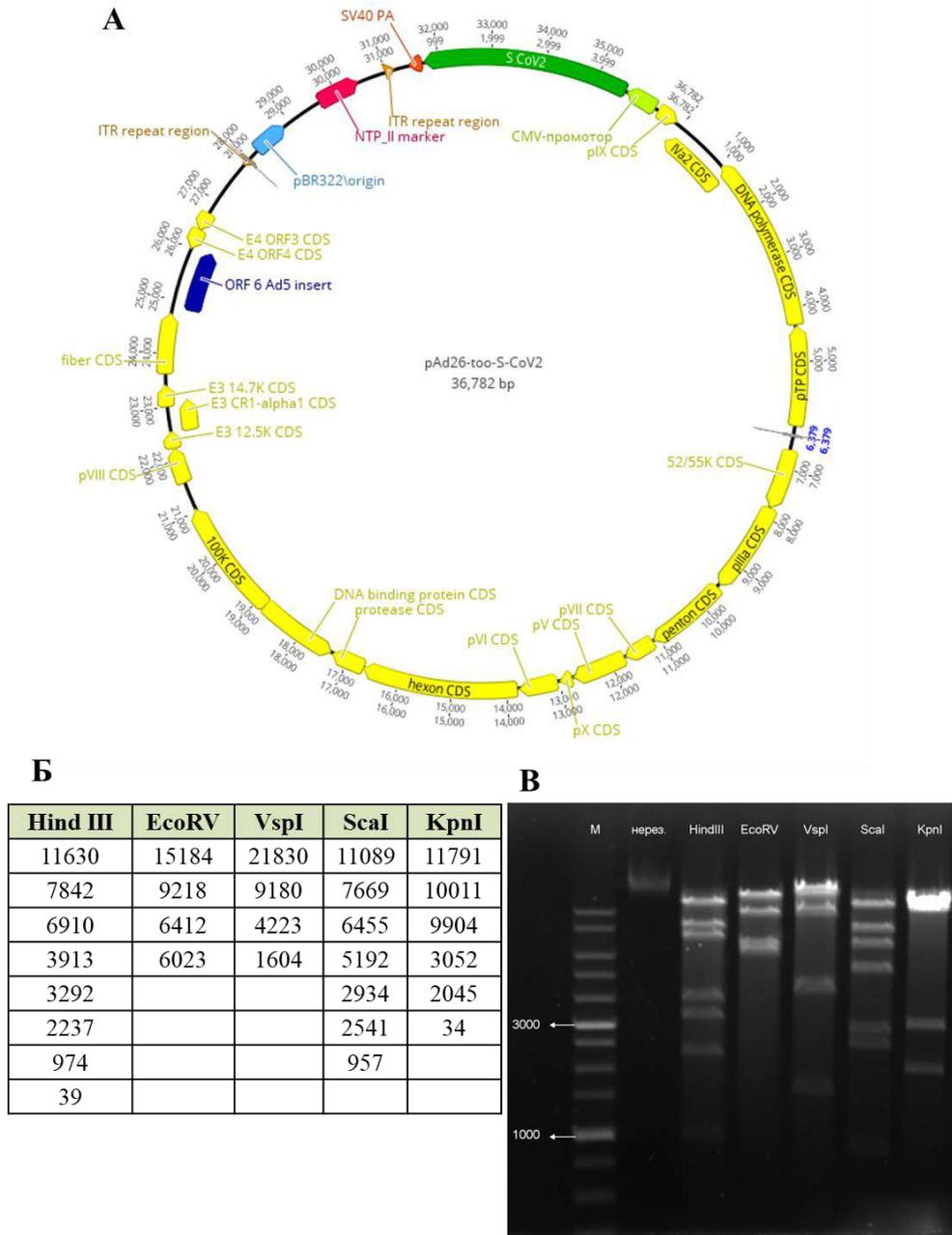


Рисунок 10 – Плазмида рAd26-only-CMV-S-CoV2. (А) Карта рAd26-only-CMV-S-CoV2, построенная в программе Geneious Prime. (Б) Размеры фрагментов ДНК рAd26-only-CMV-S-CoV2, полученные при рестрикции. (В) Электрофореграмма анализа рAd26-only-CMV-S-CoV2. М – Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия); нерез. – негидролизованная плазмидная конструкция.

Согласно рестрикционной карте, pAd26-only-CMV-S-CoV2 имеет размер 36782 п.н. и содержит 8 сайтов узнавания для эндонуклеазы рестрикции HindIII, 7 сайтов для ScaI, 6 сайтов для KpnI и по 4 сайта для EcoRV и VspI (рисунок 10Б). Фрагменты, полученные при гидролизе, соответствовали расчетным, не было детектировано фрагментов другого молекулярного размера (рисунок 10В).

Изучение данных, полученных в результате секвенирования, выявило полное соответствие (100% гомологию) нуклеотидной последовательности Ад26 (без учета делеций и модификаций), а также 100% гомологию с исходным целевым геном в составе экспрессирующей кассеты.

Рекомбинантный репликативно-дефектный Ад26, несущий ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (rAd26-S-CoV2) получали путем трансфекции пермиссивных клеток линии НЕК 293 линейаризованной плазмидой pAd26-only-CMV-S-CoV2 (удалена векторная часть, содержащая точку начала репликации и ген устойчивости к селективному антибиотику). Репликация и сборка вируса происходят в результате наличия в геноме клеток НЕК 293 E1-области Ад5. Замена ORC6, кодирующей белок 34К, в Ад26 на аналогичную рамку Ад5 обеспечивает эффективную продукцию рекомбинантного вируса в клетках НЕК293, так как в жизненном цикле аденовирусов белок 55К (закодированный в E1В-области) и белок 34К образуют комплекс, который необходим для экспрессии генов структурных белков, а также влияет на транспорт вирусных мРНК из ядра в цитоплазму [Rubenwolf et al., 1997]. Таким образом, был получен штамм рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса человека 26 серотипа, несущий ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (приложение А).

Дальнейшее накопление rAd26-S-CoV2 проводили в суспензионных клетках линии НЕК 293. Использование суспензионной культуры клеток позволяет масштабировать процессы культивирования до производственных биореакторов. Очистка рекомбинантного вируса rAd26-S-CoV2 включала три последовательные стадии: диафильтрацию с использованием мембран с пределом отсечения до 300

кДа, хроматографию на анионообменном сорбенте и хроматографию на мультимодальном сорбенте.

3.1.2.2 Конструирование рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2

При помощи методов генной инженерии была сконструирована плаزمида pAd5-Ends, несущая начало (левое плечо гомологии) и конец (правое плечо гомологии) генома Ад5. В плазмиде pAd5-Ends левое плечо гомологии начинается с сайта рестрикции PaeI, включает последовательность генома Ад5 от 1 до 5648 нуклеотида (GenBank accession no. AC_000008) с делецией E1-области (342 – 3534 п.н.) и заканчивается сайтом рестрикции PmeI. В месте делеции E1-области располагается экспрессионная кассета (CMV-промотор, полилинкер и сигнал терминации и полиаденилирования). Правое плечо (нуклеотиды с 35276 по 35938) заканчивается сайтом для рестриктазы PaeI.

Для получения плазмидной конструкции, несущей полный геном Ад5 с делецией E1-области, из вирионов Ад5 «дикого типа» выделяли ДНК и смешивали с линейаризованной по PmeI плазмидой pAd5-Ends (рисунок 11). В результате гомологичной рекомбинации была получена плаزمида pAd5-ΔE1.

Далее в сконструированной плазмиде pAd5-ΔE1 была удалена E3-область генома размером 2685 п.н. (28134 – 30818 п.н., GenBank accession no. AC_000008). Для этого из генома Ад5 по рестриктазе HindIII вырезали фрагмент генома. В нем с помощью BglII делетировали E3-область. Далее проводили гомологичную рекомбинацию между получившейся плазмидой pBS-ΔE3 и плазмидой pAd5-ΔE1. В результате получена плаزمида pAd5-ΔE1/E3 на основе генома аденовируса человека 5 серотипа с делецией E1 и E3-областей.

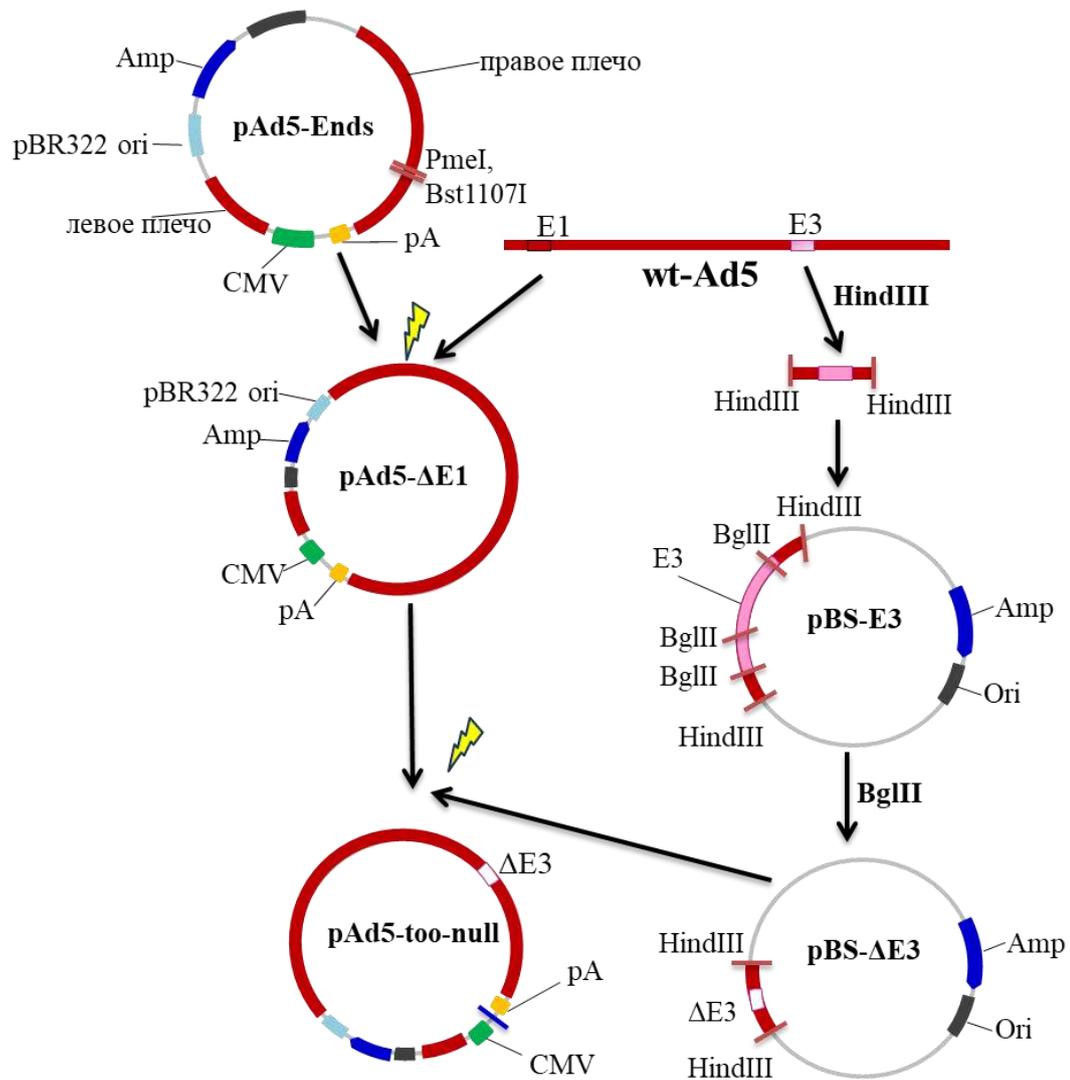


Рисунок 11 – Схема получения плазмиды, несущей полный геном Ад5 с делециями E1- и E3-областей.

Следующим этапом было получение плазмидной конструкции pAd5-too-CMV-S-CoV2 (рисунок 12). Искусственно синтезированную последовательность гена гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 клонировали в плазмиду, несущую пустую экспрессионную кассету (CMV-промотор и сигнал полиаденилирования) и плечи гомологии с последовательностью Ад5. Далее плазмиду pAd5-too-null смешивали с линейризованной плазмидой pArms-Ad5-CMV-S-CoV2, и в результате гомологичной рекомбинации была получена плазида pAd5-too-CMV-S-CoV2, несущая полноразмерный геном Ад5 с делецией E1 и E3-областей. В сайте делеции содержится экспрессионная кассета с геном гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2.

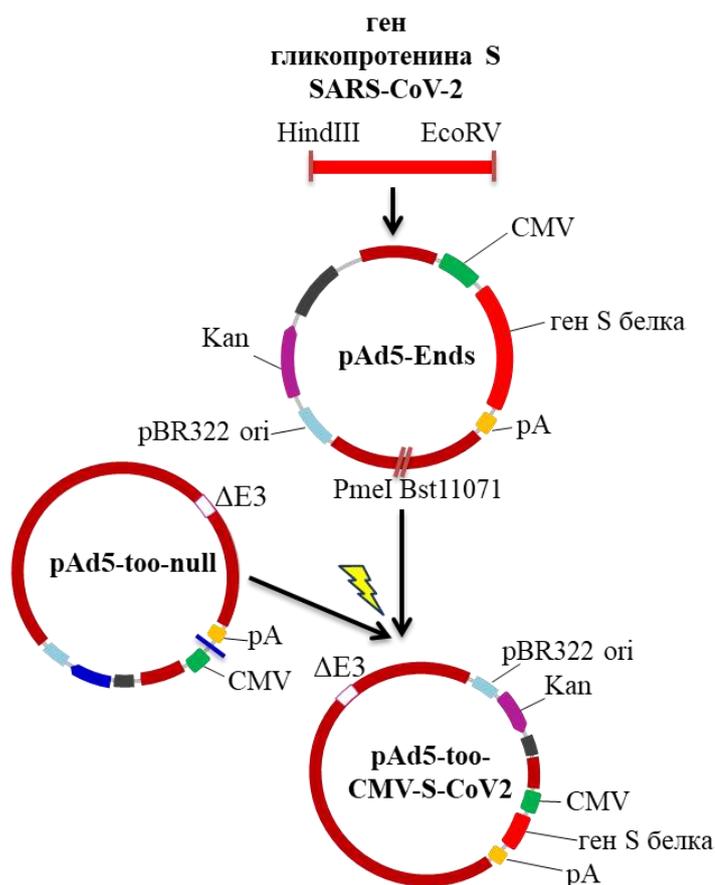


Рисунок 12 – Схема получения плазмиды, несущей полный геном Ад5 с делециями E1- и E3-областей и геном гликопротеина S вируса SARS-CoV-2.

На каждом этапе подлинность полученных плазмид подтверждали с помощью ПЦР и рестрикционного картирования.

Нуклеотидную последовательность полученной плазмидной конструкции pAd5-too-CMV-S-CoV2 (рисунок 13А) определяли методами рестрикционного картирования и полногеномного секвенирования.

Согласно рестрикционной карте, pAd5-too-CMV-S-CoV2 имеет размер 37745 п.н. и содержит 8 сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции EcoRV и HindIII, 7 сайтов для NotI и PvuI и 6 сайтов для XhoI (рисунок 13Б). Фрагменты, полученные при гидролизе соответствовали расчетным, не было детектировано фрагментов другого молекулярного размера (рисунок 13В).

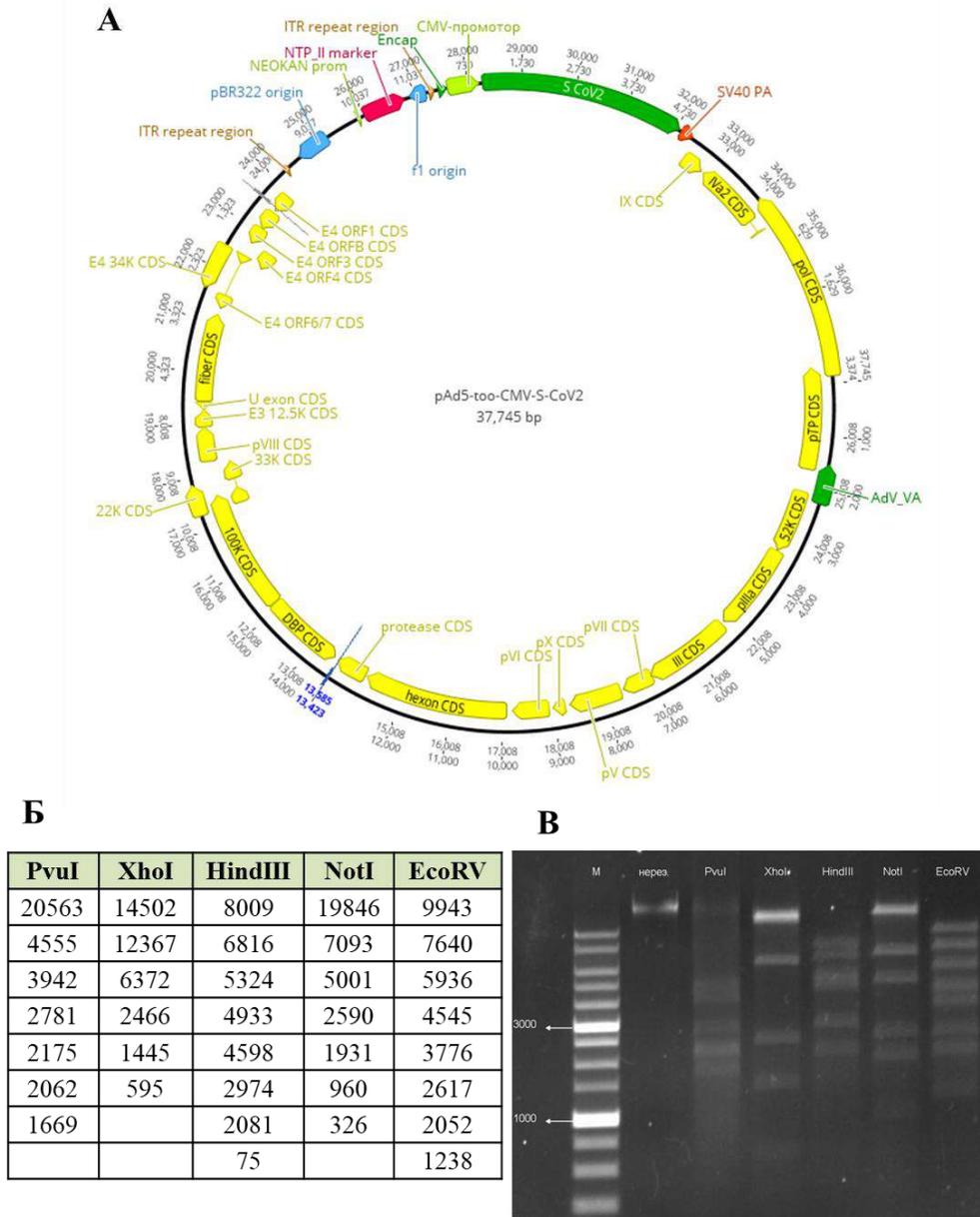


Рисунок 13 – Плазмида pAd5-too-CMV-S-CoV2. (А) Карта pAd5-too-CMV-S-CoV2, построенная в программе Geneious Prime. (Б) Размеры фрагментов ДНК pAd5-too-CMV-S-CoV2, полученные при рестрикции. (В) Электрофореграмма анализа pAd5-too-CMV-S-CoV2. М – Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия); нерез. – негидролизованная плазмидная конструкция.

Изучение данных, полученных в результате секвенирования, выявило полное соответствие (100% гомологию) нуклеотидной последовательности Ад5 (без учета делеций и модификаций), а также 100% гомологию с исходным целевым геном в составе экспрессирующей кассеты.

Рекомбинантный репликативно-дефектный аденовирус человека 5 серотипа, несущий ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (rAd5-S-CoV2) получали путем трансфекции перmissive клеток линии HEK293 линейаризованной плазмидной конструкцией pAd5-too-CMV-S-CoV2 (удалена векторная часть, содержащая точку начала репликации и ген устойчивости к селективному антибиотику). Репликация и сборка вируса происходят в результате наличия в геноме клеток HEK 293 E1-области Ад5. Таким образом, был получен штамм рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса человека 5 серотипа, несущий ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 (приложение А).

Дальнейшее накопление rAd5-S-CoV2 проводили в суспензионных клетках линии HEK 293 в промышленном биореакторе. Очистка рекомбинантного вируса rAd5-S-CoV2 включала три последовательные стадии: диафильтрации с использованием мембран с пределом отсечения до 300 кДа, хроматографии на анионообменном сорбенте и хроматографии на мультимодальном сорбенте.

3.1.3 Изучение физико-химических и молекулярно-биологических свойств rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2

Полученные рекомбинантные аденовирусные векторы характеризовали по физико-химическим и молекулярно-биологическим свойствам.

Прогнозируемый размер аденовирусной частицы складывается из размера капсида (70-90 нм) и длины фибера [Rux, Burnett, 2004]. Анализ размера частиц проводили методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS (ZEN3600, Malvern, Великобритания). Данные по размеру частиц рекомбинантных аденовирусов, rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, представлены на рисунке 14.

Размер вирионов rAd26-S-CoV2 составляет $98,43 \pm 21,98$ нм, размер вирионов rAd5-S-CoV2 составляет $127,6 \pm 40,03$ нм. При этом наблюдается один симметричный пик без примесных компонентов, что говорит о высокой

однородности частиц по размерам в полученном препарате [Зубкова и соавт., 2024a].

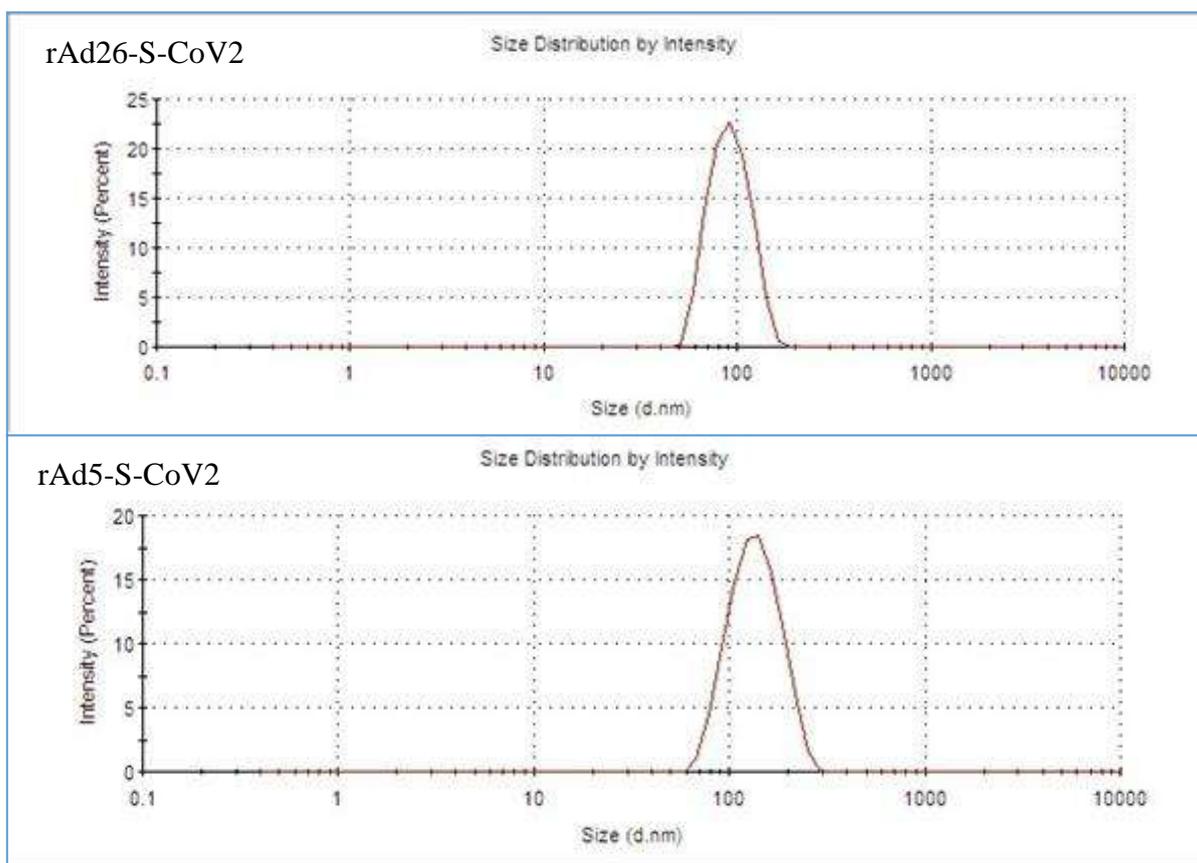


Рисунок 14 – Результаты анализа однородности распределения рекомбинантных аденовирусных частиц по размерам.

Отличие в размере вирионов заключается в разной длине фибера у Ад5 и Ад26, которая зависит от количества повторов между N- и С-концами стержневого домена фибера. Ад26 имеет относительно короткий фибер ~12-15 нм с 7-8 повторами в стержневом домене по сравнению с ~22 повторами у Ад5 (длина фибера ~37 нм) [Yu et al., 2017].

Для определения спектра аденовирусных белков применяли метод вертикального электрофореза в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ПААГ). Капсид аденовируса состоит из трех мажорных белков – гексона (белок II), основания пентона (белок III), фибера (белок IV) и минорных белков – IIIa, VI, VIII, IX, а также коровых белков – VII, V, TP, μ , AVP, IVa [Benevento et al.,

2014]. Данные по полипептидному составу рекомбинантных аденовирусов представлены на рисунке 15.

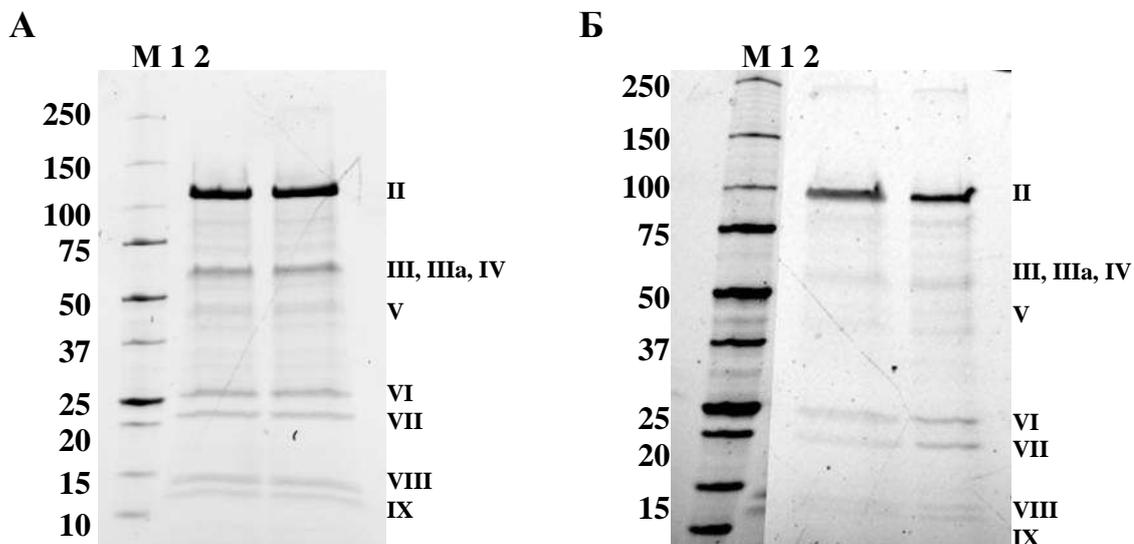


Рисунок 15 – Полипептидный состав рекомбинантных аденовирусных векторов rAd26-S-CoV2 (А) и rAd5-S-CoV2 (Б). М – маркер молекулярного веса, 1 – анализируемые образцы, 2 – контрольные вирусы rAd26-EGFP или rAd5-EGFP.

Как видно из рисунка, анализ белкового спектра рекомбинантных аденовирусов rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 свидетельствует о наличии в препаратах мажорных белков капсида (гексона, основания пентона и фибера), минорных белков и некоторых коровых белков [Зубкова и соавт., 2024а].

Молекулярная масса полипептидов rAd26-S-CoV2 была следующая: гексон (белок II) ~ 120 кДа; основание пентона (белок III), белок IIIa и фибер (белок IV) ~ 65 кДа; минорный коровый белок V ~ 48 кДа; ассоциированный с гексоном белок VI ~ 28 кДа; мажорный коровый белок VII ~ 18 кДа; белки VIII и IX ~ 14 и 12 кДа, что соответствует данным литературы [Yu et al., 2017; Nemerow et al., 2013].

Молекулярная масса полипептидов rAd5-S-CoV2 следующая: гексон (белок II) ~ 110 кДа; основание пентона (белок III) ~ 85 кДа; белок IIIa и фибер (белок IV) ~ 62 кДа; минорный коровый белок V ~ 41 кДа; ассоциированный с гексоном белок VI ~ 25 кДа; мажорный коровый белок VII ~ 22 кДа; белки VIII и IX ~ 14 кДа и 12 кДа, что соответствует данным литературы [Martín-González et al., 2019; Nemerow et al., 2013].

Таким образом, исследуемые препараты рекомбинантных аденовирусов, rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, содержали белки капсида без примеси посторонних белков, что свидетельствует о высокой степени их очистки.

Экспрессию гена гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 в составе генома полученных рекомбинантных аденовирусных векторов rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 определяли методом иммуноблотинга. Клетки НЕК 293 трансдуцировали рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2. Отрицательным контролем служили клетки, которые были трансдуцированы контрольными аденовирусами rAd26-EGFP и rAd5-EGFP, экспрессирующими ген EGFP (зеленый флуоресцентный белок). Экспрессию гена гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 проводили в лизатах трансдуцированных клеток, поскольку этот белок является трансмембранным. Результаты иммуноблотинга представлены на рисунке 16.

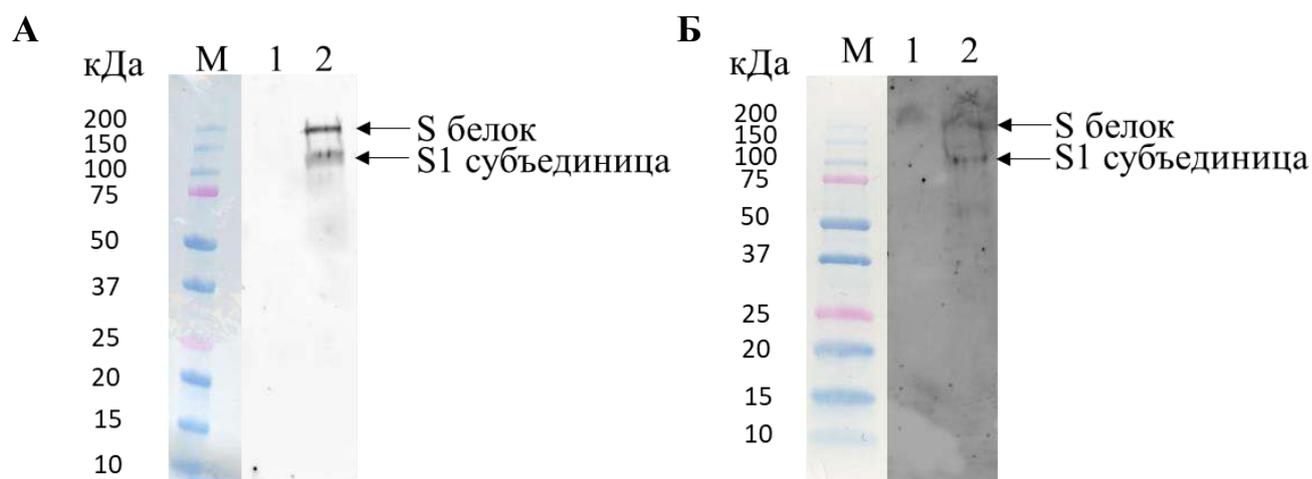


Рисунок 16 – Иммуноблотинг лизатов клеток НЕК 293, трансдуцированных rAd5-S-CoV2 (А) и rAd26-S-CoV2 (Б). 1 – клетки, трансдуцированные контрольными препаратами (rAd26-EGFP или rAd5-EGFP), 2 – клетки, трансдуцированные rAd5-S-CoV2 или rAd26-S-CoV2.

Как видно из рисунка, в образцах rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 гликопротеин S выявлен в виде двух полипептидов. Верхняя полоса представляла собой полноразмерную гликозилированную форму гликопротеина S с молекулярной массой ~180 кДа, нижняя – субъединицу S1 с молекулярной массой ~120 кДа, которая образуется в результате расщепления полноразмерного S-белка

протеазами клетки. В контрольных образцах какой-либо формы гликопротеина S не детектировали.

Гликопротеин S вируса SARS-CoV-2, как и S-белки других коронавирусов, индуцирует образование синцитиев путем слияния оболочки вируса с мембраной клетки хозяина или клетки с клеткой, что приводит к формированию гигантских многоядерных клеток [Matsuyama et al., 2020]. Способность к образованию синцитиев коррелирует с вирулентностью и способностью развития острых воспалительных реакций и тяжелых патологий [Matsuyama et al., 2020; Rajah et al., 2022]. Кроме того, синцитии способствуют распространению вируса и уклонению от иммунитета [Rajah et al., 2022].

Для исследования способности гликопротеина S, экспрессируемого рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, приводить к образованию синцитиев применяли функциональный тест. Клетки линии Vero E6 трансдуцировали rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, через 24 часа клетки окрашивали и микроскопировали. Результаты исследования представлены на рисунке 17.

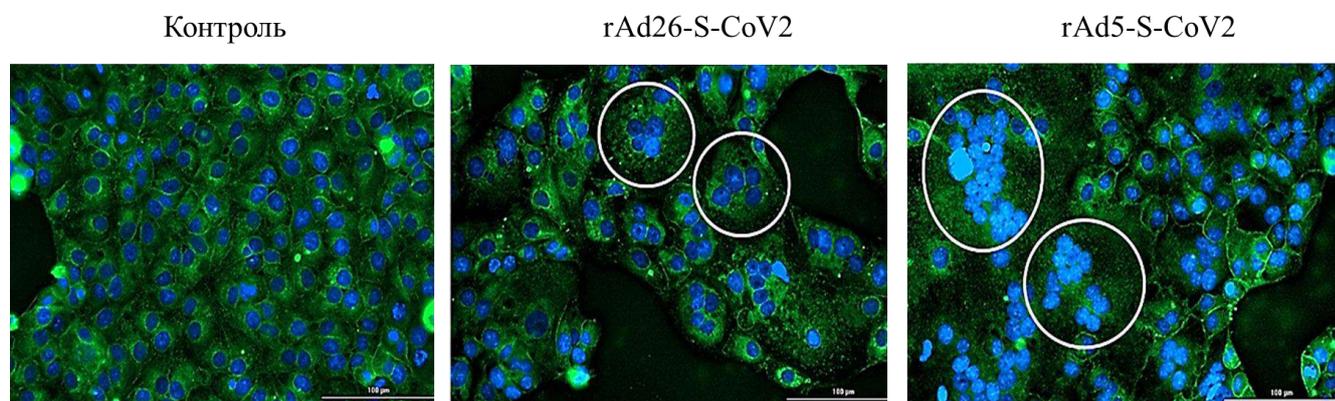


Рисунок 17 – Микрофотографии клеток линии VeroE6, трансдуцированных rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2. Белым кругом указаны синцитии.

Как видно из рисунка, в результате экспрессии гена гликопротеина S в клетках, трансдуцированных rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, происходит формирование многоядерных клеток – синцитиев.

Таким образом, после трансдукции эукариотических клеток рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 синтезируется функциональный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2.

3.1.4 Исследование иммуногенности рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2

Комплексную оценку специфической иммунологической активности полученных рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, проводили на мышах [Tukhvatulin et al., 2022; Атауллаханов и соавт., 2023; Зубкова и соавт., 2024а; Сухова и соавт., 2024а; Dolzhikova et al., 2024]. Изучение иммуногенности включало в себя определение гуморального и клеточного поствакцинального иммунного ответа. Исследование гуморального иммунного ответа проводили по определению уровня специфических IgG антител к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 и изотипов специфических IgG антител в сыворотке крови иммунизированных животных методом ИФА. Клеточный иммунный ответ оценивали по количеству пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов *in vitro* после повторной стимуляции клеток рекомбинантным S-белком вируса SARS-CoV-2 методом проточной цитофлуориметрии и по секреции цитокинов в культуральной среде Т-лимфоцитов методом ИФА. Кроме того, проводили оценку гуморального поствакцинального иммунного ответа при различных схемах вакцинации.

3.1.4.1 Исследование гуморального поствакцинального иммунного ответа у мышей

Исследование проводили на мышах линии BALB/c (по 6 животных в группе). Животным однократно внутримышечно вводили rAd26-S-CoV2 или rAd5-S-CoV2 в дозе 10¹⁰ в.ч. Проводили забор крови из хвостовой вены через 14, 21, 28 и 42 дня после иммунизации. Гуморальный иммунный ответ оценивали по титру антиген-специфичных IgG антител к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у мышей после введения рекомбинантных аденовирусов rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 по титрам IgG антител представлена на рисунке 18.

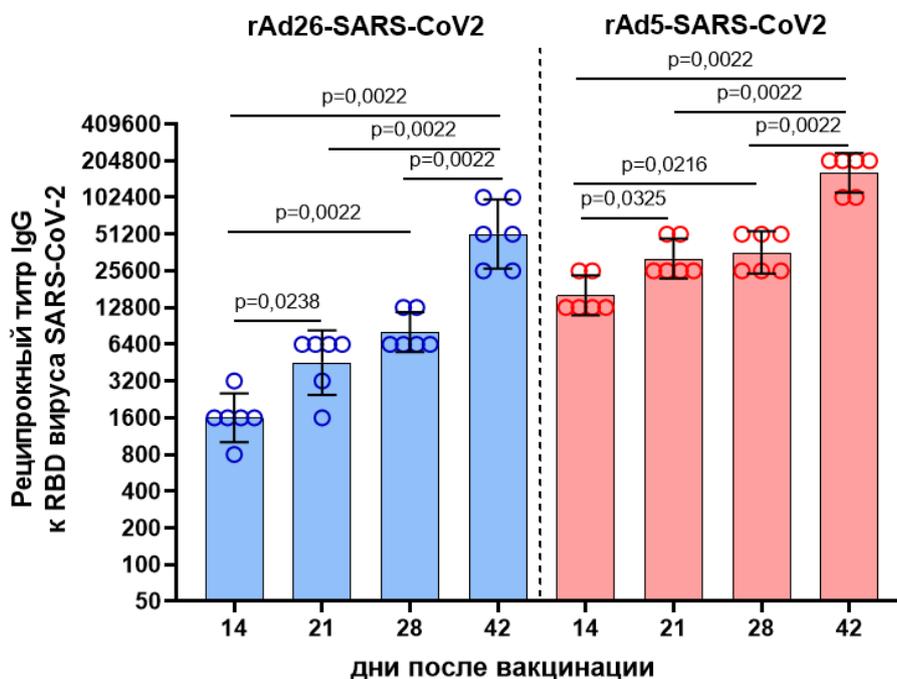


Рисунок 18 – Изменение титров IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 на 14-й, 21-й, 28-й и 42-й дни после иммунизации мышей рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

У всех животных, получивших рекомбинантный аденовирус rAd26-S-CoV2, на 14-й день после иммунизации детектировали формирование антиген-специфических IgG антител (СГТ=1:1600). К 21-му дню наблюдали достоверное повышение титра антиген-специфических IgG до СГТ=1:4525 (p=0,0238). На 28-й день достоверного прироста специфических IgG антител (СГТ=1:8063, p=0,1515) по сравнению с 21-м днем не наблюдали. К 42-му дню от начала иммунизации СГТ составил 1:51200 (p=0,0022).

У всех животных, получивших рекомбинантный аденовирус rAd5-S-CoV2, на 14-й день после иммунизации детектировали формирование антиген-

специфических IgG антител (СГТ=1:16127). К 21-му дню наблюдали достоверное двукратное повышение титра антиген-специфических IgG до СГТ=1:32254 ($p=0,0325$). На 28-й день значительного прироста специфических IgG антител по сравнению с 21-м днем не наблюдали (СГТ=1:36204, $p>0,9999$). К 42-му дню от начала иммунизации титр вырос более чем в 4 раза (СГТ=1:162550, $p=0,0022$).

Таким образом, иммунизация животных рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 приводит к выработке высокого уровня антиген-специфических IgG антител.

Для более детального анализа гуморального иммунного ответа проводили определение изотипов или подклассов специфических IgG антител у иммунизированных животных через 42 дня после введения рекомбинантных аденовирусов (рисунок 19). Структуру изотипов IgG оценивали методом ИФА. У мышей IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 соответствуют IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 подклассам у человека.

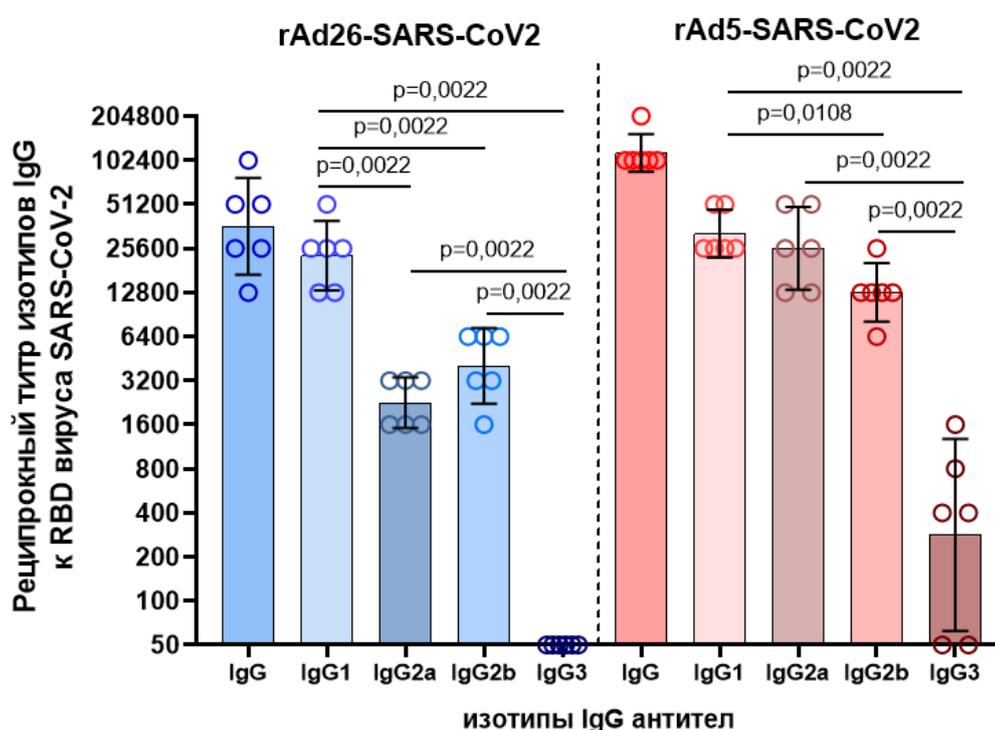


Рисунок 19 – Анализ изотипов IgG антител у мышей после иммунизации рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Установлено, что rAd26-S-CoV2 индуцирует формирование специфических IgG антител трех изотипов. Значения СГТ для IgG1, IgG2a и IgG2b составляли 1:22807, 1:2263 и 1:4032, соответственно. Статистически значимые различия в титрах наблюдали между изотипами иммуноглобулинов IgG1 и IgG2a, IgG1 и IgG2b, IgG1 и IgG3 ($p=0,0022$). Между изотипами иммуноглобулинов IgG2a и IgG2b статистически значимых различий не обнаружено ($p=0,1407$). Изотип IgG3 не был обнаружен. Общий титр специфических IgG антител составил 1:36204, наибольший вклад в который вносит изотип IgG1.

rAd5-S-CoV2 индуцирует формирование специфических IgG антител, которые представлены всеми четырьмя изотипами. Значения СГТ для IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 составляли 1:32254, 1:25600, 1:12800 и 1:282,8, соответственно. Статистически значимые различия в титрах наблюдали между изотипами иммуноглобулинов IgG1 и IgG2b, IgG1 и IgG3, IgG2a и IgG3, IgG2b и IgG3 ($p=0,0022$). Между изотипами иммуноглобулинов IgG1 и IgG2a ($p=0,6883$), IgG2a и IgG2b ($p=0,1126$) статистически значимых различий не обнаружено. СГТ для изотипа IgG3 был достоверно ниже остальных. Общий титр специфических IgG антител составил 1:114940, наибольший вклад в который вносят изотипы IgG1 и IgG2a.

Профили изотипов хорошо коррелируют с профилями цитокинов Th1 и Th2. У мышей IgG1 преимущественно связан с гуморальными иммунными реакциями (Th2), тогда как IgG2a связан с клеточными иммунными реакциями (Th1) [Verma et al., 2024]. Соотношение IgG1/IgG2a $<0,5$ указывает на повышенный уровень IgG2a и предполагает ответ Th1, соотношение IgG1/IgG2a от 0,5 до 2,0 указывает на смешанный ответ Th1 и Th2, а соотношение IgG1/IgG2a $>2,0$ указывает на повышенный уровень IgG1 и предполагает ответ Th2 [Chung et al., 2022]. После иммунизации rAd26-S-CoV2 соотношение IgG1/IgG2a составило 10,08, что указывает на смещение иммунного ответа в сторону гуморального. После иммунизации rAd5-S-CoV2 соотношение IgG1/IgG2a составило 1,26, что указывает на развитие как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что иммунизация животных рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 приводит к выработке высокого уровня антиген-специфических IgG антител, при этом в случае rAd26-S-CoV2 преобладают гуморальные иммунные реакции, а в случае rAd5-S-CoV2 наблюдается развитие сбалансированного иммунного ответа.

3.1.4.2 Исследование клеточного поствакцинального иммунного ответа у мышей

Исследование проводили на мышах линии C57BL/6 (по 6 животных в группе). Животным вводили рекомбинантные аденовирусы rAd26-S-CoV2 или rAd5-S-CoV2 в дозе 10^{10} в.ч. В качестве контроля использовали интактных невакцинированных животных. Через 21 день у животных отбирали селезенку. Клеточный иммунный ответ оценивали по проценту пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, выделенных из селезенки вакцинированных мышей и подвергнутых *in vitro* рестимуляции антигеном (рисунок 20).

По данным анализа медианных значений наблюдается статистически значимая разница в значениях пролиферирующих как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов у животных, иммунизированных рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 или rAd5-S-CoV2, по сравнению с невакцинированными. У животных, иммунизированных rAd26-S-CoV2, медиана значений процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов составила 1,15% (95% ДИ: 0,01-4,1) и 3,45% (95% ДИ: 0,01-5,2), соответственно. У животных, иммунизированных rAd5-S-CoV2, медиана значений процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов составила 1,95% (95% ДИ: 0,4-7) и 3,3% (95% ДИ: 0,01-8), соответственно. У одного из шести невакцинированных животных были обнаружены предсуществующие вирус-специфичные CD4⁺ Т-лимфоциты (медиана значений 0,055% (95% ДИ: 0,01-0,2)) и CD8⁺ Т-лимфоциты (медиана значений 0,01% (95% ДИ: 0,01-0,4)).

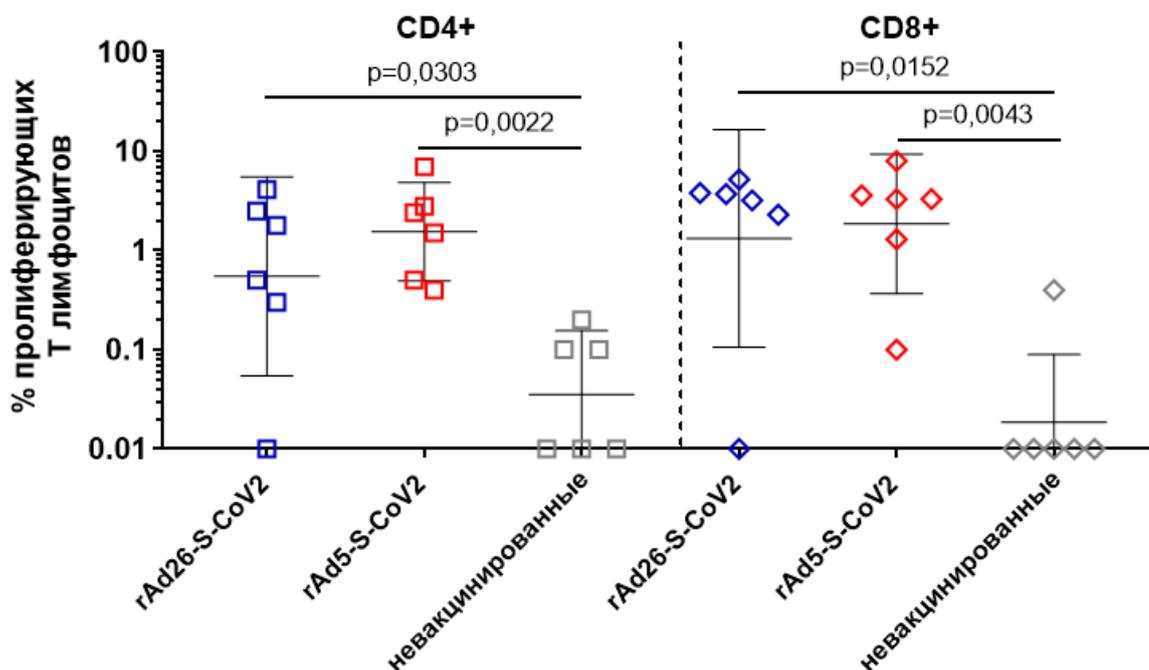


Рисунок 20 – Процент пролиферирующих CD4+ (квадраты) и CD8+ (ромбы) Т-лимфоцитов после антигенной рестимуляции *in vitro*. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что иммунизация животных рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 формирует выраженный лимфопролиферативный ответ как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов.

3.1.4.3 Исследование цитокинового профиля у вакцинированных мышей

Анализ цитокинового профиля широко применяется для оценки функциональной активности ключевых субпопуляций Т-хелперов: Th1, Th2 и Th17, что позволяет определить преобладающий тип иммунного ответа. Лимфоциты Th1-субпопуляции, отвечающие в основном за реакции клеточного иммунного ответа, продуцируют маркерный цитокин ИФН γ , а также ФНО α и ИЛ-2. Th2-лимфоциты, отвечающие за гуморальный иммунитет, продуцируют маркерный цитокин ИЛ-4, а также ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 [Потеряев и соавт.,

2021]. ИЛ-12 является ключевым цитокином иммунорегуляции, который активирует Th1.

Исследование проводили на мышах линии C57BL/6 (по 6 животных в группе). Животным вводили рекомбинантные аденовирусы rAd26-S-CoV2 или rAd5-S-CoV2 в дозе 10^{10} в.ч. В качестве контроля использовали невакцинированных животных. Через 21 день у животных отбирали селезенку, выделяли спленоциты и исследовали количество цитокинов в культуральной среде в ответ на стимуляцию клеток рекомбинантным S-белком вируса SARS-CoV-2. При помощи мультиплексного анализа определяли концентрацию 8 цитокинов (ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-12, ФНО α , ГМ-КСФ) (рисунок 21).

Анализ цитокинового профиля групп вакцинированных животных и группы контроля показал изменения концентрации маркерных цитокинов – ИФН γ и ИЛ-4. Кроме того, среди анализируемого спектра цитокинов наблюдали значимые отличия в концентрации ИЛ-2, ИЛ-10 и ИЛ-12, тогда как уровни ИЛ-5, ФНО α , ГМ-КСФ оказались ниже порога чувствительности использованного метода.

Среднее значение концентрации ИФН γ в группе rAd26-S-CoV2 составляет 16,63 пг/мл, в группе rAd5-S-CoV2 – 59,61 пг/мл. Статистически значимая разница в концентрации ИФН γ для обеих групп составила $p=0,022$ по сравнению с невакцинированными животными (0,000 пг/мл). Между группами вакцинированных животных, rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, также наблюдается статистически достоверная разница ($p=0,0411$).

Концентрация ИЛ-4 у контрольных животных была ниже порога чувствительности метода (0,11 пг/мл), но оказалась достоверно и значительно повышена в группах rAd26-S-CoV2 (5,38 пг/мл) и rAd5-S-CoV2 (6,497 пг/мл) ($p=0,022$). Между группами вакцинированных животных, rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, статистически достоверная разница не наблюдается ($p=0,4610$).

Средние значения концентрации ИЛ-2 в группах rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 находились на сопоставимом уровне (250,1 и 234,3 пг/мл, соответственно). Статистически достоверная разница в концентрации ИЛ-2 в обеих группах составила $p=0,022$ по сравнению с контрольными животными (5,317 пг/мл).

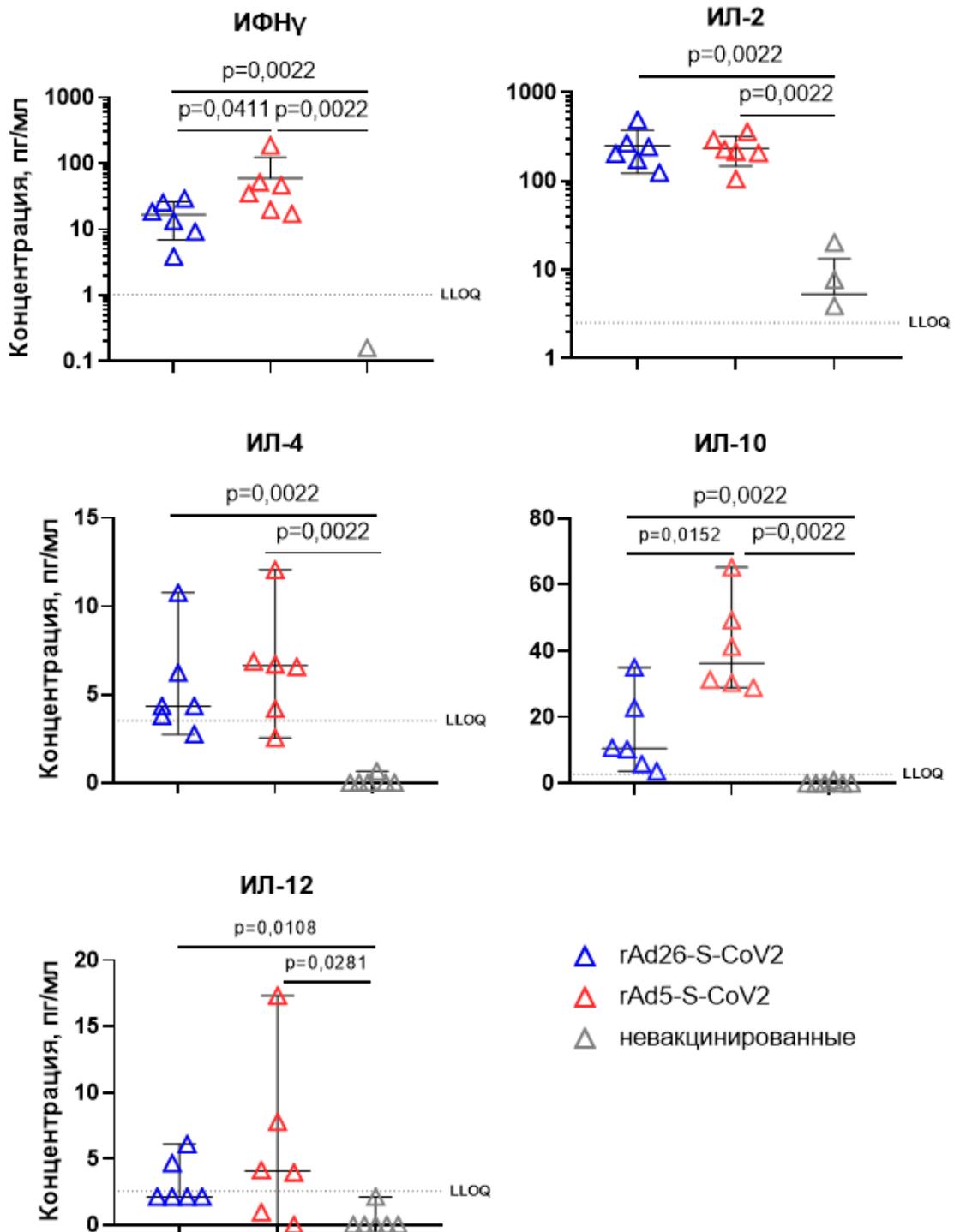


Рисунок 21 – Концентрации цитокинов в культуральной среде спленоцитов после рестимуляции их белком S вируса SARS-CoV-2. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Концентрация ИЛ-10 в группе rAd5-S-CoV2 (41,10 пг/мл) была статистически достоверно выше по сравнению с группой rAd26-S-CoV2 (14,76 пг/мл). Статистически достоверная разница в концентрации ИЛ-10 в обеих группах составила $p=0,022$ по сравнению с невакцинированными животными (0,1567 пг/мл).

Концентрация ИЛ-12 оказалась на границе чувствительности метода и определялась лишь у некоторых вакцинированных животных. В группе rAd26-S-CoV2 среднее значение концентрации составило 3,215 пг/мл, в группе rAd5-S-CoV2 – 5,702 пг/мл.

Таким образом, иммунизация животных рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 активирует оба типа иммунного ответа (клеточный и гуморальный).

3.1.4.4 Исследование гуморального поствакцинального иммунного ответа у мышей при различных схемах вакцинации

Для формирования напряженного и длительного гуморального иммунного ответа перспективным подходом является гетерологичная вакцинация в режиме прайм-буст, когда для первичной и вторичной иммунизации используют различные вирусные векторы.

Исследование влияния различных схем вакцинации на индукцию напряженного гуморального иммунного ответа проводили на мышах линии BALB/c (по 6 животных в группе). Животные были разделены на 6 групп: 1) вакцинация rAd5-S-CoV2, 2) вакцинация rAd26-S-CoV2, 3) гомологичная прайм-буст вакцинация rAd5-S-CoV2 + rAd5-S-CoV2, 4) гомологичная прайм-буст вакцинация rAd26-S-CoV2 + rAd26-S-CoV2, 5) гетерологичная прайм-буст вакцинация rAd5-S-CoV2 + rAd26-S-CoV2, 6) гетерологичная прайм-буст вакцинация rAd26-S-CoV2 + rAd5-S-CoV2. Животным вводили rAd26-S-CoV2 или rAd5-S-CoV2 в дозе 10^8 в.ч. Выбор этой иммунизирующей дозы обусловлен возможностью детектировать разницу в титрах между различными схемами

вакцинации. При прайм-буст вакцинации препарат вводили с интервалом в 21 день. Через 42 дня после начала иммунизации проводили забор крови из хвостовой вены и определяли титр специфических IgG антител к вирусу SARS-CoV-2 (рисунок 22).

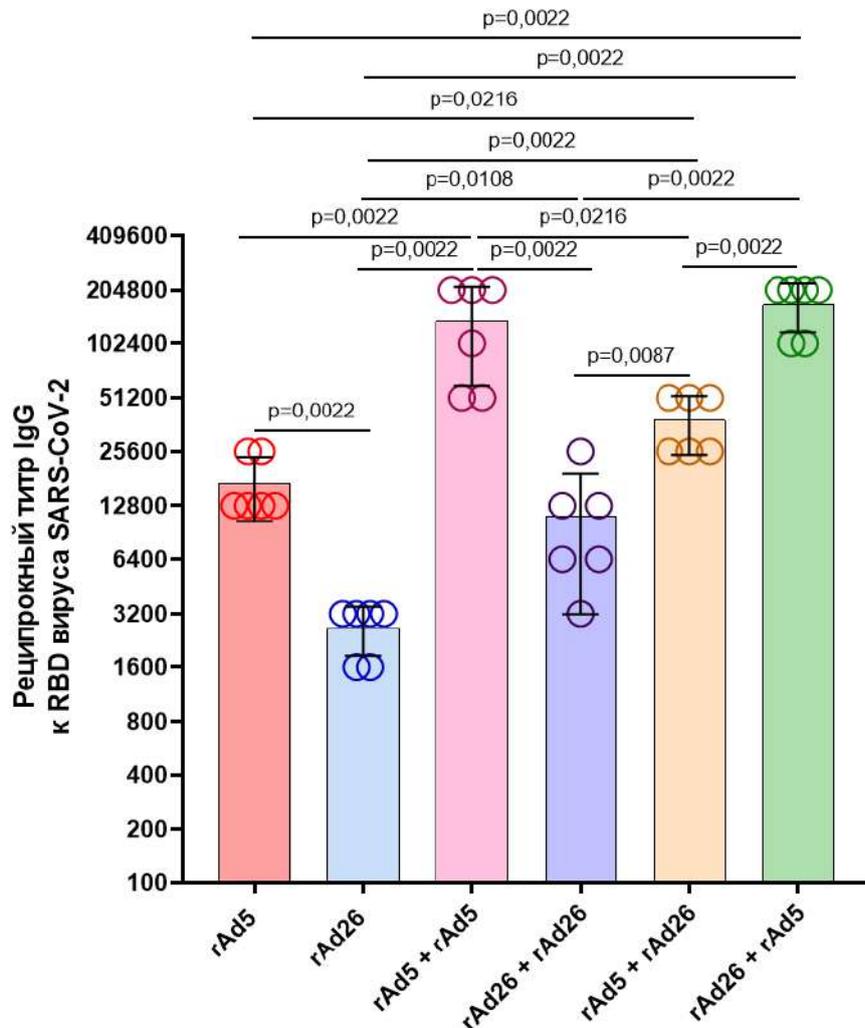


Рисунок 22 – Титры IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 через 42 дня после иммунизации мышей при использовании различных схем вакцинации. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Наиболее выраженный гуморальный иммунный ответ у иммунизированных животных формируется в случае прайм-буст иммунизации, как гетерологичной, так и гомологичной. СГТ после однократной иммунизации rAd5-S-CoV2 или

rAd26-S-CoV2 был достоверно ниже, чем при двукратной ($p=0,0022$ или $p=0,0108$, соответственно). При сравнении гетерологичных схем вакцинации друг с другом использование rAd26-S-CoV2 в качестве первого компонента, а rAd5-S-CoV2 в качестве второго, приводит к достоверному повышению титра специфических IgG антител более чем в 4 раза по сравнению с обратной схемой вакцинации ($p=0,0022$).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что наиболее эффективной стратегией вакцинации является гетерологичная прайм-буст иммунизация, предусматривающая применение рекомбинантного вектора Ад26 для первичной иммунизации с последующей бустирующей иммунизацией вектором на основе Ад5.

3.1.5 Исследование протективности рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2

Оценку протективной активности полученных рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, проводили на модели летальной инфекции сирийских хомячков с индуцированным иммунодефицитом. Критериями оценки тяжести течения инфекции у животных были поведение, внешний вид, вес и выживаемость. Критерием оценки эффективности вакцины было снижение летальности в группе вакцинированных животных по сравнению с контрольной группой.

Исследование проводили на 24 сирийских хомячках с индуцированным иммунодефицитом. Для этого животных разделили на 3 группы по 8 животных в каждой. Животным внутримышечно вводили рекомбинантные аденовирусы rAd26-S-CoV2 или rAd5-S-CoV2 в дозе 10^{10} в.ч. Введение иммуносупрессоров начинали на 28-е сутки после иммунизации и продолжали в течение 7 дней. Животных заражали вирусом SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 интраназально в дозе 10^5 ТЦД50 на 35-е сутки после иммунизации. Выживаемость, а также

снижение массы тела хомяков оценивали в течение 20 дней после заражения (рисунок 23).

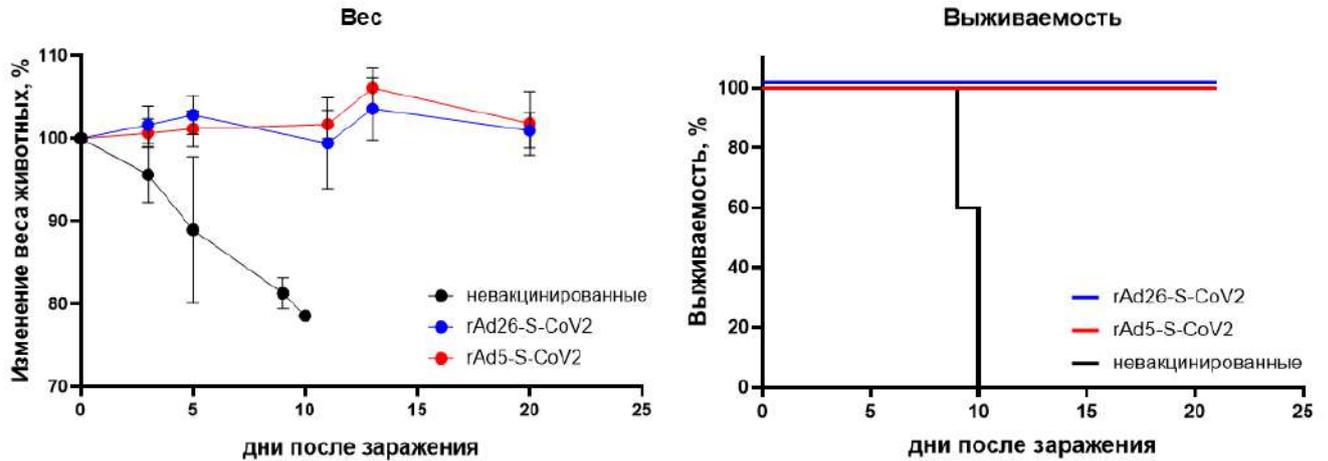


Рисунок 23 – Изменение массы тела и выживаемость вакцинированных и невакцинированных животных после заражения вирусом SARS-CoV-2.

Как видно из представленных данных, масса тела невакцинированных животных, начиная с 3-го дня после заражения вирусом SARS-CoV-2, стремительно снижалась. Кроме того, в этой группе животных детектировали ухудшение общего состояния: снижение активности, взъерошенность шерсти, отказ от еды, слабо выраженную или полное отсутствие реакции на внешние раздражители. В то же время в группе вакцинированных животных не наблюдали признаков ухудшения состояния и изменений в весе.

В контрольной группе (невакцинированные животные) наблюдали 100% гибель на 10-е сутки после заражения. Иммунизация животных рекомбинантными аденовирусами rAd26-S-CoV2 или rAd5-S-CoV2 позволяет защитить 100% животных с индуцированным иммунодефицитом от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

3.2 Доклинические исследования

Разработка вакцинных лекарственных препаратов проводится поэтапно и регламентируется законодательством. Выбор вида и объема ДКИ для оценки эффективности и безопасности кандидатной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» основан на актуальной научной информации, рекомендациях национальных руководств и нормативных документов РФ^{1,2,3}, рекомендациях ВОЗ, рекомендациях по исследованиям и регистрации биотехнологических препаратов ЕЭС⁴. В изучение эффективности входили определение иммуногенности и протективности. При проверке безопасности препарата исследованы острая токсичность, хроническая токсичность, репродуктивная токсичность, эмбриотоксичность, иммунотоксичность, гиперчувствительность немедленного и замедленного типов, местно-раздражающее действие, аллергические реакции, а также биораспределение компонентов вакцины у экспериментальных животных.

Экспериментальные серии кандидатной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» были произведены в Филиале Медгамал ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

3.2.1 Исследование иммуногенности

Комплексную оценку специфической иммунологической активности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» проводили на разных видах животных по нескольким параметрам. Исследование гуморального иммунного ответа проводили по определению уровня специфических IgG антител к вирусу SARS-CoV-2, а также изотипов этих антител методом ИФА. ВНА определяли в реакции микронеutralизации. Клеточный ответ оценивали по количеству пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии и по продукции ИФН γ методом ELISPOT.

¹ Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств», 2010.² Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты), 2012.

³ Руководство по экспертизе лекарственных средств, 2014.

⁴ Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, 2016

3.2.1.1 Исследование поствакцинального иммунного ответа у мышей

а) Исследование гуморального иммунного ответа у мышей

Исследование индукции гуморального иммунного ответа и определение эффективной иммунизирующей дозы проводили на мышах линии BALB/c (по 6 животных в группе). Для определения оптимальной дозы животные были разделены на 5 групп: 1) вакцина 10^7 в.ч., 2) вакцина 10^8 в.ч., 3) вакцина 10^9 в.ч., 4) вакцина 10^{10} в.ч., 5) контроль. Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2), через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в аналогичной дозе. В качестве контроля использовали интактных невакцинированных животных. Забор крови проводили из хвостовой вены через 42 дня после первой иммунизации, определение специфических IgG антител проводили методом ИФА (рисунок 24).

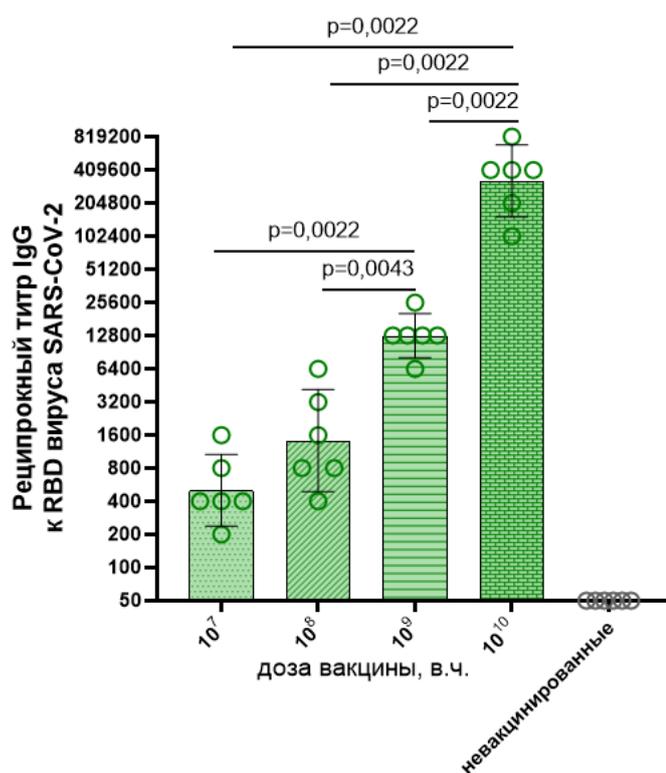


Рисунок 24 – Титры IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 после иммунизации мышей разными дозами вакцины «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

По результатам проведенного исследования наблюдали дозозависимое увеличение титра антиген-специфических IgG антител. У животных, получивших вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в дозе 10^7 и 10^8 в.ч., СГТ составил 1:504 и 1:1425 соответственно, без статистически значимой разницы ($p=0,0996$). В группе животных, получивших вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в дозе 10^9 в.ч., наблюдали достоверное повышение титра антиген-специфических IgG до СГТ=1:12800. Максимальное значение титра было в группе животных, получивших вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в дозе 10^{10} в.ч. (СГТ=1:325100). В контрольной группе антиген-специфические IgG антитела выявлены не были.

Таким образом, вакцинация «Гам-КОВИД-Вак» приводит к формированию гуморального иммунного ответа, минимально эффективная иммунизирующая доза у мышей составляет 10^7 в.ч.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у мышей после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по титрам IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, представлена на рисунке 25.

Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2) в дозе 10^{10} в.ч., через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в той же дозе. В качестве контроля использовали интактных невакцинированных животных. Забор крови проводили из хвостовой вены через 14, 21, 28 и 42 дня после первой иммунизации.

У всех животных, получивших первый компонент вакцины «Гам-КОВИД-Вак», на 14-й день после иммунизации наблюдали формирование антиген-специфических IgG антител (СГТ=1:1600). К 21-му дню после первой иммунизации (до введения второго компонента) наблюдали достоверное повышение титра антиген-специфических IgG до СГТ=1:7184 ($p=0,0476$). Через 7 дней после введения компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (28-й день после первой иммунизации) у всех иммунизированных животных наблюдали десятикратное повышение титра до значений СГТ=1:81275 ($p=0,0022$). Этот факт связан с проведением бустирующей иммунизации на 21-й день исследования. К

42-му дню от начала вакцинации СГТ составил 1:459760 ($p=0,0043$). В контрольной группе антиген-специфических IgG антител выявлено не было.

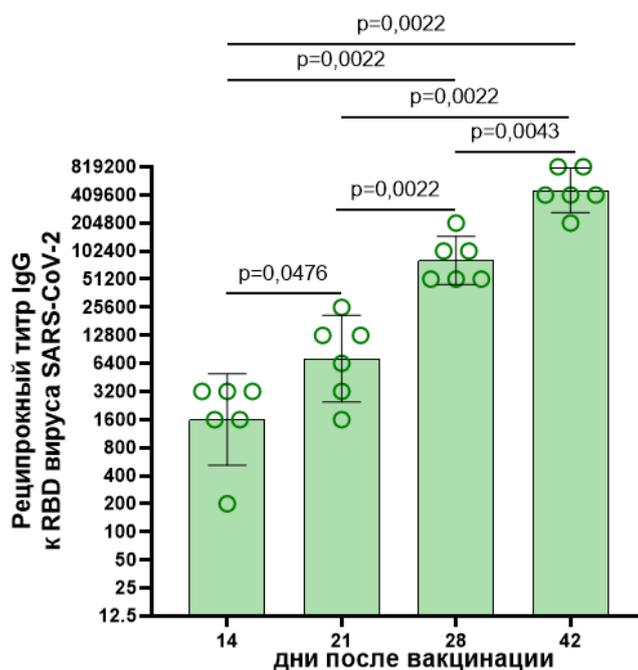


Рисунок 25 – Изменение титров IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, на 14, 21, 28 и 42 дни после иммунизации мышей вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Для более детального анализа гуморального иммунного ответа проводили определение изотипов специфических IgG антител в сыворотке крови вакцинированных животных на 42-й день после иммунизации (рисунок 26).

Установлено, что специфические IgG антитела представлены всеми четырьмя изотипами. Значения СГТ для IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 составляли 1:80635, 1:57018, 1:161270 и 1:7127 соответственно. Статистически значимых различий в титрах между изотипами иммуноглобулинов IgG1 и IgG2a ($p=0,7359$), IgG2a и IgG2b ($p=0,1710$) и IgG1 и IgG2b ($p=0,4459$) не обнаружено. СГТ для изотипа IgG3 был достоверно ниже остальных. После вакцинации соотношение IgG1/IgG2a составило 1,4, что указывает на развитие сбалансированного иммунного ответа.

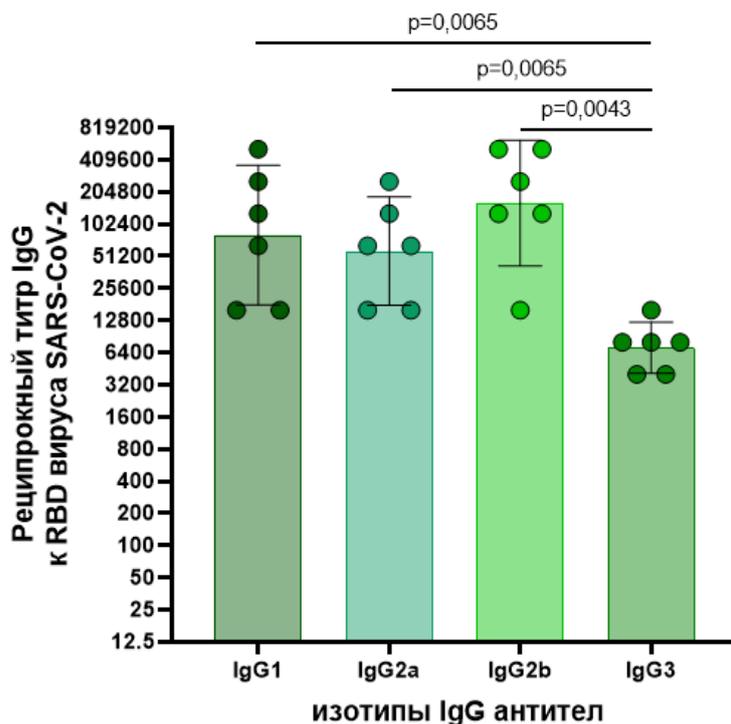


Рисунок 26 – Анализ изотипов IgG-антител у мышей после иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Развитие поствакцинального гуморального иммунного ответа у мышей после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст оценивали также по титру ВНА к вирусу SARS-CoV-2 (рисунок 27).

По результатам проведенного анализа было показано, что у вакцинированных животных на 42-й день детектируются специфические ВНА (СГТ=1:28,28). В контрольной группе (невакцинированные животные) ВНА выявлены не были.

При дальнейшем исследовании (на 180-й день) детектируются специфические нейтрализующие антитела в титре 1:960 [Tukhvatulin et al., 2022].

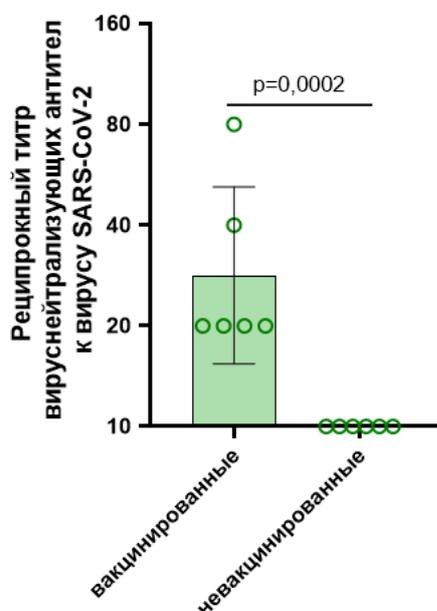


Рисунок 27 – Титры ВНА к вирусу SARS-CoV-2. Столбцы представляют собой СГТ для каждой группы с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что иммунизация мышей вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст приводит к выработке высокого уровня антиген-специфических IgG антител, включая вируснейтрализующие.

б) Исследование клеточного поствакцинального иммунного ответа у мышей

Исследование проводили на мышах линии C57BL/6 (по 7 животных в группе). Животным вводили последовательно первый и второй компоненты вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в дозе 10^{10} в.ч. с интервалом в 21 день. В качестве контроля использовали невакцинированных животных. Через две недели после введения компонента II у животных отбирали селезенку, выделяли спленоциты и проводили лимфопрлиферативный анализ.

На рисунке 28 представлены проценты пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов через 35 дней после иммунизации мышей вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст.

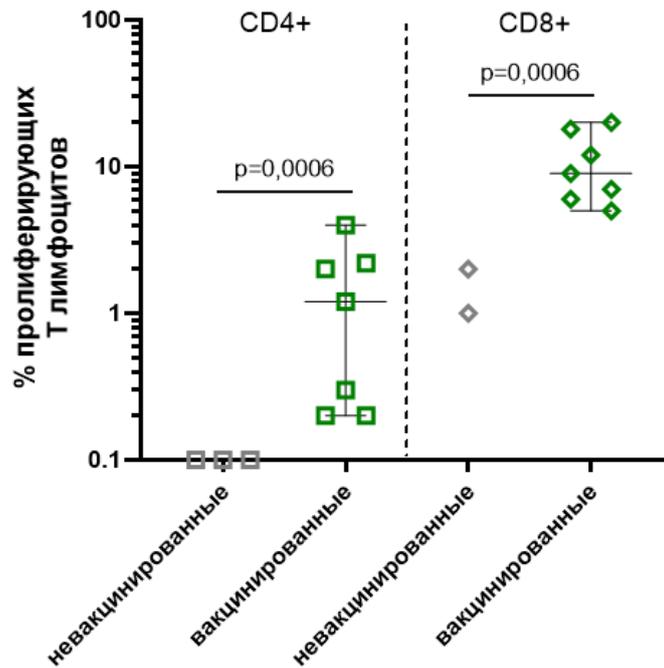


Рисунок 28 – Процент пролиферирующих CD4+ (квадраты) и CD8+ (ромбы) Т-лимфоцитов после антигенной рестимуляции *in vitro*. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Согласно медиане значений пролиферирующих CD4+ (1,2% (95% ДИ: 0,2-2,2)) и CD8+ (9% (95% ДИ: 6-18)) Т-лимфоцитов, наблюдается статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих Т-лимфоцитов у вакцинированных животных ($p=0,0006$). У невакцинированных животных не были обнаружены предсуществующие вирус-специфические CD4+ Т-лимфоциты (медиана значений 0,00% (95% ДИ: 0,00-0,1)). Предсуществующие вирус-специфические CD8+ Т-лимфоциты были обнаружены у двух животных из семи, с медианой 0,00% (95% ДИ: 0,00-1,00).

На основании полученных данных можно отметить, что иммунизация мышей вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст формирует выраженный лимфопролиферативный ответ как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов.

3.2.1.2 Исследование поствакцинального иммунного ответа у приматов

*а) Исследование гуморального поствакцинального иммунного ответа на модели игрунковых обезьян (*Callithrix jacchus*)*

Исследование проводили на игрунковых обезьянах (по 12 животных в группе). Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2) в дозе 10^9 в.ч., через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в той же дозе. До первой иммунизации проводили забор крови у мармозеток путем пункции бедренной вены, в последующем забор крови у животных проводили через 6, 13, 20, 26, 42, 57, 92, 104, 150 и 180 дней после введения компонента I. В качестве контроля использовали невакцинированных животных.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у мармозеток после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по титрам IgG антител, специфичных к RBD-домену белка S вируса SARS-CoV-2, представлена на рисунке 29.

У невакцинированных животных, а также у животных до вакцинации (0-й день), не были обнаружены предсуществующие антиген-специфические IgG антитела.

В ответ на вакцинацию игрунковых обезьян вакциной «Гам-КОВИД-Вак» детектировали достоверное повышение уровня RBD-специфических IgG антител. Увеличение титров специфических IgG антител было статистически значимым уже после введения первого компонента. На 13-й день СГТ=1:200 ($p=0,0046$). У всех животных на 20-й день после вакцинации наблюдали формирование антиген-специфических IgG антител в титрах от 1:200 до 1:6400 (СГТ=1:951,4, $p<0,0001$). Через 5 дней после введения второго компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (26-й день после первой иммунизации) у всех проиммунизированных животных наблюдали более чем тридцатикратное повышение титра (СГТ=1:36204, $p<0,0001$). Данный факт связан с проведением второй (бустирующей) иммунизации на 21-й день исследования.

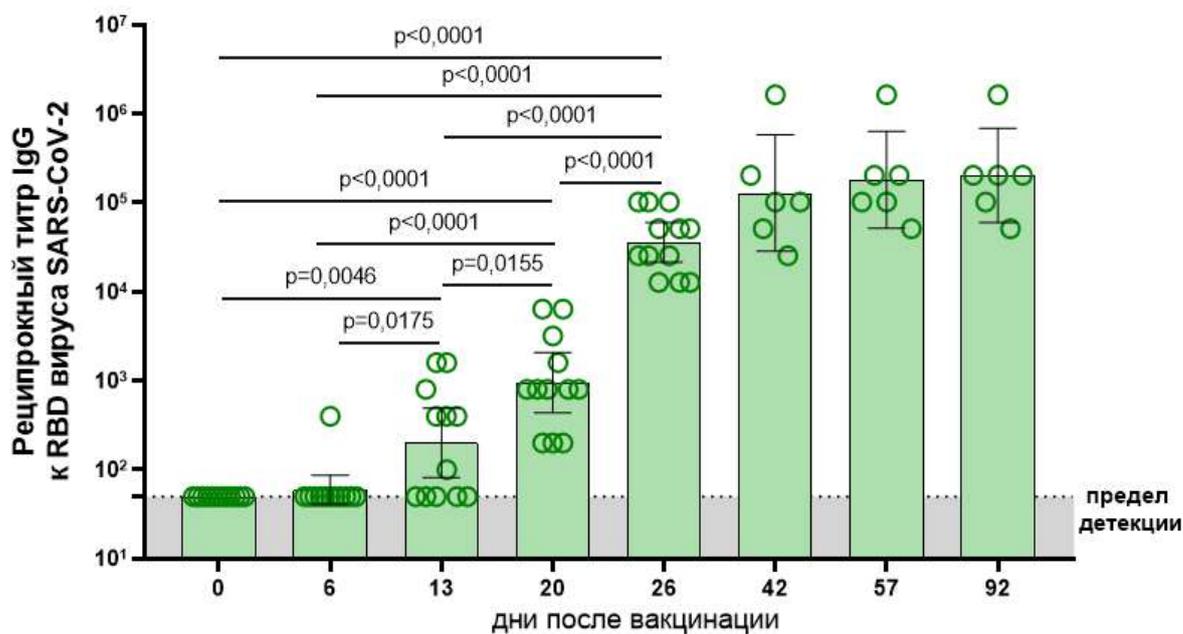


Рисунок 29 – Изменение титров IgG антител, специфичных к RBD-домену S-белка вируса SARS-CoV-2 после иммунизации игрунковых обезьян вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

В ходе дальнейшего наблюдения (с 42-го по 92-й день после первой иммунизации) за 6 животными, получившими вакцину «Гам-КОВИД-Вак», детектировано сохранение антиген-специфических IgG антител в высоких титрах. На 42-й, 57-й и 92-й день СГТ составил 1:129015, 1:182456 и 1:204800, соответственно. Статистически достоверной разницы в титре антител между этими временными точками не обнаружено ($p=0,5952$).

Дополнительное наблюдение за 2 животными в течение полугода показало сохранение поствакцинальных антиген-специфических IgG антител в высоких титрах. На 104-й, 150-й и 180-й день после введения первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» средний геометрический титр составил 1:72408.

Кроме того, формирование гуморального поствакцинального иммунного ответа на модели игрунковых обезьян оценивали дополнительно по уровню ВНА к вирусу SARS-CoV-2.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у мармозеток после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по уровню ВНА к вирусу SARS-CoV-2 представлена на рисунке 30.

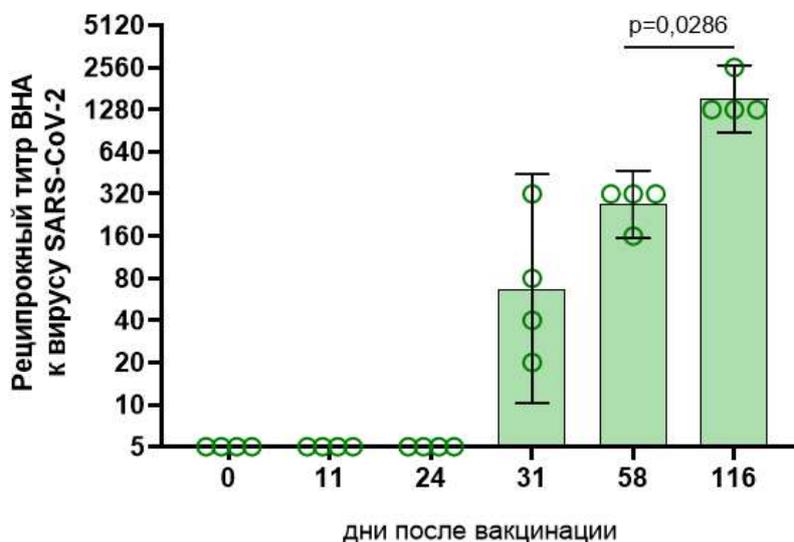


Рисунок 30 – Изменение титров ВНА к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации мармозет вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U -критерию Манна-Уитни.

У всех иммунизированных животных ($n=4$) на 31-й день после вакцинации наблюдали формирование вируснейтрализующих антител в титрах от 1:20 до 1:320 (СГТ=1:67,27). В контрольной группе ВНА выявлены не были.

В ходе дальнейшего наблюдения показано нарастание титра ВНА. На 37-й день после введения второго компонента детектированы ВНА в высоком титре (на 58-й день после вакцинации СГТ=1:269,1). Однако статистически достоверной разницы по сравнению с предыдущей точкой не обнаружено ($p=0,1429$). К 116-му дню происходит статистически достоверное увеличение титра ВНА до значения 1:1522 ($p=0,0286$).

Полученные данные свидетельствуют о развитии выраженного гуморального иммунного ответа на введение вакцины «Гам-КОВИД-Вак» и сохранении иммунного ответа в течение не менее 116 дней.

б) Исследование клеточного поствакцинального иммунного ответа на модели игрунковых обезьян (*Callithrix jacchus*)

Исследование проводили на игрунковых обезьянах (по 4 животных в группе). Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2) в дозе 10^{11} в.ч., через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в той же дозе. До вакцинации проводили забор крови у мармозеток путем пункции бедренной вены. В последующем забор крови у животных проводили через 11 и 31 день после первой иммунизации. В качестве контроля животным вводили формулирующий буфер.

Результаты определения процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов на 0-й день (до вакцинации) и 11-й и 31-й день после вакцинации мармозеток вакциной «Гам-КОВИД-Вак» представлены на рисунке 31.

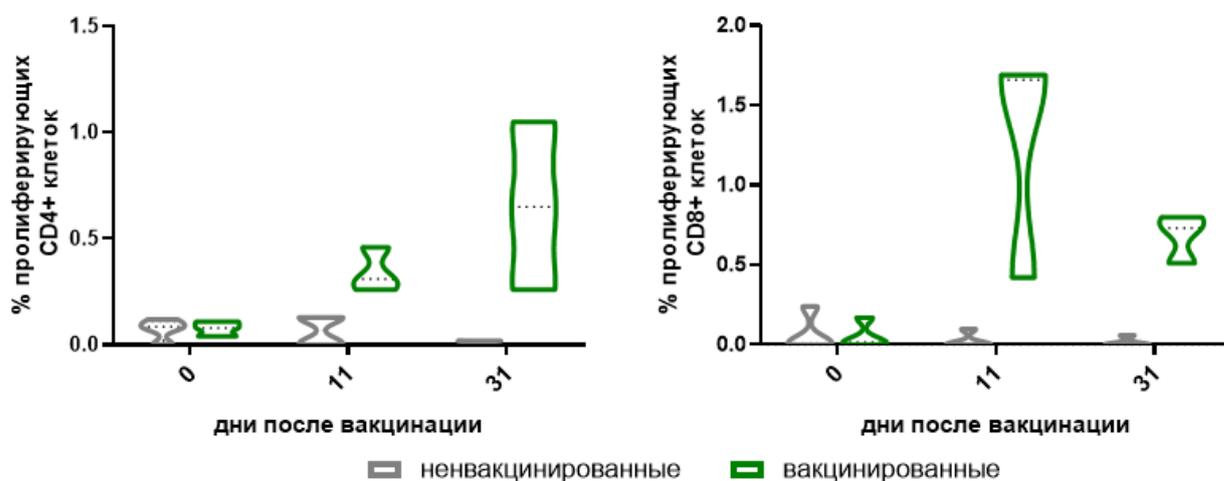


Рисунок 31 – Процент пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов после антигенной рестимуляции *in vitro*. Медиана значений представлена в виде пунктирной черты для каждой группы данных.

На 11-й день после вакцинации у вакцинированных животных отмечено увеличение процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов (0,34% и 1,257%, соответственно). Через 7 дней после введения компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» также у всех животных был зарегистрирован

пролиферативный ответ CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов (0,65% и 0,68%, соответственно). У контрольных животных пролиферация Т-лимфоцитов не детектировалась.

На основании полученных данных можно отметить, что иммунизация мармозеток вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст формирует выраженный лимфопролиферативный ответ как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

в) Исследование гуморального поствакцинального иммунного ответа на модели макак-резус (Macaca mulatta)

Исследование проводили на макаках-резус (11 животных в опытной группе и 6 животных в контрольной). Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2) в дозе 10¹¹ в.ч., через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в той же дозе. До вакцинации проводили забор крови у обезьян путем пункции бедренной вены для получения фоновой сыворотки. В последующем забор крови у животных проводили через 7, 14, 28, 42, 56, 90, 180 и 210 дней после первой иммунизации. В качестве контроля животным вводили формулирующий буфер.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у макак-резус после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по титрам IgG антител, специфичных к RBD-домену S-белка вируса SARS-CoV-2, представлена на рисунке 32.

У всех животных, получивших компонент I вакцины «Гам-КОВИД-Вак», на 14-й день после иммунизации наблюдали формирование антиген-специфических IgG антител в титрах от 1:400 до 1:6400 (СГТ=1704, $p < 0,0001$). Через 7 дней после введения компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (28-й день после первой иммунизации) у всех иммунизированных животных детектировали повышение СГТ до значений 1:12800 ($p = 0,0001$). Этот факт связан с проведением бустирующей иммунизации на 21-й день исследования. В контрольной группе антиген-специфических IgG антител выявлено не было.

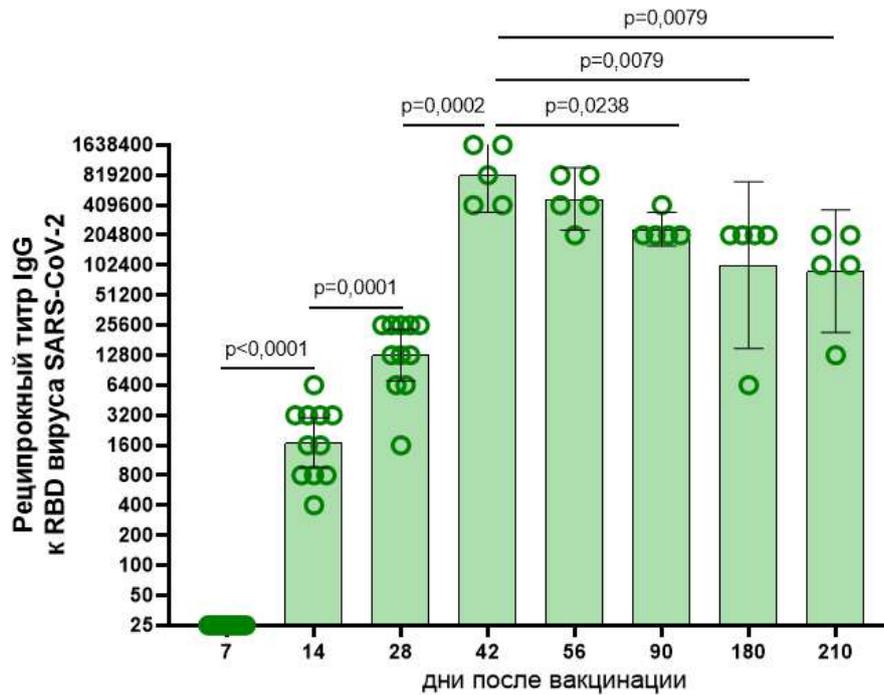


Рисунок 32 – Изменение титров IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 после иммунизации макак-резус вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

В ходе дальнейшего наблюдения за 5 животными, получившими вакцину «Гам-КОВИД-Вак», в течение 210 дней после первой иммунизации, детектировано сохранение антиген-специфических IgG антител в высоких титрах. На 42-й день от начала вакцинации показано максимальное значение титра антител (СГТ=1:819200). К 56-му дню СГТ составил 1:470506. Далее происходит снижение титра, и на 90-й, 180-й и 210-й дни СГТ составляет 1:235253, 1:102400 и 1:89144, соответственно. Разница в значениях титра антител статистически недостоверна.

Кроме того, формирование гуморального иммунного ответа на модели макак-резус оценивали по уровню ВНА к вирусу SARS-CoV-2.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у макак-резус после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по уровню ВНА к вирусу SARS-CoV-2 представлена на рисунке 33.

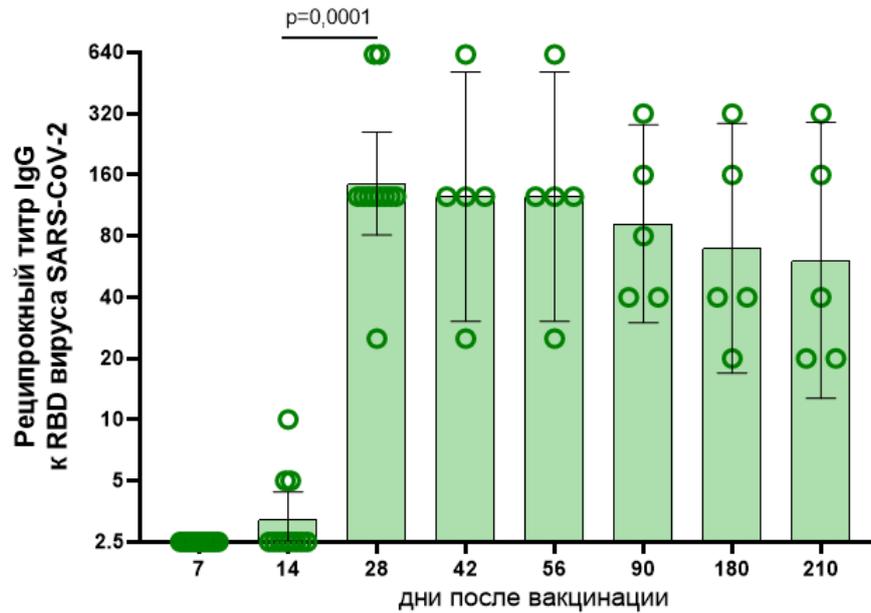


Рисунок 33 – Изменение титров ВНА к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации макак-резус вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

У всех животных, получивших оба компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак», на 28-й день после иммунизации наблюдали формирование ВНА в титрах от 1:25 до 1:625 (СГТ=1:144,7, $p=0,0001$). В контрольной группе ВНА выявлено не было. В ходе дальнейшего наблюдения за 5 животными, получившими вакцину «Гам-КОВИД-Вак», показано сохранение ВНА. В течение 28 дней после введения второго компонента, детектированы ВНА примерно в том же титре (на 56-й день после иммунизации СГТ составил 1:125). К 90-му дню происходит незначительное снижение титра ВНА до значения 1:92, к 180-му дню – до 1:69,64, а к 210-му – до 1:60. Однако статистически достоверной разницы по сравнению с 28-м днем после иммунизации не обнаружено.

Полученные данные свидетельствуют о развитии выраженного гуморального иммунного ответа на введение вакцины «Гам-КОВИД-Вак» для профилактики COVID-19. Результаты свидетельствуют о сохранении иммунного ответа у животных в течение не менее 210 дней.

г) Исследование клеточного поствакцинального иммунного ответа на модели макак-резус (*Macaca mulatta*)

Исследование проводили на макаках-резус (по 4 животных в группе). Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2) в дозе 10^{11} в.ч., через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в той же дозе. До вакцинации проводили забор крови у обезьян путем пункции бедренной вены. В последующем забор крови у животных проводили через 7, 14 и 28 дней после первой иммунизации. В качестве контроля животным вводили формулирующий буфер.

Результаты определения процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов на 0-й день (до иммунизации) и на 7-й, 14-й и 28-й дни после иммунизации обезьян вакциной «Гам-КОВИД-Вак» представлены на рисунке 34.

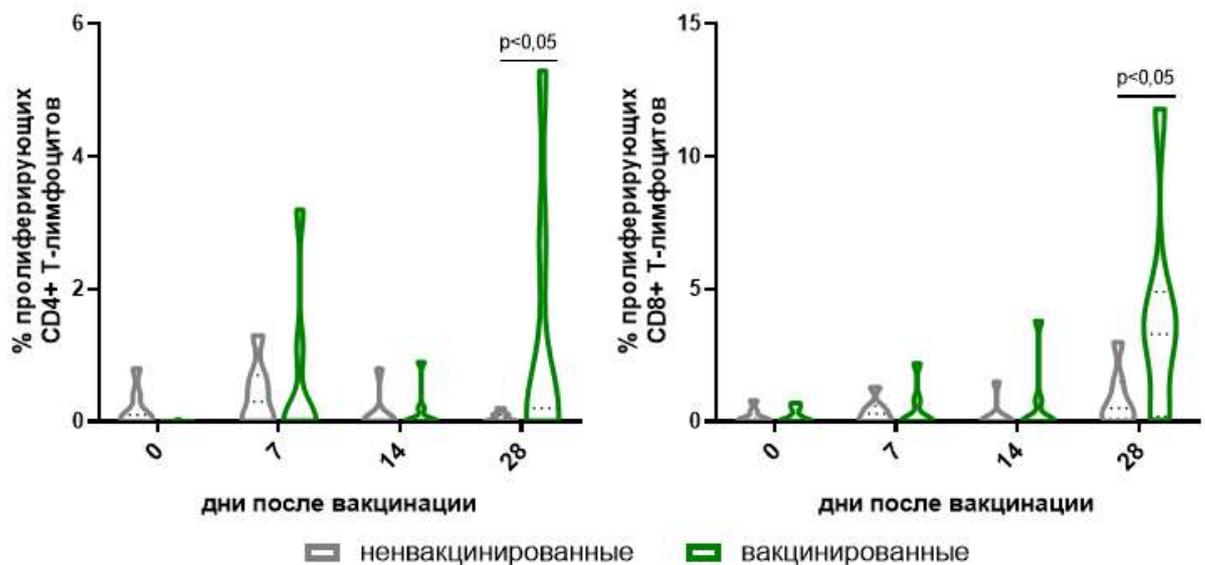


Рисунок 34 – Процент пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов после антигенной рестимуляции *in vitro*. Медиана значений представлена в виде пунктирной черты для каждой группы данных. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Анализ полученных данных позволяет утверждать, что развитие выраженного клеточного иммунного ответа, если судить по медиане значений процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, наблюдается на 28-й

день после иммунизации. После проведения второй (бустерной) иммунизации на 21-й день исследования антиген-специфические CD4⁺ (1,2% против 0,1% в контрольной группе, $p < 0,05$) и CD8⁺ (3,8% против 0,8% в контрольной группе, $p < 0,05$) Т-лимфоциты получают дополнительный стимул к пролиферации, увеличивая долю своего присутствия в организме вакцинированного животного.

На основании полученных данных можно отметить, что иммунизация макак-резус вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст формирует выраженный лимфопролиферативный ответ как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

3.2.2 Исследование протективности

Оценку протективной активности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» проводили на двух моделях летальной инфекции: на модели сирийских хомячков с индуцированным иммунодефицитом и на модели трансгенных мышей, несущих ген рецептора ACE2 человека (Tg(K18-ACE2)2Pr1mn). Критериями оценки тяжести течения инфекции у животных были поведение, внешний вид, вес и выживаемость. Критерием оценки эффективности вакцины было снижение летальности в группе вакцинированных животных по сравнению с контрольной группой.

3.2.2.1 Исследование протективности вакцины на летальной модели сирийских хомячков с иммунодефицитом

Исследование проводили на 16 сирийских хомячках с индуцированным иммунодефицитом. Для этого животных случайным образом разделили на 2 группы по 8 животных в каждой. Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2) в дозе 10^8 в.ч., через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в той же дозе. Через неделю после введения второго компонента проводили иммуносупрессию. Через 2 недели после бустерирующей иммунизации животных

заражали вирусом SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1 интраназально в дозе 10^6 ТЦД50.

Состояние животных после заражения оценивали ежедневно в течение 40 дней (рисунок 35). Начиная с третьего дня после заражения в группе контрольных (невакцинированных) животных детектировали ухудшение общего состояния, которое со временем усиливалось. Масса тела невакцинированных животных стремительно снижалась после заражения: на второй день – на 7%, на четвертый – на 12,5%, а на седьмой день – более чем на 25%. В этой группе все животные погибли.

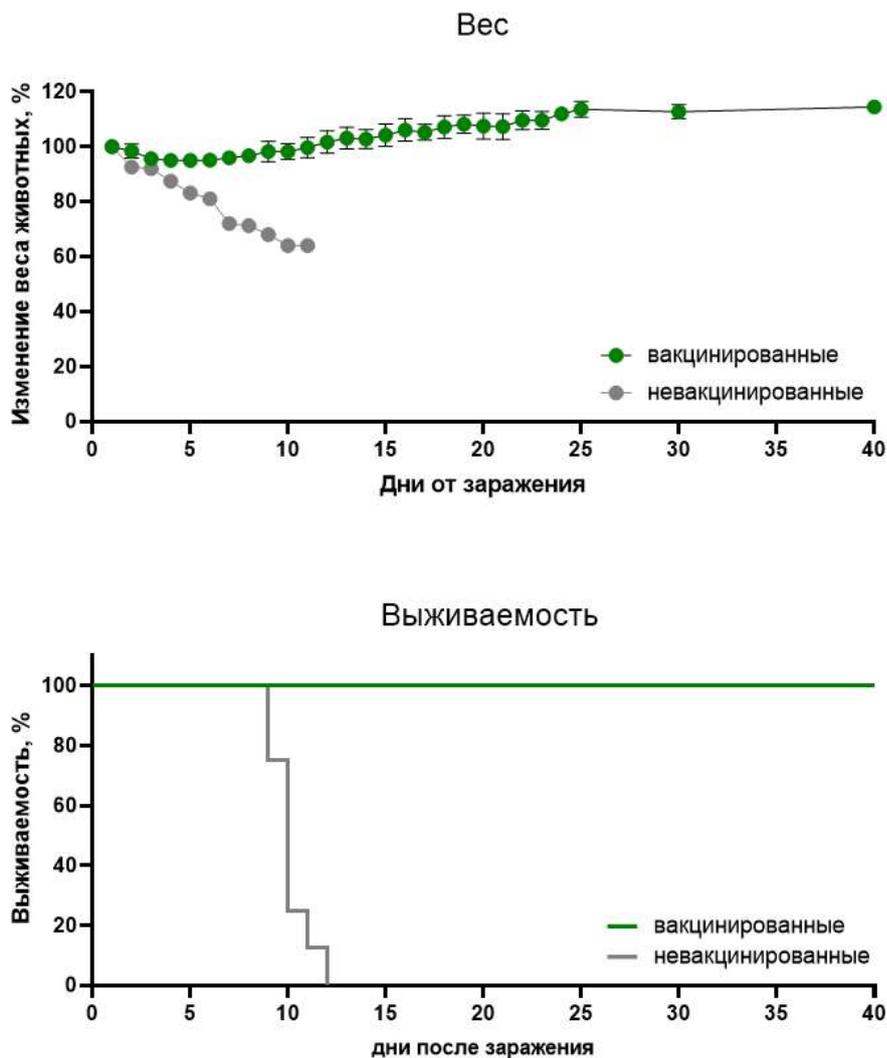


Рисунок 35 – Изменение массы тела и выживаемость вакцинированных и невакцинированных животных после заражения вирусом SARS-CoV-2.

В группе вакцинированных животных после заражения не наблюдали признаков ухудшения состояния или смертности. У животных этой группы в течение первых четырех дней после заражения наблюдали незначительное снижение веса (не более 5%). Начиная с 8-го дня после заражения, вакцинированные животные начинали активно набирать вес, что свидетельствует об эффективности вакцинации.

Таким образом, по результатам проведенных исследований на модели сирийских хомячков с индуцированным иммунодефицитом показано, что вакцинация животных позволяет сформировать протективный иммунный ответ, который защищает 100% животных от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1.

3.2.2.2 Исследование протективности вакцины на летальной модели трансгенных мышей

Исследование проводили на 32 трансгенных мышах Tg(K18-ACE2)2Pr1mn. Для этого животных разделили на 2 группы по 16 животных в каждой. Животным внутримышечно вводили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I (rAd26-S-CoV2) в дозе 10^8 в.ч., через 21 день вводили компонент II (rAd5-S-CoV2) в той же дозе. Через 7 дней после введения второго компонента животных заражали вирусом SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1 интраназально в дозе 3×10^4 ТЦД₅₀ (100ЛД₅₀).

Оценку состояния животных после заражения проводили ежедневно в течение 30 дней (рисунок 36). Начиная с 3-го дня после заражения в группе контрольных (невакцинированных) животных детектировали ухудшение общего состояния, которое со временем усиливалось. Начиная с 7-го дня после заражения, наблюдали гибель невакцинированных животных. К 13-му дню после заражения все животные в этой группе погибли (n=10). В группе вакцинированных животных после заражения не наблюдали признаков ухудшения состояния, все животные (n=10) выжили, что свидетельствует об эффективности вакцинации.

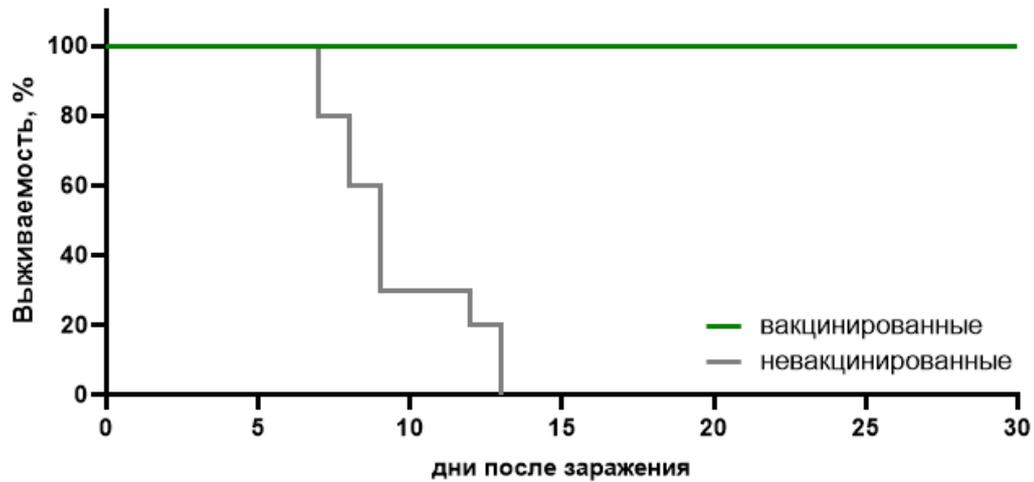


Рисунок 36 – Выживаемость вакцинированных и невакцинированных животных после заражения вирусом SARS-CoV-2.

На 4-е и 7-е сутки 3 животных из каждой группы подвергли эвтаназии и отобрали легкие для анализа вирусной нагрузки методом ПЦР (рисунок 37).

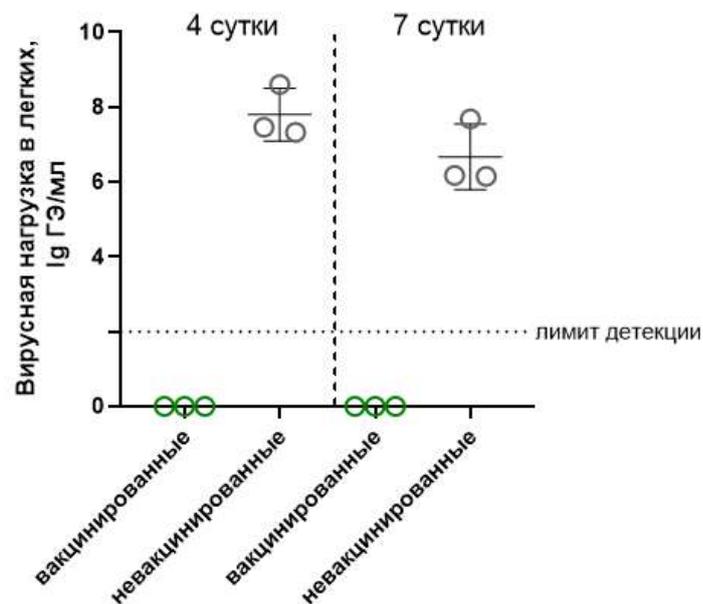


Рисунок 37 – Вирусная нагрузка в легких вакцинированных и невакцинированных животных после заражения вирусом SARS-CoV-2.

При анализе вирусной нагрузки методом ПЦР в реальном времени было показано, что в легких невакцинированных животных на 4-е и 7-е сутки после заражения детектируется 7,799 и 6,67 lg ГЭ/мл вируса SARS-CoV-2,

соответственно. В легких вакцинированных зараженных животных РНК вируса SARS-CoV-2 не детектируется.

Таким образом, по результатам проведенного исследования было показано, что вакцинация животных «Гам-КОВИД-Вак» позволяет защитить 100% трансгенных мышей от летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1.

3.2.3 Токсикологические исследования

В рамках доклинических исследований безопасности было проведено изучение токсичности как при однократном, так и при повторном введении каждого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по отдельности, а также при введении вакцины в режиме прайм-буст (последовательное введение компонента I и компонента II).

Исследование по выявлению репродуктивной токсичности, включающее изучение влияния на репродуктивную (генеративную) функцию самок и самцов, изучение онтогенетической токсичности, то есть эмбрио- и фетотоксического действия препарата, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития, проводили отдельно для каждого компонента вакцины.

Иммунотоксичность (клеточный иммунный ответ в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов, определение массы и клеточности органов иммунной системы и гуморальный ответ в реакции гемагглютинации) изучали отдельно для каждого компонента.

Исследование алергизирующих свойств, включающее изучение острых системных (анафилактический шок) и местных (реактивное воспаление аллергического генеза) эффектов, проводили отдельно для каждого компонента.

Исследование биораспределения вакцины проводили отдельно для каждого компонента.

Исследования генотоксичности, стандартно проводимые в отношении лекарственных препаратов, действующие вещества которых получены путем химического синтеза, не применимы в отношении биотехнологических препаратов, поэтому проведение таких исследований не требуется.

3.2.3.1 Исследование острой токсичности

Исследование острой токсичности при введении каждого компонента вакцины отдельно проводили на половозрелых аутбредных мышах обоего пола. Компонент I или Компонент II вводили внутримышечно или внутривенно в возрастающих дозах: 10^8 в.ч., 10^9 в.ч., 10^{10} в.ч. и 10^{11} в.ч. Минимальной была выбрана доза 10^8 в.ч. на животное, как наиболее близкая к эффективной и с высокой вероятностью не обладающая выраженным токсическим действием. Для перерасчета доз не использовали коэффициент межвидового пересчета, дозы получены путем прямого пересчета на массу тела, согласно рекомендациям ВОЗ для вакцинных препаратов. Данный подход реализован для аналогичных препаратов и показал свою пригодность как в доклинических, так и в клинических исследованиях векторных вакцин. Контрольным животным вводили плацебо (формулирующий буфер).

На протяжении эксперимента гибели животных не было зарегистрировано ни в одной опытной группе. Интегральные показатели общего состояния экспериментальных животных в опытных группах не отличались от контрольных. Из-за отсутствия гибели животных расчет летальных доз (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄) невозможен. Влияние вакцины на изменение массы тела экспериментальных животных не выявлено.

На 14-е сутки все группы животных, участвовавших в исследовании, подвергались некропсии. При макроскопическом исследовании отчетливого влияния компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на состояние внутренних органов мышей не установлено, различий между контрольными и опытными группами не обнаружено. В ходе анализа не

обнаружено статистически достоверных различий в массе органов между опытными и контрольной группами. Обследование места введения не выявило каких-либо признаков, указывающих на наличие местно-раздражающего действия.

Таким образом, отдельное введение компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» как внутримышечно, так и внутривенно не выявило каких-либо отклонений или изменений во внешнем виде животных, их поведении и влияния на состояние внутренних органов относительно контрольной группы.

Исследование острой токсичности при введении вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст (последовательно компоненты I и II с сокращенным интервалом введения (через 7 дней) относительно планируемого клинического применения) проводили на кроликах обоего пола. Вакцину вводили внутримышечно в возрастающих дозах: 10^{10} в.ч. и 10^{11} в.ч. В первый день исследования вводили компонент I, на седьмой день – компонент II. Контрольным животным вводили формулирующий буфер.

На протяжении эксперимента гибели животных зарегистрировано не было ни в одной опытной группе. Интегральные показатели общего состояния экспериментальных животных в опытных группах не отличались от контрольных. Из-за отсутствия гибели животных расчет летальных доз (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄) невозможен. Влияние вакцины на изменение массы тела экспериментальных животных не выявлено.

Кроме того, на 21-е сутки после внутримышечного введения вакцины исследовали показатели мочи, а также биохимические и гематологические показатели крови. Статистический анализ показателей мочи не выявил достоверных различий между контрольной и опытными группами. В ходе анализа биохимических показателей статистически достоверных различий между опытной группой и контролем не обнаружено. Все значения были в пределах физиологической нормы. В ходе анализа гематологических показателей при максимальной дозе (10^{11} в.ч.) у самцов кроликов детектировано снижение количества лейкоцитов, а также снижение абсолютного количества лимфоцитов.

Однако в дозе 10^{10} в.ч. у самцов наблюдалось увеличение относительного количества лимфоцитов.

Статистический анализ показателей гемостаза, полученных после введения вакцины, не выявил достоверных различий между контрольной и опытными группами.

Некропсии подвергались все группы животных, участвовавших в исследовании, на 21-е сутки. При макроскопическом исследовании отчетливого влияния вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на состояние внутренних органов кроликов не установлено, различий между контрольной и опытными группами не обнаружено. Обследование места введения препарата не выявило каких-либо признаков, указывающих на наличие местно-раздражающего действия.

В результате гистологического исследования внутренних органов кроликов из группы, получавших вакцину в дозе 10^{11} в.ч., не выявлено патологических изменений. При сопоставлении данных гистологического исследования группы кроликов, получивших вакцину, и контроля отличий также не выявлено.

Исследование острой токсичности при введении вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме планируемого клинического применения (последовательно компоненты I и II с интервалом введения через 21 день) проводили на приматах (макаках-резус и игрунковых обезьянах). Вакцину вводили внутримышечно в терапевтической дозе для человека (10^{11} в.ч.). В первый день исследования вводили компонент I, на 21-й день – компонент II. Контрольным животным вводили плацебо (формулирующий буфер).

В результате изучения токсичности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на макаках-резус с анализом клинической картины интоксикации показано отсутствие влияния вакцины на общее состояние животных, а также не выявлено статистически достоверных отличий в гематологических и биохимических показателях крови. На протяжении эксперимента гибели животных зарегистрировано не было. Во всех группах животные выглядели здоровыми, охотно поедали корм, реагировали на внешние раздражители, проявляли исследовательский интерес. Поведение опытных животных не отличалось от

контрольных. При взвешивании установлено, что все животные в опытной и контрольной группах в основном имели стабильный вес, отличий в динамике массы тела у животных опытных и контрольных групп не обнаружено. В ходе анализа гематологических и биохимических показателей все значения были в пределах физиологической нормы. Исключение составлял показатель щелочной фосфатазы, который был значительно снижен у всех животных до начала введения препарата и нормализовался в течение эксперимента.

В результате оценки безопасности на модели игрунковых обезьян установлено, что на протяжении 27 дней после первой иммунизации у животных, получивших вакцину «Гам-КОВИД-Вак», в сравнении с контрольной группой наблюдались: повышенная двигательная активность, а также изменение потребления воды и пищи в течение недели после введения вакцины; повышение температуры тела в среднем на 0,9 °С на 16-й день после первой иммунизации; повышение уровня сегментоядерных нейтрофилов на 26-й день после первой иммунизации (6-й день после второй иммунизации), а также повышение уровня лимфоцитов через 13 дней после первой иммунизации и через 6 дней после второй иммунизации, что свидетельствует о формировании поствакцинального иммунного ответа. Других достоверных различий в общем состоянии здоровья, ректальной температуры, а также биохимических и гематологических показателях крови в группе животных, получивших вакцину «Гам-КОВИД-Вак», в сравнении с контрольной группой выявлено не было.

Эксперименты по изучению острой токсичности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на различных лабораторных моделях, включая мышей, кроликов и приматов, выявили отсутствие токсического воздействия препарата на организм животных как при внутримышечном, так и при внутривенном способах введения. В ходе исследований на мышах и кроликах не удалось определить летальную дозу вакцины «Гам-КОВИД-Вак», так как ни одно из экспериментальных животных не погибло. Вводимые максимальные дозы обоих компонентов вакцины (внутримышечно или внутривенно) превышали эффективную дозу для мышей в 2000 раз и были ограничены допустимым объемом введения для данного вида

животных. Признаков интоксикации при применении исследуемой вакцины не наблюдали. Повседневный мониторинг состояния здоровья животных показал, что введение вакцины «Гам-КОВИД-Вак» не оказывает влияния на общее состояние экспериментальных животных. По результатам патоморфологических исследований, как внутримышечное, так и внутривенное введение вакцины в максимальных дозах не приводит к развитию дистрофических, деструктивных и очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов.

Таким образом, данные исследования свидетельствуют об отсутствии острой токсичности комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

3.2.3.2 Исследование хронической токсичности

Изучение токсичности при повторных дозах проводили на 100 аутбредных крысах и 40 кроликах породы Шиншилла обоих полов отдельно для каждого компонента вакцины. Крысы получали компонент I или компонент II в двух дозах: 10^9 в.ч. и 10^{11} в.ч. на животное. На каждую дозу использовали 20 животных, 10 самцов и 10 самок. Дозы в объеме 500 мкл вводили внутримышечно 1 раз в 10 дней на протяжении 30 дней (4 введения). Кроликам также внутримышечно вводили компонент I или компонент II один раз в 10 дней на протяжении 30 дней (4 введения) в двух дозах: 10^{10} в.ч. и 10^{11} в.ч. на животное. На каждую дозу использовали 8 животных, 4 самца и 4 самки. Контрольным животным вводили формулирующий буфер. Физическое состояние и поведение животных контролировали на протяжении всего эксперимента, фиксировали симптомы интоксикации и отслеживали вес. На 31-е и 44-е сутки после введения компонентов вакцины у животных проводили исследования показателей крови (клинический и биохимический анализ), коагулограмму, анализ мочи, исследование поведенческих реакций.

На протяжении всего эксперимента ни одно животное не погибло. Интегральные показатели общего состояния экспериментальных животных в

опытных группах не отличались от контрольных. При взвешивании установлено, что все животные во всех группах стабильно набирали вес, отставания в наборе массы зафиксировано не было. Изменение массы тела крыс и кроликов на протяжении эксперимента имело положительную динамику и значимо не отличалось между опытными и контрольными группами.

При исследовании компонентов вакцины на крысах и кроликах при внутримышечном введении гематологические показатели, биохимия, коагулограмма и клинические показатели мочи оставались в пределах физиологической нормы.

На 30-е и 43-и сутки от начала эксперимента для крыс проводили поведенческие тесты: «Открытое поле» и «Сужающаяся дорожка». Анализ полученных данных показал, что повторное введение исследуемых компонентов вакцины не снижает двигательную и познавательную активности по сравнению с животными контрольной группы. Стрессовая составляющая поведения не отличалась от контрольной группы. Различия в выраженности сенсомоторного дефицита между опытной и контрольной группами отсутствовали.

Для оценки влияния исследуемых компонентов вакцины на электрическую активность сердца, функциональные и структурные характеристики миокарда ЭКГ проводили на 30-е сутки после первого введения. Установлено отсутствие влияния каждого из компонентов вакцины на параметры ЭКГ у крыс.

Патоморфологическое исследование, проведенное на 31-е и 44-е сутки после введения вакцины, не выявило отклонений в структуре внутренних органов. Гистологическое исследование не показало развития дистрофических, деструктивных и очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов после пролонгированного введения вакцины. Наличие у компонентов вакцины местно-раздражающего действия в рамках проведенного эксперимента не установлено.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования на крысах и кроликах свидетельствуют об отсутствии токсичности при повторном введении вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

3.2.3.3 Исследование репродуктивной токсичности

Исследование проводили на половозрелых крысах линии SD обоих полов и их потомстве отдельно для каждого компонента. Для оценки влияния компонентов вакцины на репродуктивную функцию самок использовали 45 животных (30 самок и 15 самцов) и их потомство, полученное в эксперименте. Для оценки влияния компонентов вакцины на репродуктивную функцию самцов крыс использовали 90 животных (60 самок и 30 самцов) и их потомство, полученное в эксперименте. Самкам компонент I или компонент II вводили внутримышечно в двух дозах 10^9 в.ч. и 10^{10} в.ч. один раз в неделю в течение 15 дней (3 эстральных цикла) до спаривания. После окончания периода введения самок подсаживали к интактным самцам на 10 дней (2 эстральных цикла). Самцам компонент I или компонент II вводили внутримышечно в двух дозах 10^9 в.ч. и 10^{10} в.ч. один раз в неделю в течение 48 дней (период сперматогенеза). После окончания периода введения к самцам подсаживали интактных самок на 10 дней (2 эстральных цикла). Контрольным животным вводили формулирующий буфер.

Введение вакцины по полной схеме иммунизации не оказало отрицательного влияния на репродуктивную функцию самок крыс. У самок, которым вводили вакцину, процент эмбриональной смертности на протяжении всего периода развития не отличался от показателей контрольной группы. Также не было обнаружено достоверных различий в весе и размерах плодов по сравнению с контролем.

При макроскопическом и гистологическом исследовании яичников самок, вакцинированных за две недели до спаривания, не выявлено каких-либо признаков патологических изменений.

Половину беременных крыс из каждой группы оставили для вынашивания потомства, и в течение пяти недель наблюдали за развитием новорожденного потомства: фиксировали общее состояние здоровья и поведение, изменение веса и выживаемость крысят.

Во всех группах роды у всех беременных самок прошли без осложнений. Интегральные и специфические показатели постнатального развития крысят, рожденные от иммунизированных самок и от самок, спаренных с иммунизированными самцами, не имели статистически значимых различий с контрольными значениями. Продолжительность беременности у самок, получавших вакцину, соответствовала контрольным значениям и физиологической норме для этого вида животных. Процесс родов протекал без каких-либо отклонений. Все новорожденные крысята были жизнеспособны, случаев гибели в течение первого месяца жизни не зафиксировано. Физическое развитие потомства проходило в пределах нормы и без каких-либо аномалий.

У иммунизированных самок во всех группах забирали органы репродуктивной системы на проведение гистологического исследования после достижения их потомством 35 дней жизни. После оплодотворения самок всех иммунизированных самцов подвергали эвтаназии и отделяли репродуктивные органы для их гистологического и морфологического исследования. По результатам проведенного исследования яичников самок и семенников самцов никаких признаков патологических изменений не выявлено.

3.2.3.4 Исследование эмбриотоксичности

Под эмбриотоксическими свойствами понимают способность вещества оказывать токсическое действие на развивающиеся эмбрионы или плоды. Эмбриотоксичность может проявляться как в повышении уровня эмбриональной смертности (эмбриолетальное действие), изменении массы тела и размеров плодов, задержке оссификации скелета (общая задержка развития), так и в виде анатомических, гистологических, цитологических, биохимических, нейрофизиологических и иных отклонений от нормы, проявляющихся до или после рождения (тератогенное действие), увеличении перинатальной смертности.

Исследование проводили на половозрелых крысах линии SD обоих полов и их потомстве отдельно для каждого компонента. Для оценки эмбрио- и

фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития, использовали 180 животных (120 самок и 60 самцов) и их потомство, полученное в эксперименте. Компоненты вакцины вводили беременным самкам внутримышечно один раз в неделю с 1-го по 19-й день беременности в двух дозах: 10^9 в.ч. и 10^{10} в.ч. Контрольным животным вводили формулирующий буфер.

Введение как компонента I, так и компонента II в двух дозах не оказало эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах развития. У беременных животных не зафиксировано летальных исходов, признаков интоксикации, очевидных отклонений течения беременности, замедления набора массы тела в сравнении с контрольной группой. Процент эмбриональной смертности на всех этапах развития у крыс, получавших препарат во всех дозах, был сопоставим с показателями контрольной группы. Достоверных различий от контроля по весу, размерам плодов и плаценты также не обнаружено. Введение самкам крыс компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» не оказывает негативного эффекта на физическое развитие потомства, формирование сенсомоторных рефлексов в лактационный период, двигательную активность и эмоциональное поведение после завершения вскармливания. Интегральные и специфические показатели постнатального развития крысят от опытных самок не продемонстрировали статистически значимых отличий от контрольных. При изучении эмбрионов не выявлено врожденных аномалий, пороков развития или замедления окостенения скелета. Сроки проявления характерных признаков развития, таких как отделение ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, открытие глаз у крысят опытных групп, не имели достоверных отличий от контрольных значений и соответствовали норме для данного вида животных.

Таким образом, проведенное исследование показало, что внутримышечное введение компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» не оказывает эмбриотоксического действия на репродуктивную систему половозрелых крыс, а

также антенатального и постнатального повреждающего действия на развитие эмбрионов.

3.2.3.5 Исследование иммунотоксичности

Исследование проводили на половозрелых мышах отдельно для каждого компонента вакцины. Для оценки клеточного иммунного ответа в реакции ГЗТ, фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, определения массы и клеточности органов иммунной системы использовали первое поколение гибридов после скрещивания мышей линий СВА и С57BL/6. Для оценки гуморального ответа в реакции гемагглютинации использовали мышей линии СВА (высокоотвечающая) и С57BL/6 (низкоотвечающая). Каждый компонент вакцины «Гам-КОВИД-Вак» вводили двукратно внутримышечно с интервалом в 21 день в двух дозах: 10^8 в.ч. и 10^9 в.ч. Контрольным животным вводили формулирующий буфер.

Иммунотоксичное влияние компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на Т-клеточный иммунный ответ *in vivo* оценивали в реакции ГЗТ после окончания введения компонентов вакцины. Мышам подкожно в межлопаточную область вводили антиген (эритроциты барана (2×10^8 клеток)). Вторую инъекцию антигена в дозе 10^8 клеток вводили через 5 дней в подушечку правой задней лапки, а в подушечку левой лапки – 0,05 мл физиологического раствора. Через 24 часа определяли массу обеих лап и рассчитывали индекс реакции. Сравнение индексов реакции воспаления показывает, что введение компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» не обладает стимулирующим или ингибирующим воздействием на иммунную реакцию и не приводит к развитию иммунного воспаления. Статистически достоверных различий в исследуемых показателях между опытными и контрольными группами не выявлено.

Для оценки влияния компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на клеточный иммунный ответ по фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, через 24 часа после окончания введения компонентов вакцины

мышам внутрибрюшинно вводили тушь. Результаты исследования показывают отсутствие влияния компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на активность перитонеальных макрофагов. Показатели в опытных и контрольной группах статистически не различались.

Оценку влияния компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на массу и клеточность органов иммунной системы проводили через 24 часа после окончания введения компонентов вакцины. Результаты исследования показывают отсутствие влияния компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на массу и клеточность иммунокомпетентных органов. Статистически значимых изменений по сравнению с контролем не выявлено.

Для оценки влияния компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на антителообразование в реакции гемагглютинации, после окончания введения компонентов вакцины мышам внутрибрюшинно вводили суспензию эритроцитов барана (5×10^7 клеток). Через 7 дней проводили отбор крови, в сыворотке которой определяли титр антител. Результаты исследования показывают отсутствие как угнетающего, так и стимулирующего влияния компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на антителообразование у мышей в ответ на T-зависимый антиген. Статистически достоверных различий в исследуемых показателях между опытными и контрольными группами не выявлено.

Таким образом, проведенное исследование показало, что внутримышечное введение компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» не оказывает иммунотоксического действия.

3.2.3.6 Исследование аллергизирующих свойств

Под аллергизирующими свойствами понимают способность лекарственного средства при введении в организм вызывать состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсibilизацию).

Исследование проводили на 60 морских свинок-альбиносах (самцах). Для оценки общей анафилаксии каждый компонент вакцины опытным животным

вводили в 2 дозах (10^9 в.ч. и 10^{10} в.ч.) по следующей схеме: первая инъекция – подкожно, две последующие внутримышечно с интервалом в один день. На 21-й день проводили разрешающую инъекцию эндокардиально в дозе, эквивалентной суммарной сенсibiliзирующей дозе. Отрицательным контрольным несенсибилизированным животным вводили формулирующий буфер, положительным контрольным сенсibiliзированным животным – овалбумин. Конъюнктивальную пробу проводили у животных, сенсibiliзированных двукратным внутримышечным введением компонентов вакцины с интервалом в 21 день в дозе 10^9 в.ч. или 10^{10} в.ч. Через 24 часа после второго введения компонента проводили провокационную пробу. Опытным и контрольным животным в один глаз вводили каплю компонента, в другой – каплю воды.

Результаты оценки анафилактогенной активности в реакции общей анафилаксии представлены в индексах Weigle. У несенсибилизированных животных (отрицательный контроль) не отмечали признаков анафилактического шока по индексу Weigle. У сенсibiliзированных животных (положительный контроль) анафилактическая реакция по индексу Weigle составила 2,9. Введение как компонента I, так и компонента II в двух дозах не приводило к сенсibiliзации организма и развитию анафилактической реакции при введении разрешающей дозы антигена. Отклонений в состоянии опытных животных не выявлено.

После закапывания контрольным животным воды в конъюнктивальный мешок признаков развития аллергической реакции в течение всего времени эксперимента не зафиксировано. Через 15 минут (быстрая реакция) после закапывания компонента вакцины в исследуемых дозах отсутствовали признаки аллергического конъюнктивита. Реакция через 24-48 ч (ГЗТ) отсутствовала у всех опытных животных.

Таким образом, проведенное исследование показало отсутствие алергизирующих свойств компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

3.2.3.7 Исследование биораспределения

Изучение биораспределения вакцин заключается в определении количественного содержания их компонентов в различных органах модельных животных в зависимости от используемого метода введения [Вавилова и соавт., 2024]. В рамках исследования были проведены два эксперимента: один – по количественному анализу содержания ДНК Ад26 и Ад5 в различных органах экспериментальных животных, другой – по экспрессии трансгена в различных органах экспериментальных животных после однократной внутримышечной иммунизации. Для обнаружения аденовирусных геномов в тканях животных после однократного введения рекомбинантного репликативно-дефектного вектора применялся метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Анализ экспрессии трансгена проводили с использованием модельных рекомбинантных репликативно-дефектных векторов, экспрессирующих ген люциферазы светлячка (rAd26-Luc и rAd5-Luc).

Исследование проводили на половозрелых мышах линии BALB/c обоих полов отдельно для каждого компонента вакцины. Каждый компонент вакцины «Гам-КОВИД-Вак» вводили внутримышечно в дозе 10^{10} в.ч. (для обнаружения геномов rAd в тканях и органах с помощью ПЦР в режиме реального времени) или 10^{11} в.ч. (для анализа экспрессии трансгена). Контрольным животным вводили формулирующий буфер. Определение количества копий генома rAd проводили через 24 часа после введения компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак». Биолюминесцентную визуализацию проводили на 1-й, 3-й, 7-й, 14-й и 21-й день после введения модельных аденовирусов.

В результате количественного анализа содержания ДНК rAd26-S-CoV2 в различных органах экспериментального животного было показано, что через 24 часа после однократного внутримышечного введения наибольшее количество геномов rAd26 детектировано в мышцах: 27287 копий генома на 100 нг totalной ДНК. В селезенке, печени, легких, тонком и толстом кишечнике, сердце, мозге, почках, нижних лимфатических узлах и в мочевом пузыре количество геномов

rAd26-S-CoV2 было ниже предела детекции. Через 24 часа после однократного внутримышечного введения rAd5-S-CoV2 наибольшее количество геномов также детектировано в мышцах: 182422 копии генома на 100 нг totalной ДНК. Значительное количество геномов rAd5-S-CoV2 обнаружено в печени и составило 12043 копии на 100 нг totalной ДНК. В селезенке, легких, тонком и толстом кишечнике, сердце, мозге, почках, нижних лимфатических узлах и в мочевом пузыре количество геномов rAd5-S-CoV2 было ниже предела детекции. В контрольной группе количество геномов рекомбинантного аденовируса не превышало фонового значения (600 копий на 100 нг totalной ДНК).

Для биолуминесцентной визуализации использовали rAd, экспрессирующие ген люциферазы, которые вводили животным внутримышечно в дозе 10^{11} в.ч. Для всех типов rAd биолуминесцентный сигнал был обнаружен только в месте инъекции (рисунок 38).

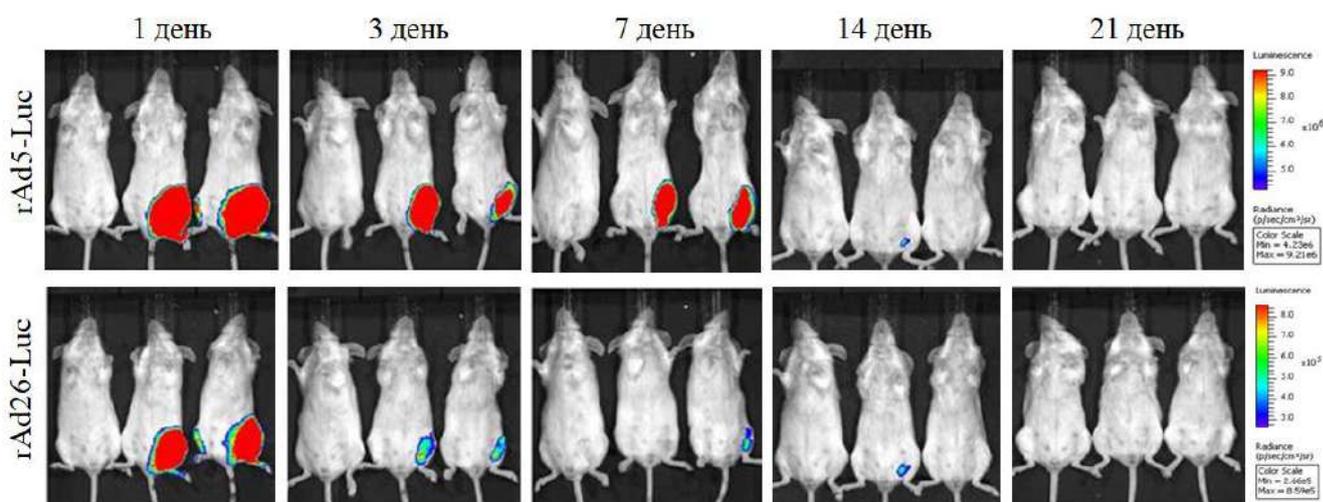


Рисунок 38 – Биораспределение rAd5-Luc и rAd26-Luc у мышей после внутримышечного введения методом биолуминесцентной визуализации.

После однократного введения rAd5-Luc или rAd26-Luc самую высокую экспрессию люциферазы детектировали через 24 часа после введения. Активность люциферазы постепенно снижалась к 21-му дню для всех аденовирусов.

Таким образом, проведенное исследование показало распределение компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в месте введения.

По результатам доклинических исследований установлено отсутствие острой и хронической токсичности. Не выявлено репродуктивной, эмбрио- и фетотоксичности. Показано отсутствие иммунотоксичности, аллергизирующих свойств, местно-раздражающего действия. Таким образом, проведенный полный комплекс доклинических исследований показал безопасность, иммуногенность и эффективность разработанной вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

3.3 Клинические исследования

В соответствии с утвержденными протоколами было проведено три самостоятельных клинических исследования вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (приложение В). Первое исследование проходило как открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» при участии здоровых добровольцев 18-60 лет. Следующие исследования проходили параллельно: открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» при участии добровольцев старше 60 лет и рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое клиническое исследование эффективности, иммуногенности и безопасности комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в параллельных группах в профилактике коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.

3.3.1 Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» с участием здоровых добровольцев

Исследование проводилось в два этапа с 17 июня по 19 декабря 2020 г. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации с участием 43 здоровых добровольцев, соответствующих критериям включения и не имеющих критериев невключения.

Отобранные в рамках процедур прескрининга 43 добровольца прошли скрининг, по результатам которого 20 участников (18 добровольцев и 2 дублера) были включены в первый этап и 23 участника (20 добровольцев и 3 дублера) – во второй. Участие дублеров не понадобилось, они были выведены из исследования до введения вакцины. Таким образом, в исследовании приняли участие и получили исследуемый препарат 38 здоровых добровольцев: 18 – в 1-м этапе (9 добровольцев получали компонент I и 9 добровольцев – компонент II) и 20 – во 2-м этапе. Все 38 добровольцев завершили участие в исследовании согласно протоколу.

Для предотвращения инфицирования добровольцы находились в условиях изоляции 14 дней до введения вакцины и 28 дней после.

Задачей первого этапа КИ была оценка профиля безопасности, переносимости и иммуногенности при раздельном введении компонентов I и II вакцины «Гам-КОВИД-Вак». Второй этап начинался только при условии удовлетворительной переносимости компонентов на предыдущем этапе, что подразумевало отсутствие нежелательных явлений, требующих прекращения исследования. Задачей второго этапа КИ была оценка безопасности, переносимости и иммуногенности вакцины при использовании схемы введения, которая предполагается в клинической практике (введение компонентов I и II в режиме прайм-буст с интервалом в 21 день). Такой поэтапный подход является стандартной практикой для КИ I фазы, в особенности когда изучаемый препарат впервые применяется в клинической практике.

Введение лекарственного препарата осуществлялось сразу в иммунизирующей дозе, без этапа подбора дозы, так как безопасность и иммуногенность вакцины на основе Ад26 и Ад5 была изучена в предыдущих исследованиях вакцины для профилактики БВРС [Должикова и соавт., 2020; Ковыршина и соавт, 2020]. Регуляторная практика позволила использовать платформенный подход, что значительно сократило время до внедрения вакцины в клиническую практику в условиях пандемии.

Из этических соображений группу плацебо в исследование не включали.

В оценку безопасности были включены все 38 добровольцев, участвующие как в первом (18 добровольцев), так и во втором (20 добровольцев) этапе исследования. Переносимость и безопасность оценивали на основании изучения частоты и выраженности местных (область места введения препарата) и общих (системные реакции организма на введение препарата) реакций и регистрации нежелательных явлений (НЯ) в ходе исследования. К оцениваемым критериям относились: данные о развитии нежелательных явлений, результаты оценки показателей жизненно важных функций (АД, ЧСС, температура тела), результаты инструментальных исследований (ЭКГ), результаты физикального осмотра, результаты клинического анализа крови, биохимического анализа крови и анализа мочи.

В изучение иммунологической эффективности также были включены все 38 добровольцев, участвующие в обоих этапах исследования. Для оценки иммуногенности использовали методологический подход на основе сравнения показателей напряженности иммунитета со значениями показателей до введения исследуемого препарата. К показателям напряженности гуморального иммунного ответа относились: уровень сероконверсии, средние геометрические титры антител, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, титры нейтрализующих антител. Показатели напряженности клеточного иммунного ответа определяли по проценту пролиферирующих Т-лимфоцитов и приросту концентрации ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов. Кроме того, для анализа клинической эффективности при отсутствии данных по заболеваемости у вакцинированных добровольцев проведено сравнительное исследование титров антител у вакцинированных добровольцев и титров антител у пациентов, переболевших коронавирусной инфекцией COVID-19 (реконвалесцентов).

3.3.1.1 Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности «Гам-КОВИД-Вак» (первый этап исследования)

3.3.1.1.1 Оценка безопасности и переносимости отдельных компонентов вакцины

Согласно протоколу исследования, 18 добровольцев, включенных в первый этап, однократно получили один из компонентов исследуемой вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в расчетной терапевтической дозе 1×10^{11} в.ч. внутримышечно в дельтовидную мышцу плеча. 9 добровольцев получили компонент I и 9 добровольцев получили компонент II. В этом этапе участвовали только мужчины, все европеоидной расы (средний возраст $26,6 \pm 5,60$ лет, индекс массы тела $25,7 \pm 2,75$ кг/м²). Период наблюдения составил 28 дней, после промежуточного анализа наблюдение было продолжено до 180 дней.

Значимые заболевания в анамнезе, которые могли бы препятствовать участию в исследовании, отсутствовали. У одного добровольца в анамнезе была аппендэктомия. Результаты физикального осмотра на скрининге патологии не выявили. Другие обследования скрининга соответствовали требованиям критериев включения/невключения.

Обобщенные данные по количеству нежелательных явлений (местные и системные реакции) после вакцинации представлены на рисунке 39.

Всего в ходе проведения первого этапа исследования было зарегистрировано 121 НЯ у всех без исключения добровольцев. Вместе с тем НЯ при введении компонента I развивались несколько чаще. В группе добровольцев, получивших компонент I (rAd26-S-CoV2) выявлено 74 НЯ (61,1%), которые были легкой степени тяжести. В группе добровольцев, получивших компонент II (rAd5-S-CoV2) выявлено 47 НЯ (38,8%), из которых 45 были легкой степени тяжести и 2 средней степени тяжести (повышение уровня АСТ и гипертермия у разных добровольцев).

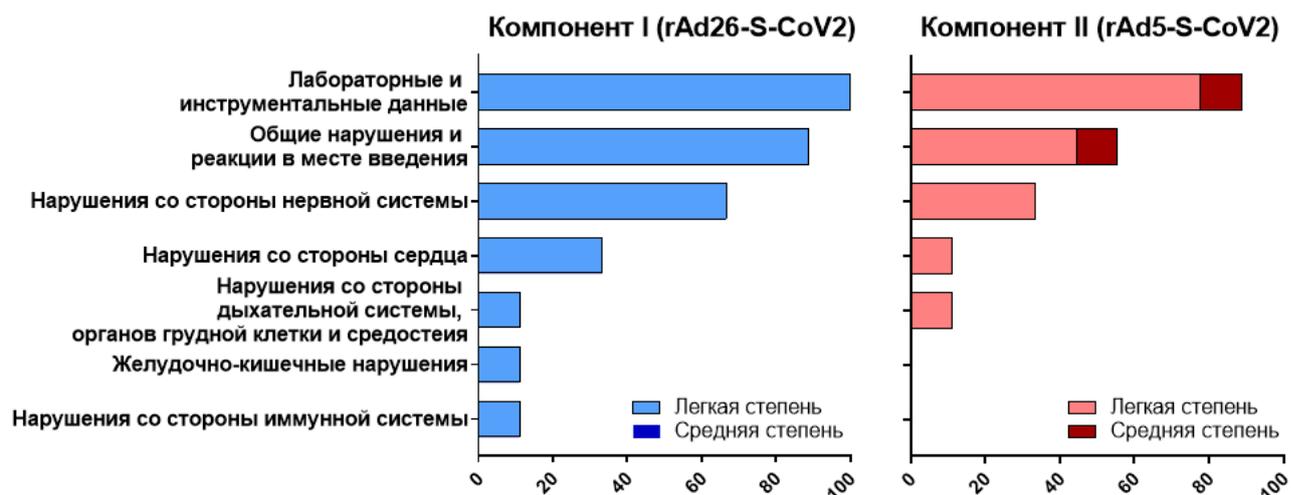


Рисунок 39 – Количество (%) нежелательных явлений (местные и системные реакции) после вакцинации.

Серьезных нежелательных явлений в этом исследовании зарегистрировано не было. Ни одно НЯ на этом этапе не привело к выбытию добровольца из исследования или отмене исследуемого препарата. Большинство НЯ завершились выздоровлением без последствий: 45 НЯ в группе добровольцев, получившей компонент I, и 21 НЯ в группе, получившей компонент II. Для 29 и 26 НЯ, соответственно, на 42-й день исследования исход был неизвестен. Медикаментозная коррекция потребовалась 5 (55,56%) добровольцам для 6 НЯ в группе компонента I и 2 (22,22%) добровольцам для 5 НЯ в группе компонента II.

Наиболее часто отмечались нежелательные явления категории системно-органного класса словаря MedDRA «Лабораторные и инструментальные данные»: 36 зарегистрировано у всех 9 (100%) добровольцев, получивших компонент I, 29 - у 8 (88,89%) добровольцев, получивших компонент II. К НЯ этой категории относились отклонения в иммунологическом статусе, в общем и биохимическом анализе крови.

Следующими по частоте следовали нежелательные явления категории «Общие нарушения и реакции в месте введения»: 26 зарегистрировано у 8 (88,89%) добровольцев, получивших компонент I, и 13 у 5 (55,56%) добровольцев, получивших компонент II.

Зарегистрированные НЯ были представлены такими реакциями, как боль в месте введения препарата, зуд в месте введения, гипертермия, астения, боль (в данном случае – ломота в теле, сопровождаемая артралгией), снижение аппетита. Практически все местные реакции, кроме случая гипертермии у одного добровольца, получившего компонент II, имели слабовыраженный характер и не оказывали существенного влияния на общее состояние. Реже встречались такие нежелательные явления, как головная боль (у 6 добровольцев, получивших компонент I, и у 3 добровольцев, получивших компонент II), сердцебиение (у 3 добровольцев, получивших компонент I, и у одного добровольца, получившего компонент II), диарея (у одного добровольца, получившего компонент I), боль в ротоглотке (у одного добровольца, получившего компонент II), вирусная инфекция верхних дыхательных путей (у одного добровольца, получившего компонент I), а также крапивница (данная аллергическая реакция встречалась у одного добровольца, получившего компонент I).

Кроме того, оценку безопасности проводили также на основании данных мониторинга основных показателей жизнедеятельности добровольцев (температура тела, систолическое и диастолическое АД, ЧСС, ЧДД, ЭКГ), полученных на визитах согласно графику протокола. Клинически значимых отклонений от нормы не наблюдали.

В целом можно сказать, что выявленные в ходе первого этапа исследования нежелательные явления характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов.

3.3.1.1.2 Оценка иммунологической эффективности отдельных компонентов вакцины

а) Определение поствакцинального гуморального иммунного ответа

Исследование поствакцинального гуморального иммунного ответа включало определение титра IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2, а также

вируснейтрализующих антител к аденовирусным векторам. Для оценки эффективности вакцинации был использован показатель сероконверсии, определяемый как доля лиц, у которых наблюдалось четырехкратное и более увеличение титров антител в результате вакцинации в различных иммунологических реакциях.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев после введения компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по титрам IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, на 0-й, 14-й, 21-й и 28-й дни после вакцинации представлена на рисунке 40.

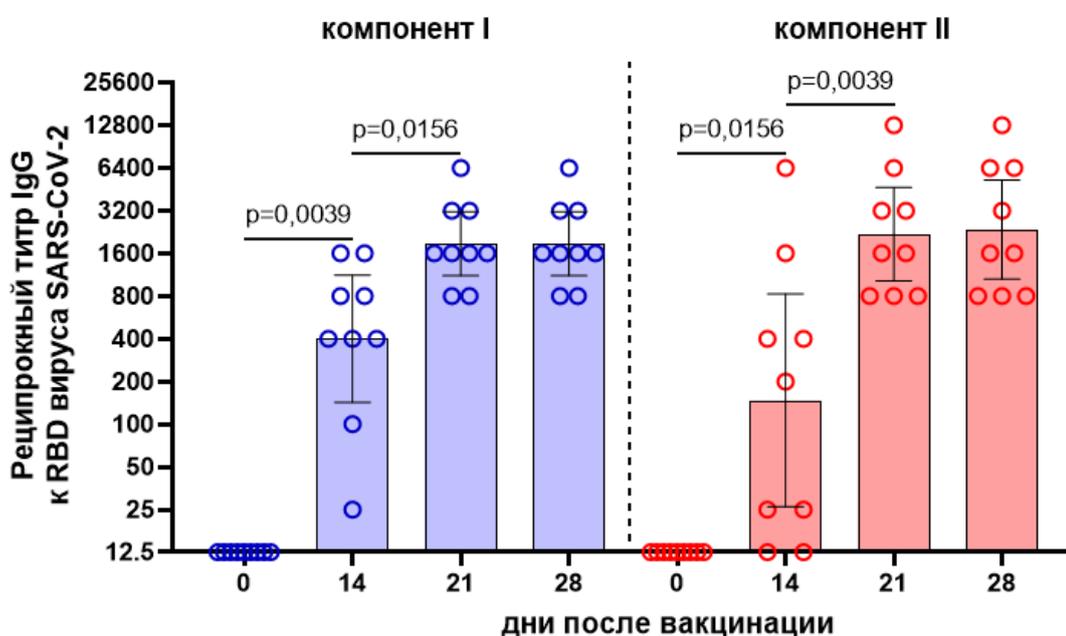


Рисунок 40 – Изменение уровня IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 после вакцинации добровольцев компонентом I и компонентом II. Столбцы представляют собой СГТ для каждой группы с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по T-критерию Вилкоксона.

В ответ на иммунизацию добровольцев компонентом I вакцины «Гам-КОВИД-Вак» наблюдали достоверное повышение уровня RBD-специфичных IgG антител. На 14-й день СГТ=1:400. При этом на 21 день отмечали достоверное повышение титра специфичных IgG антител (СГТ=1:1866) по сравнению с 14-м

днем. На 28-й день прироста специфичных IgG антител (СГТ=1:1866) по сравнению с 21-м днем не наблюдали. Уровень сероконверсии на 21-й и 28-й дни составил 100% (n=9).

В ответ на иммунизацию компонентом II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» уровень сероконверсии на 21-й и 28-й дни также составил 100% (n=9). На 14-й день СГТ=1:147. При этом на 21-й день отмечали достоверное повышение титра специфичных IgG антител (СГТ=1:2177) по сравнению с 14-м днем. На 28-й день достоверного повышения титра антиген-специфичных IgG антител (СГТ=1:2352) по сравнению с 21-м днем не наблюдали.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев после введения компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по титрам нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 на 0-й, 14-й, 21-й и 28-й дни после иммунизации представлена на рисунке 41.

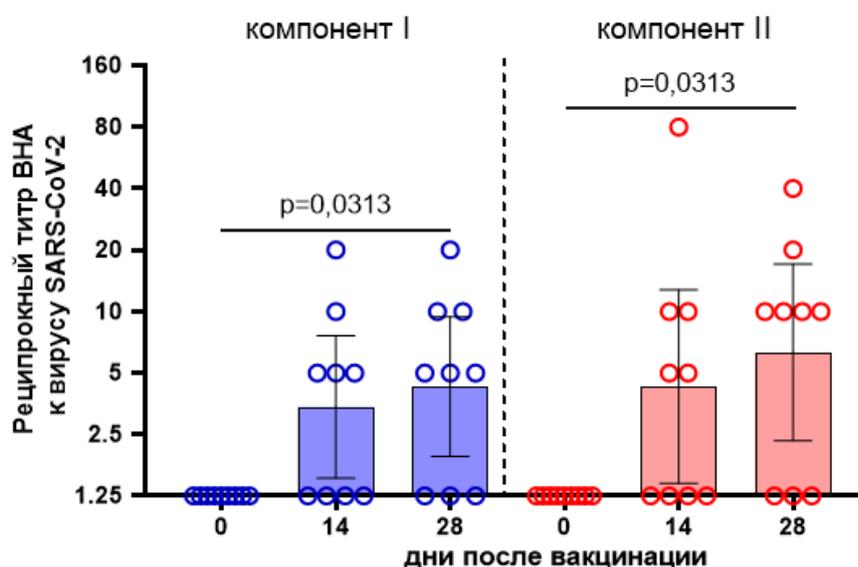


Рисунок 41 – Изменение титров нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации добровольцев компонентом I и компонентом II. Столбцы представляют собой СГТ для каждой группы с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по T-критерию Вилкоксона.

По результатам проведенного анализа было показано, что после иммунизации компонентом I на 14-й день у 55,5% добровольцев (n=5 из 9) в сыворотке крови детектируются ВНА к вирусу SARS-CoV-2; на 28-й день – у 66,7% добровольцев (n=6 из 9). После иммунизации добровольцев компонентом II на 14-й и 28-й дни также у 55,5% и 66,7% добровольцев детектируются ВНА.

Однако СГТ ВНА были относительно низкими. Так, СГТ в группе добровольцев, получивших компонент I вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на 14-й и 28-й дни составил 1:3,402 и 1:4,286 соответственно. В группе добровольцев, получивших компонент II вакцины «Гам-КОВИД-Вак», на 14-й день СГТ=1:4,286, на 28-й день – 1:6,3. Тем не менее, увеличение титров ВНА было статистически значимым на 28-й день после иммунизации ($p<0,05$), что достоверно подтверждает эффект вакцинации по сравнению с исходными значениями.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что иммунизация компонентом I или компонентом II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» приводит к выработке специфических IgG антител, в том числе вируснейтрализующих.

Одним из факторов, который может оказывать негативное влияние на иммунологическую эффективность рекомбинантных аденовирусных векторов, является предсуществующий иммунитет на используемый вектор, обусловленный вируснейтрализующими антителами. С целью определения влияния вируснейтрализующих антител к вектору на эффективность иммунизации проведено исследование корреляции между титром IgG-специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 и ВНА к Ад26 и Ад5.

Сыворотку крови добровольцев, полученную до начала иммунизации (0 день), тестировали на наличие ВНА к Ад26 и Ад5. Результаты исследования представлены на рисунке 42.

По результатам проведенного исследования было показано, что в группе добровольцев, которые должны быть вакцинированы компонентом I, ВНА к Ад26 детектируются у 16,67% (n=2 из 9) добровольцев, а к Ад5 – у 33,33% (n=3 из 9). В

группе добровольцев, которые должны быть вакцинированы компонентом II, ВНА к аденовирусам (Ад26 и Ад5) детектируются у 11,11% (n=1 из 9).

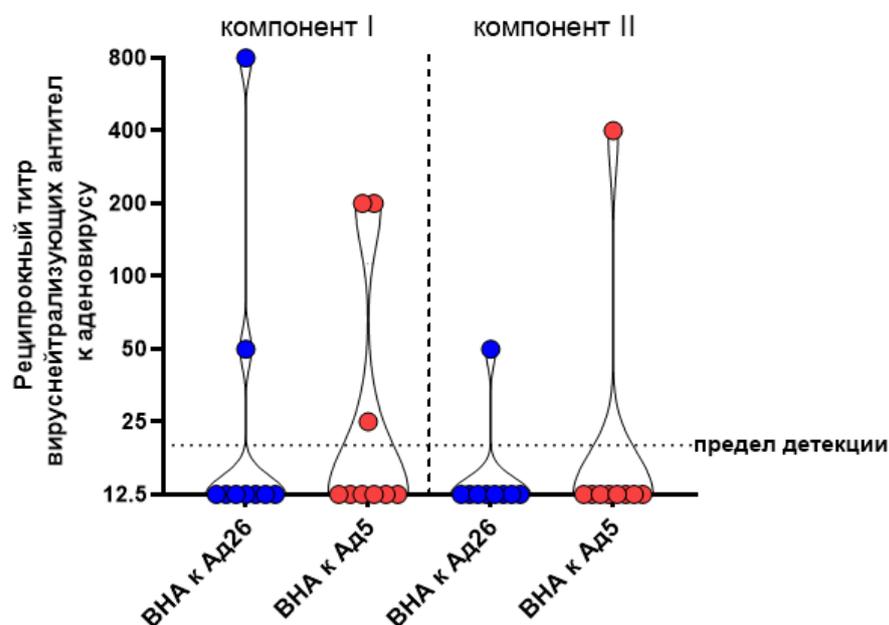


Рисунок 42 – Титры вируснейтрализующих антител к аденовирусным векторам 26 и 5 серотипов у добровольцев до вакцинации (0-й день).

Для определения корреляции между титром IgG-специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 и ВНА к Ад26 и Ад5 был проведен анализ данных на нормальность. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Тест на нормальность распределения данных по методу Д'Агостино-Пирсона

	ВНА		RBD-специфические IgG		
	Ад26	Ад5	14 день	21 день	28 день
Компонент I					
К2	21,64	21,50	1,412	9,972	9,972
Уровень значимости p	<0,0001	<0,0001	0,4935	0,0068	0,0068
Прошел тест на нормальность ($\alpha=0.05$)?	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
Количество анализируемых образцов	9	9	9	9	9

	ВНА		RBD-специфические IgG		
	Ад26	Ад5	14 день	21 день	28 день
Компонент II					
К2	21,64	4,467	21,66	12,25	6,896
Уровень значимости p	<0,0001	0,1072	<0,0001	0,0022	0,0318
Прошел тест на нормальность ($\alpha=0.05$)?	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
Количество анализируемых образцов	9	9	9	9	9

Поскольку пулы данных для группы компонента I (по наличию ВНА к рекомбинантным аденовирусным векторам) и группы компонента II (по наличию RBD-специфических IgG) не прошли тест на нормальность, дальнейший корреляционный анализ проводили методом Спирмена.

В таблице 9 приведены данные коэффициента корреляции Спирмена и уровни значимости при попарном сравнении исследуемых пулов данных: титра ВНА к аденовирусам и уровня иммунного ответа на вакцинный антиген.

Таблица 9 – Результаты корреляционного анализа между титром ВНА к аденовирусным векторам до иммунизации и титром RBD-специфических IgG в сыворотке крови добровольцев на 14, 21 и 28 дни после введения компонентов

	RBD-специфические IgG					
	14 день		21 день		28 день	
	r	p	r	p	r	p
Компонент I						
ВНА к Ад26	-0,44	0,29	-0,1	0,92	-0,1	0,92
ВНА к Ад5	-0,41	0,29	-0,49	0,21	-0,49	0,21
Компонент II						
ВНА к Ад26	0,02	>0,99	0,31	0,47	0,35	0,36
ВНА к Ад5	-0,39	0,31	-0,51	0,19	-0,43	0,25

По результатам проведенного исследования не выявлено значимой взаимосвязи между уровнем нейтрализующих антител к аденовирусным векторам до вакцинации и уровнем RBD-специфичных IgG антител на 14-й, 21-й и 28-й дни после введения как компонента I, так и компонента II.

Кроме того, было проанализировано образование ВНА к векторам rAd26 и rAd5, обладающих перекрестной реактивностью (рисунок 43).

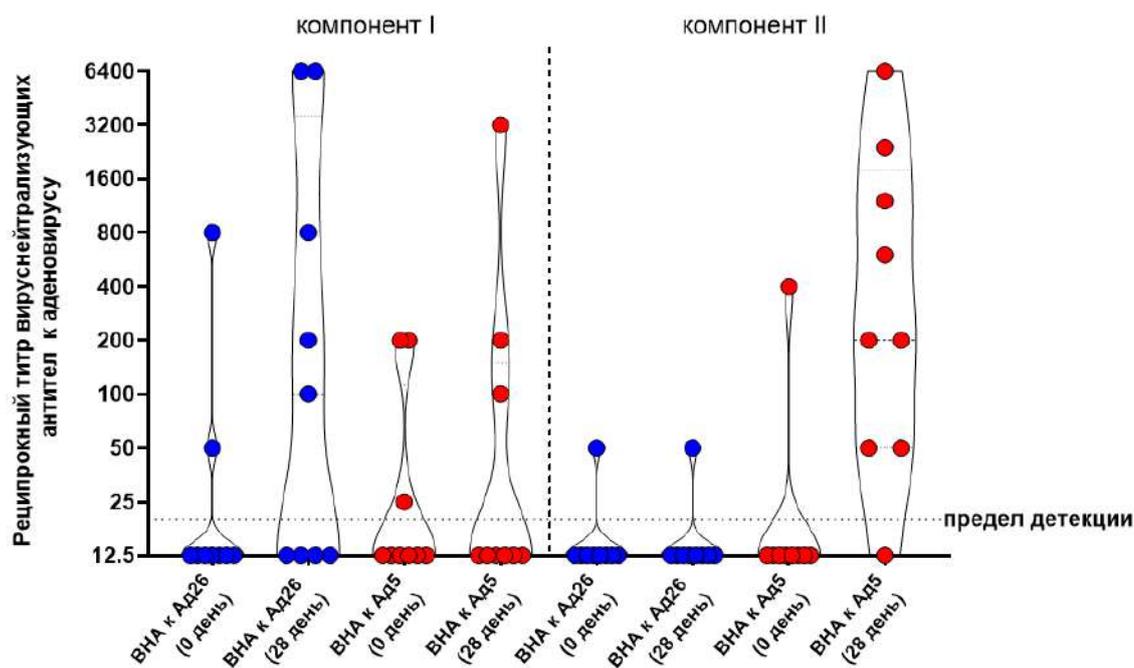


Рисунок 43 – Титры вируснейтрализующих антител к аденовирусным векторам 26 и 5 серотипов у добровольцев на 0-й и 28-й дни исследования.

По результатам проведенного анализа было показано, что в группе добровольцев, которые были вакцинированы компонентом I, СГТ ВНА к Ад5 составил 1:54 на 28-й день исследования. Статистически достоверной разницы с СГТ до вакцинации не наблюдали ($p=0,1250$). Введение компонента I не приводило к увеличению титра ВНА к Ад5. В группе добровольцев, вакцинированных компонентом II, СГТ ВНА к Ад26 на 0-й и 28-й день исследования были аналогичными и составили 1:14,58. Введение компонента II не приводило к увеличению титра ВНА к Ад26.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии перекрестной реактивности ВНА по отношению к компонентам вакцины [Сухова и соавт., 2024a].

Таким образом, было показано, что иммунизация добровольцев компонентами вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в присутствии предсуществующего иммунного ответа к аденовирусам человека 26 и/или 5 серотипов не влияет на выработку RBD-специфичных IgG антител.

б) Определение поствакцинального клеточного иммунитета

Исследование поствакцинального клеточного иммунного ответа включало определение процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и прироста концентрации ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов после введения компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по сравнению с исходными уровнями. Динамика развития поствакцинального клеточного иммунного ответа у добровольцев после введения компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по проценту пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов на 0-й (до иммунизации), 14-й и 28-й дни исследования представлена на рисунке 44.

Рост напряженности клеточного иммунитета у добровольцев, иммунизированных компонентом I или компонентом II вакцины «Гам-КОВИД-Вак», согласно медиане значений пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, отмечается по мере увеличения временного интервала, прошедшего с момента вакцинации. Наблюдается статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов через 28 дней после проведенной вакцинации. Важно отметить, что у добровольцев не было обнаружено предсуществующих вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов (медиана значений равна 0%) (день 0).

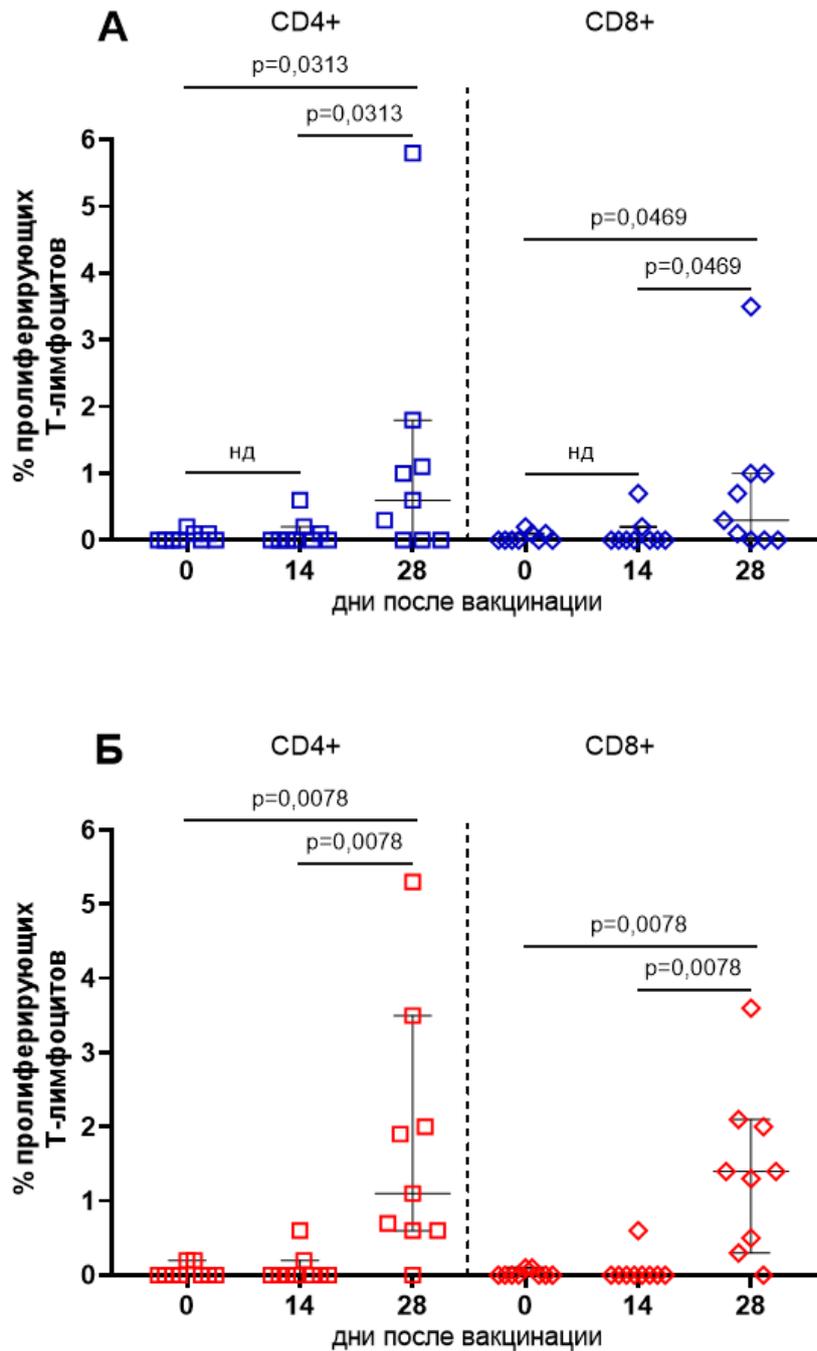


Рисунок 44 – Изменение процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов после иммунизации добровольцев компонентом I (А) и компонентом II (Б). Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

Спустя две недели после иммунизации компонентом I у двух человек (22,22%) отмечено увеличение процента пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-

лимфоцитов и у одного человека (11,11%) – только CD4+ Т-лимфоцитов (рисунок 44А). Через 28 дней после иммунизации добровольцев компонентом I у 66,67% (n=6 из 9) был зарегистрирован пролиферативный ответ как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов. Кроме того, статистически достоверная разница наблюдается в процентах изученных Т-клеток между 14-м и 28-м днем ($p < 0,05$). Медиана значений на 28-й день после иммунизации для CD4+ Т-лимфоцитов равна 0,6% (95% ДИ: 0-1,8), для CD8+ Т-лимфоцитов – 0,3% (95% ДИ: 0-1,0).

Спустя две недели после иммунизации компонентом II, увеличение доли делящихся CD4+ и CD8+ Т-клеток было зафиксировано лишь у одного участника исследования (11,11%) (рисунок 44Б). Через 28 дней после иммунизации добровольцев компонентом II у 88,89% (n=8 из 9) наблюдается статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов ($p < 0,05$). Медиана значений на 28-й день после иммунизации для CD4+ Т-лимфоцитов равна 1,1% (95% ДИ: 0,6-3,5), для CD8+ Т-лимфоцитов – 1,4% (95% ДИ: 0,3-2,1).

На основании полученных данных можно отметить, что иммунизация компонентом I или компонентом II на 28-й день формирует выраженный лимфопролиферативный ответ как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов.

Кроме того, напряженность поствакцинального клеточного иммунного ответа дополнительно оценивали по продукции ИФН γ *in vitro*.

Динамика развития поствакцинального клеточного иммунного ответа у добровольцев после введения компонента I или компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по приросту концентрации ИФН γ мононуклеарными клетками периферической крови после антигенной рестимуляции их белком S вируса SARS-CoV-2 на 0-й (до иммунизации), 14-й и 28-й дни исследования представлена на рисунке 45.

При анализе данных показатели продукции ИФН γ *in vitro* в целом совпадали с данными пролиферативного иммунного ответа.

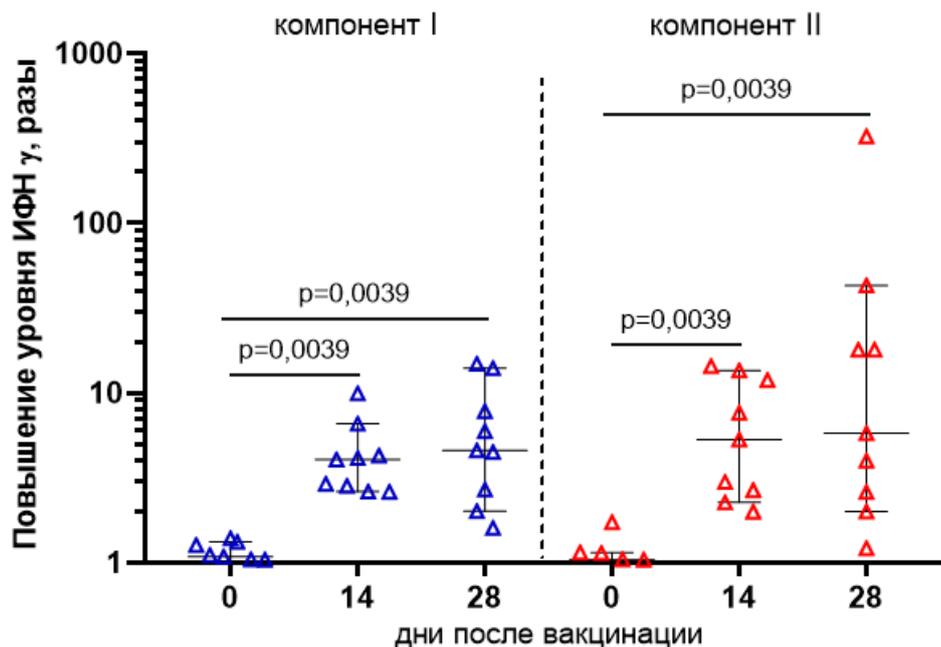


Рисунок 45 – Изменение концентрации ИФН γ (в разях) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев после иммунизации компонентом I и компонентом II. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по T-критерию Вилкоксона.

Через 14 дней после иммунизации компонентом I у 100% добровольцев (n=9) детектировали прирост концентрации ИФН γ , медиана составляет 4,05 (95% ДИ: 2,623-6,597) по сравнению с 0-м днем - 1,08 (95% ДИ: 0,992-1,328). Статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ через 14 дней после иммунизации составила $p < 0,05$. Через 28 дней после иммунизации компонентом I у 88,89% добровольцев (n=8 из 9) детектировали прирост концентрации ИФН γ . Медиана значений составила 4,58 (95% ДИ: 2,007-13,94). Между 0-м и 28-м днями исследования также наблюдается статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ - $p < 0,05$.

Через 14 дней после иммунизации компонентом II у 88,89% добровольцев (n=8 из 9) детектировали прирост концентрации ИФН γ , медиана составляет 5,316 (95% ДИ: 2,267-13,54) по сравнению с 0 днем - 1,041 (95% ДИ: 0,929-1,148). Статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ

через 14 дней после иммунизации составила $p < 0,05$. Через 28 дней после иммунизации компонентом I у 88,89% добровольцев ($n=8$ из 9) детектировали прирост концентрации ИФН γ . Медиана значений составила 5,792 (95% ДИ: 2,005-42,92). Между 0-м и 28-м днями исследования также наблюдается статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ - $p < 0,05$.

На основании полученных данных (по показателям лимфопролиферативного ответа и по приросту концентрации ИФН γ) можно сделать вывод о том, что иммунизация как компонентом I, так и компонентом II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» способна сформировать напряженный поствакцинальный клеточный антиген-специфический иммунный ответ.

в) Сравнительный анализ поствакцинального иммунного ответа

О полноценности развития поствакцинального иммунитета можно судить только в том случае, если имеется возможность сопоставить количественные параметры гуморального и клеточного иммунного ответа у людей в одном исследовании. Суммарные данные по индивидуальным показателям иммунного ответа на 28-й день исследования представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Индивидуальные показатели иммунного ответа у добровольцев, иммунизированных компонентом I или компонентом II

№ добровольца	Гуморальный иммунный ответ		Клеточный иммунный ответ			Любой ответ
	IgG	ВНА	CD4+	CD8+	ИФН γ	
02-КОВИД-002	+	+			+	+
02-КОВИД-004	+		+	+		+
02-КОВИД-005	+				+	+
02-КОВИД-006	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-007	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-008	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-009	+	+			+	+

№ добровольца	Гуморальный иммунный ответ		Клеточный иммунный ответ			Любой ответ
	IgG	ВНА	CD4+	CD8+	ИФН γ	
02-КОВИД-012	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-013	+		+	+	+	+
02-КОВИД-014	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-015	+		+	+	+	+
02-КОВИД-016	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-017	+	+	+	+		+
02-КОВИД-018	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-019	+		+	+	+	+
02-КОВИД-021	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-022	+		+	+	+	+
02-КОВИД-023	+	+			+	+
Итого	100%	66,67%	77,78%	77,78%	88,89%	100%

Все добровольцы (100%) ответили на иммунизацию тем или иным типом иммунного ответа, что указывает на высокую иммуногенность компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

3.3.1.2 Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности «Гам-КОВИД-Вак» (второй этап исследования)

3.3.1.2.1 Оценка безопасности и переносимости вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

Согласно протоколу исследования, 20 добровольцев, включенных во второй этап, получили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» в расчетной терапевтической дозе 1×10^{11} в.ч. внутримышечно в дельтовидную мышцу плеча в режиме прайм-буст: сначала вводили компонент I, через 21 день – компонент II. В этом этапе участвовали 14 мужчин и 6 женщин, все европеоидной расы (средний возраст

26,4±4,36 лет, индекс массы тела 24,4±3,11 кг/м²). Период наблюдения составил 180 дней (промежуточный анализ проводили на 42-й день после вакцинации).

Значимые заболевания в анамнезе, которые могли бы препятствовать участию в исследовании, отсутствовали. У двух добровольцев в анамнезе была аппендэктомия и удаление мениска. Результаты физикального осмотра не выявили патологии. Остальные обследования, проведенные на этапе скрининга, соответствовали требованиям критериев включения/невключения.

Обобщенные данные по количеству нежелательных явлений (местные и системные реакции) после вакцинации представлены на рисунке 46.

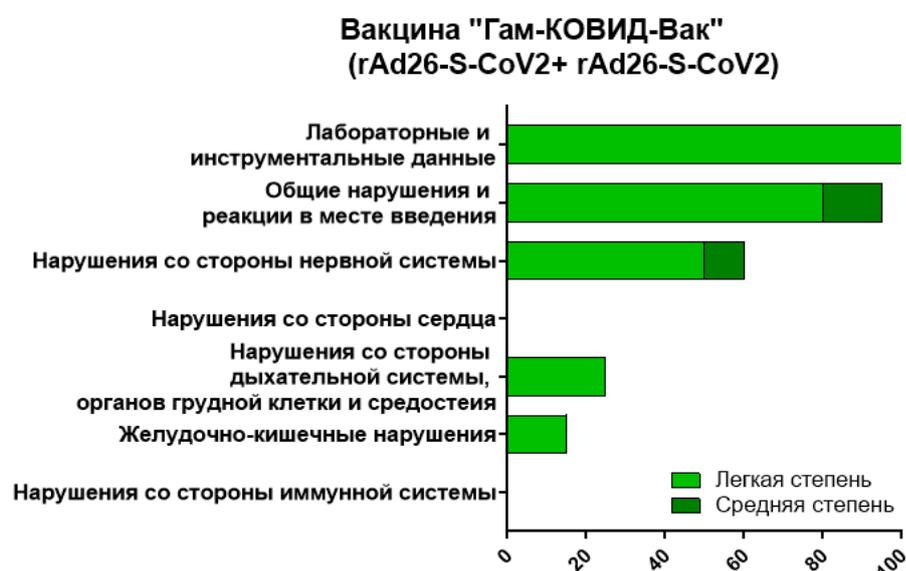


Рисунок 46 – Количество (%) нежелательных явлений (местные и системные реакции) после вакцинации представлены.

Всего в ходе проведения второго этапа исследования было зарегистрировано 175 НЯ у всех без исключения добровольцев: 169 НЯ (96,6%) были легкой степени тяжести, 6 НЯ (3,4%) были средней степени тяжести (два случая связаны с астенией, один случай боли характеризовался ломотой в теле, сопровождаемой артралгией, один случай повышения температуры тела до 38,7 °С и два случая головной боли). НЯ тяжелой степени, а также СНЯ в этом исследовании зарегистрировано не было. Ни одно НЯ на этом этапе не привело к выбытию добровольца из исследования или отмене исследуемого препарата. Большинство НЯ завершились выздоровлением без последствий.

Наиболее часто отмечались нежелательные явления категории «Лабораторные и инструментальные данные»: 74 НЯ зарегистрировано у всех 20 (100%) добровольцев. К НЯ этой категории относились отклонения в иммунологическом статусе, в общем анализе крови и мочи.

Следующими по частоте следовали НЯ категории «Общие нарушения и реакции в месте введения»: 74 НЯ зарегистрировано у 19 (95%) добровольцев. Среди местных реакций отмечались болезненность у 8 (40%) добровольцев, повышение температуры кожи у 2 (10%) и отек у 1 (5%). Зарегистрированные общие нарушения выражались в гипертермии у 19 (95%) добровольцев, астении у 11 (55%), недомогании у 2 (10%), ломоте в теле у 4 (20%), ознобе у 2 (10%) и снижении аппетита у 1 (5%). Большинство местных реакций имели слабовыраженный характер и не оказывали существенного влияния на общее состояние. Реже у добровольцев встречались такие нежелательные явления со стороны нервной системы, как головная боль (у 11 (55%)), со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения, как ринорея и першение в горле у 11 (55%), боль в ротоглотке, заложенность носа и чихание у 1 (5%). Среди желудочно-кишечных нарушений отмечали диарею у 3 (15%) добровольцев.

Мониторинг основных показателей жизнедеятельности добровольцев (температура тела, систолическое и диастолическое АД, ЧСС, ЧДД), полученных на визитах согласно графику процедур протокола, показал отсутствие существенных изменений. Клинически значимых отклонений от нормы со стороны показателей ЭКГ в 12 отведениях не обнаружено.

В периоде наблюдения за добровольцами до 180-го дня (т.е. за период с 28-го по 180-й день для участников первого этапа и с 42-го по 180-й день для участников второго этапа) было зарегистрировано в общей сложности 9 НЯ у 8 (21,05%) добровольцев. Наиболее частым НЯ была вирусная инфекция верхних дыхательных путей: у четырех (10,53%) добровольцев. Менее часто отмечались: ринорея (у двух добровольцев), коронавирусная инфекция COVID-19 (у одного

добровольца), расстройство регуляции вегетативной нервной системы (у одного добровольца) и гипертермия (у одного добровольца).

Нежелательные явления, зарегистрированные в периоде наблюдения до 180-го дня, расценивались как имеющие сомнительную связь с исследуемым препаратом и завершились выздоровлением. Одно НЯ (расстройство регуляции вегетативной нервной системы) было средней степени тяжести, все остальные НЯ, включая случай COVID-19, были легкой степени тяжести.

В целом можно сказать, что выявленные в ходе второго этапа исследования нежелательные явления характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов.

3.3.1.2.2 Оценка иммунологической эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

а) Определение напряженности поствакцинального гуморального иммунного ответа

Исследование напряженности гуморального иммунного ответа включало определение титра специфических IgG антител к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2, а также вируснейтрализующих антител к аденовирусным векторам.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев на 0-й, 14-й, 21-й, 28-й и 42-й дни после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по титрам IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, представлена на рисунке 47.

В ответ на иммунизацию добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак» наблюдали достоверное повышение уровня RBD-специфичных IgG антител. При оценке показателя уровня сероконверсии после двукратной вакцинации в режиме прайм-буст на 14-й день исследования он составил 95% (n=19 из 20). На 21-й, 28-й и 42-й дни исследования сероконверсия наблюдалась у 100% добровольцев (n=20). Увеличение титров специфических IgG антител было статистически значимым уже после первого компонента. На 14-й день СГТ=1:132 (p < 0,0001), на

21-й день – СГТ=1:1345 ($p < 0,0001$). Введение компонента II через 7 дней (28-й день исследования) привело к повышению титра специфичных IgG антител (СГТ=1:5382) в 4 раза. Примечательно, что в отличие от иммунизации отдельно каждым компонентом, титры антител продолжали расти с течением времени, и к 42-му дню СГТ составил 1:14703, что указывает на продолжающееся развитие иммунных ответов после вакцинации.

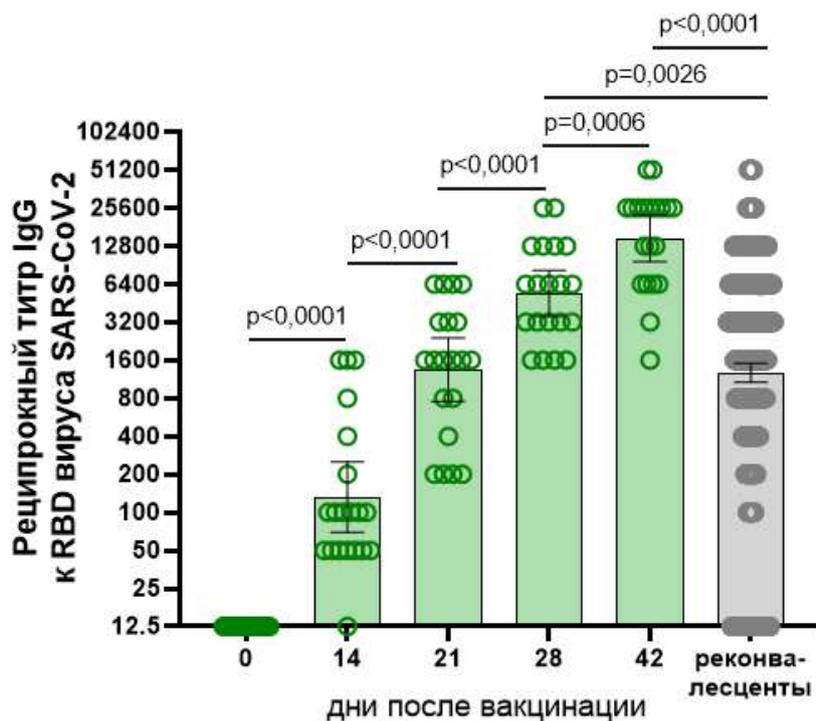


Рисунок 47 – Изменение титров IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 после иммунизации добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак» и реконвалесцентов. Столбцы представляют собой СГТ для каждой группы с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

Важно отметить, что у реконвалесцентов ($n=700$), перенесших COVID-19 в легкой и средней форме, в сыворотке крови детектируются антиген-специфичные IgG антитела с СГТ=1:1240. При сравнении титров IgG антител у вакцинированных добровольцев с титрами у реконвалесцентов показано, что вакцинация в режиме прайм-буст приводит к выработке антител с достоверно

более высоким уровнем как на 28-й ($p=0,00261$), так и на 42-й ($p<0,0001$) дни от начала вакцинации.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что иммунизация вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст приводит к выработке высокого уровня антиген-специфичных IgG антител.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по титрам ВНА к вирусу SARS-CoV-2 представлена на рисунке 48.

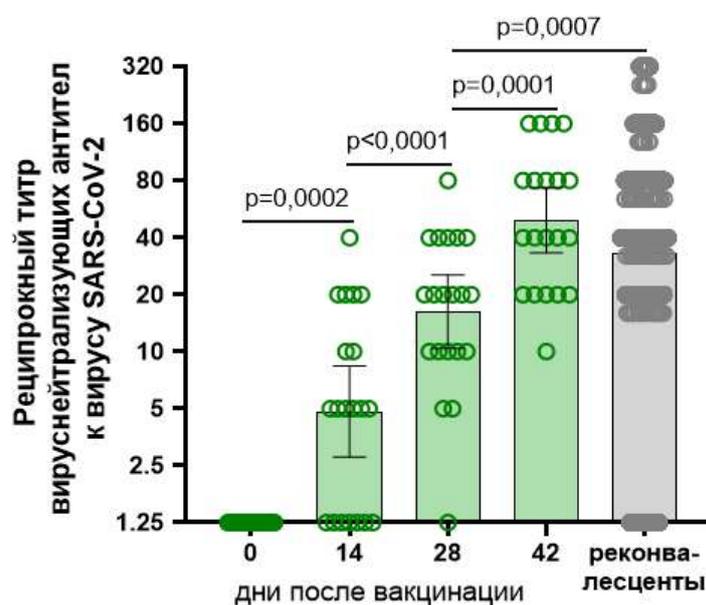


Рисунок 48 – Титры ВНА к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак» и реконвалесцентов. Столбцы представляют собой СГТ для каждой группы с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

По результатам проведенного анализа было показано, что после иммунизации компонентом I вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на 14-й день происходит достоверное повышение уровня ВНА к вирусу SARS-CoV-2 у 65% добровольцев ($n=13$ из 20) ($p=0,0002$) (СГТ=1:4,83). После введения бустерирующего компонента II вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на 28-й день уровень сероконверсии составил 95% ($n=19$ из 20) ($p<0,0001$), на 42-й день – 100% ($n=20$)

($p < 0,0001$). Прирост СГТ ВНА в данной временной точке составил в 3,36 раза (СГТ=1:16,25), к 42-му дню СГТ=1:49,25.

Важно отметить, что у реконвалесцентов ($n=4816$), перенесших COVID-19 в легкой и средней форме, в сыворотке крови детектируются ВНА к вирусу SARS-CoV-2 со средним геометрическим титром 1:32,96. При сравнении титров ВНА у вакцинированных добровольцев на 42-й день с титрами ВНА у реконвалесцентов после COVID-19 не было обнаружено достоверной разницы в уровне ВНА ($p=0,5022$, критерий Манна-Уитни).

Таким образом, введение вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст позволяет индуцировать выработку ВНА у 95% добровольцев через 7 дней после бустерирующей иммунизации (28-й день от начала иммунизации) и у 100% через 21 день после введения второго компонента (42-й день от начала иммунизации). Через 21 день после бустерирующей иммунизации у добровольцев в сыворотке крови детектируются ВНА на уровне, который детектируется у реконвалесцентов через месяц после перенесенной коронавирусной инфекции COVID-19 в легкой и средней форме, что свидетельствует о высокой эффективности вакцины.

Кроме того, проводили исследование корреляции между титром IgG-специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 и ВНА к векторам Ад26 и Ад5. Сыворотку крови добровольцев, полученную до начала иммунизации (0-й день), тестировали на наличие ВНА к Ад26 и Ад5. Результаты исследования титров ВНА к аденовирусным векторам 26 и 5 серотипов представлены на рисунке 49.

По результатам проведенного исследования показано, что ВНА к Ад26 детектируются у 10% добровольцев ($n=2$ из 20), а к Ад5 – у 35% ($n=7$ из 20). Значение титра не превышает 1:200.

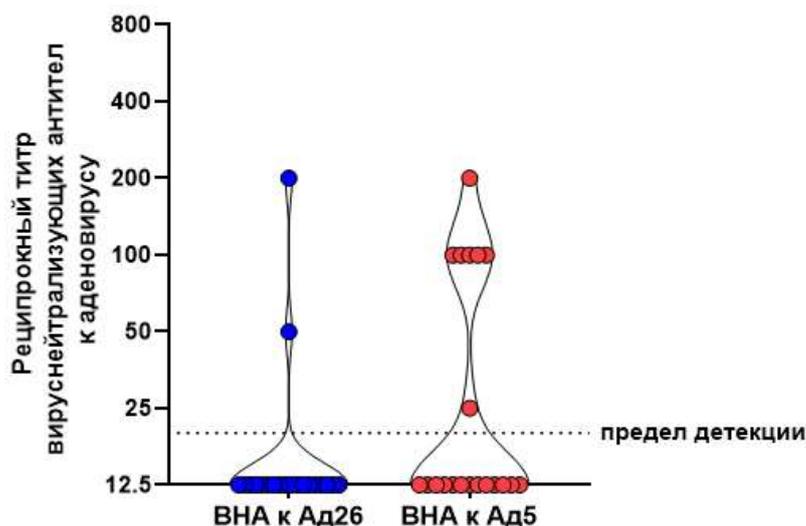


Рисунок 49 – Титры ВНА к аденовирусным векторам 26 и 5 серотипов у добровольцев до вакцинации (0-й день).

Для определения корреляции между титром IgG-специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 и ВНА к Ад26 и Ад5 был проведен анализ данных на нормальность. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Тест на нормальность распределения данных по методу Д'Агостино-Пирсона

вакцина «Гам-КОВИД-Вак»	ВНА		RBD-специфические IgG			
	Ад26	Ад5	14 день	21 день	28 день	42 день
К2	47,51	9,859	11,94	3,796	10,52	3,332
Уровень значимости p	<0,0001	0,0072	0,0026	0,1499	0,0052	0,1890
Прошел тест на нормальность ($\alpha=0.05$)?	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Да
Количество анализируемых образцов	20	20	20	20	20	20

Поскольку оба пула данных, характеризующих наличие ВНА к рекомбинантным аденовирусам, не прошли тест на нормальность, дальнейший корреляционный анализ проводили по методу Спирмена.

В таблице 12 представлены коэффициенты корреляции Спирмена и уровни значимости для попарных сравнений исследуемых данных: титра ВНА к аденовирусным векторам и уровня иммунного ответа на вакцинный антиген.

Таблица 12 – Результаты корреляционного анализа между титром ВНА к аденовирусным векторам на 0 день и титром RBD-специфических IgG в сыворотке крови добровольцев

	RBD-специфические IgG							
	14 день		21 день		28 день		42 день	
	г	р	г	р	г	р	г	р
ВНА к Ад26	0,07	0,77	0,36	0,11	0,23	0,33	0,04	0,87
ВНА к Ад5	-0,2	0,39	-0,01	0,96	-0,11	0,65	-0,38	0,1

По результатам проведенного исследования показано отсутствие достоверной корреляции между титром ВНА к аденовирусным векторам и титром RBD-специфических IgG на 14-й, 21-й и 28-й дни после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

Таким образом, резюмируя полученные данные, можно заключить, что иммунизация в режиме прайм-буст вакциной «Гам-КОВИД-Вак» способна сформировать напряженный антиген-специфический гуморальный иммунный ответ.

б) Определение поствакцинального клеточного иммунитета

Исследование поствакцинального клеточного иммунного ответа включало определение процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови и прироста концентрации ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов после введения исследуемых компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по сравнению с исходными уровнями.

Динамика развития поствакцинального клеточного иммунного ответа у добровольцев после иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак» по проценту

пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов на 0-й (до иммунизации), 14-й и 28-й дни исследования, представлена на рисунке 50.

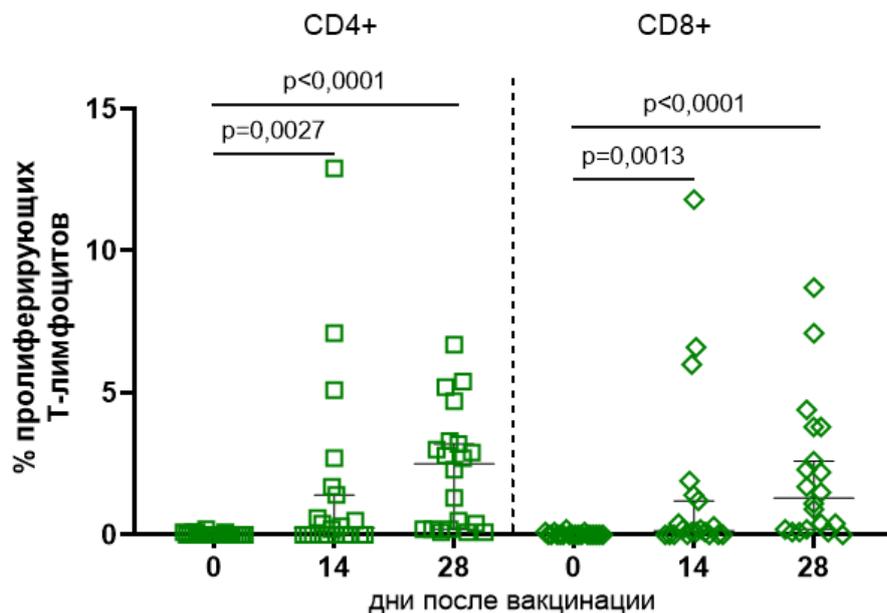


Рисунок 50 – Процент пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов на 0-й день (до иммунизации), 14-й и 28-й дни после иммунизации добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

Стоит отметить, что у пяти добровольцев были обнаружены предсуществующие вирус-специфические CD4+ Т-лимфоциты и у четырех добровольцев были обнаружены предсуществующие вирус-специфические CD8+ Т-лимфоциты при низкой медиане (0%).

Рост напряженности клеточного иммунитета у добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак», согласно медиане значений пролиферирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, отмечается с увеличением дней после иммунизации. Наблюдается статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов через 14 ($p=0,0027$ и $p=0,0013$) и 28 дней после проведенной вакцинации ($p < 0,0001$). На 14 день после иммунизации у 55% ($n=11$ из 20) отмечено увеличение процента пролиферирующих CD4+, и у 65% ($n=13$ из 20) CD8+ Т-лимфоцитов. Медианы

значений процентов пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов составляют 0,25% (95% ДИ: 0-1,4) и 0,15% (95% ДИ: 0-1,2) соответственно. Через 28 дней после иммунизации (через 7 дней после введения бустирующей дозы) у 85% (n=17 из 20) добровольцев отмечено значительное увеличение процента пролиферирующих CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцитов и у 90% (n=18 из 20) обеих популяций исследуемых Т-клеток. Так, медиана значений на 28-й день после иммунизации для CD4⁺ Т-лимфоцитов равна 2,5% (95% ДИ: 0,2-3,2), для CD8⁺ Т-лимфоцитов – 1,3% (95% ДИ: 0,2-2,6).

На основании полученных данных можно отметить, что иммунизация вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст формирует выраженный лимфопролиферативный ответ как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Кроме того, развитие поствакцинального клеточного иммунного ответа дополнительно оценивали по продукции маркерного цитокина ИФН γ *in vitro*.

Динамика развития поствакцинального клеточного иммунного ответа у добровольцев после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по приросту концентрации ИФН γ мононуклеарными клетками периферической крови после антигенной рестимуляции на 0-й (до иммунизации), 14-й и 28-й дни исследования, представлена на рисунке 51.

При анализе данных показатели продукции ИФН γ в целом совпадали с данными пролиферативного иммунного ответа. Так, введение добровольцам вакцины «Гам-КОВИД-Вак» активно стимулировало продукцию ИФН γ *in vitro*. Через 14 дней после иммунизации компонентом I у 80% добровольцев (n=16 из 20) детектировали прирост концентрации ИФН γ , медиана составляет 4,47 (95% ДИ: 2,93-7,59) по сравнению с 0-м днем - 1,04 (95% ДИ: 0,94-1,12). Статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ через 14 дней после иммунизации составила $p < 0,0001$. После введения бустирующего компонента II на 28-й день исследования у 90% добровольцев (n=18 из 20) детектировали прирост концентрации ИФН γ . Медиана значений составила 12,72 (95% ДИ: 5,39-41,94). Между 0-м и 28-м днями исследования также наблюдается

статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ – $p < 0,0001$.

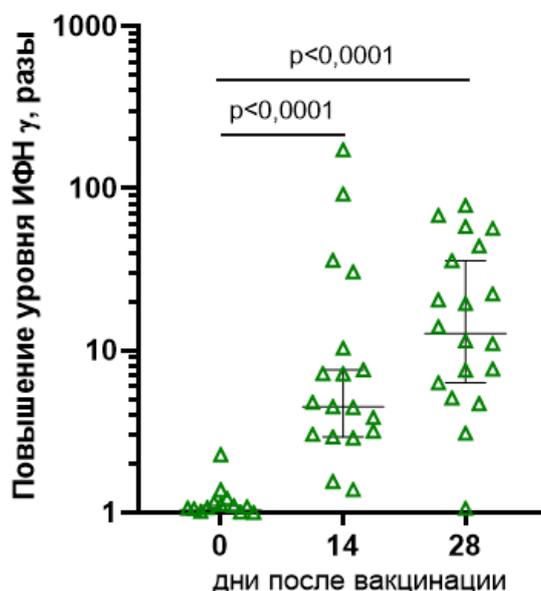


Рисунок 51 – Прирост концентрации ИФН γ (в разях) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев после иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

На основании полученных данных (как по показателям лимфопролиферативного ответа, так и по приросту концентрации ИФН γ) можно сделать вывод о том, что иммунизация вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст способна сформировать напряженный поствакцинальный клеточный антиген-специфический иммунный ответ.

в) Сравнительный анализ поствакцинального иммунного ответа

Суммарные данные по индивидуальным показателям гуморального и клеточного иммунного ответа на 28-й день исследования у иммунизированных добровольцев представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Индивидуальные показатели гуморального и клеточного иммунного ответа у добровольцев

№ добровольца	Гуморальный иммунный ответ		Клеточный иммунный ответ			Любой ответ
	IgG	ВНА	CD4+	CD8+	ИФН γ	
02-КОВИД-024	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-026	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-027	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-029	+	+	+		+	+
02-КОВИД-030	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-031	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-033	+	+	+	+		+
02-КОВИД-034	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-035	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-036	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-039	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-040	+	+		+	+	+
02-КОВИД-043	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-047	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-050	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-051	+	+	+	+		+
02-КОВИД-052	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-055	+	+	+	+	+	+
02-КОВИД-056	+	+			+	+
02-КОВИД-058	+	+			+	+
Итого	100%	100%	85%	85%	90%	100%

Все добровольцы (100%) ответили на вакцинацию в режиме прайм-буст тем или иным типом иммунного ответа, что указывает на высокую иммуногенность вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

По результатам проведенного клинического исследования вакцина «Гам-КОВИД-Вак» показала свою безопасность и высокую иммуногенность и получила временную регистрацию 11 августа 2020 года в рамках действующего постановления Правительства РФ №441 (регистрационный номер ЛП-006395).

3.3.2 Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» при участии добровольцев в возрастной группе старше 60 лет

У пожилых людей, особенно обремененных сопутствующими заболеваниями, коронавирусная инфекция протекала тяжело, с высоким количеством осложнений и высокой летальностью, что однозначно выделяет пожилых людей в группу высокого риска. Для расширения показаний вакцины «Гам-КОВИД-Вак» с целью использования в группе пациентов старше 60 лет было проведено клиническое исследование с участием добровольцев старшей возрастной группы. В его рамках была проведена не только оценка безопасности и иммуногенности вакцины, но и углубленный анализ влияния препарата на иммунную систему пожилых добровольцев.

Исследование проводили с 22 октября 2020 г. по 24 мая 2021 г. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ на 110 здоровых добровольцах в возрасте старше 60 лет включительно. Промежуточный анализ результатов и внесение изменений в регистрационное досье были проведены по данным на 28-й день наблюдения (10 декабря 2020 года). Наблюдение было продолжено до 180-го дня.

Всего в исследование включено 132 добровольца, по результатам скрининга рандомизировано в исследование 110 добровольцев. Один доброволец выбыл до введения компонента I вследствие обнаружения положительного результата ПЦР-анализа на РНК SARS-CoV-2, соответственно, 109 добровольцев начали исследуемую терапию. Еще один доброволец получил компонент I вакцины, но

выбыл до введения компонента II (так как заразился COVID-19). Соответственно, оба компонента вакцины получили 108 добровольцев.

В исследование безопасности были включены 109 добровольцев. Переносимость оценивали по показателям местных (область места введения препарата) и общих (системные реакции организма на введение препарата) реакций. Оценку местных реакций проводили в течение всего периода наблюдения. Безопасность оценивали на основании регистрации НЯ в ходе исследования. Также оценивались изменения инструментальных (ЭКГ) и лабораторных показателей (клинический и биохимический анализ крови, общий анализ мочи), динамика жизненных показателей (АД, ЧСС, температура тела).

В изучение иммунологической эффективности также были включены 108 добровольцев, получившие оба компонента вакцины. Для оценки иммуногенности использовали методологический подход на основе сравнения показателей напряженности иммунитета со значениями показателей до введения исследуемого препарата. К показателям напряженности гуморального иммунного ответа относились: уровень сероконверсии, средние геометрические титры антител, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, титры нейтрализующих антител. Показатели напряженности клеточного иммунного ответа определяли по проценту пролиферирующих Т-лимфоцитов и приросту ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов.

3.3.2.1 Оценка безопасности и переносимости вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

Согласно протоколу, 110 добровольцев из 132 прошедших скрининг были включены в исследование. Один доброволец выбыл до введения компонента I. Оба компонента вакцины (согласно протоколу) получили 108 добровольцев, и один доброволец получил только первый компонент вакцины, он выбыл до введения компонента II (т.к. заразился COVID-19).

В этом исследовании участвовали 56 (51,4%) мужчин и 53 (48,6%) женщины, 107 добровольцев европеоидной расы и 2 – монголоидной. Средний

возраст $68,2 \pm 5,96$ лет, диапазон возраста от 60 до 85 лет. Индекс массы тела $28,4 \pm 4,11$ кг/м².

Значимые заболевания в анамнезе присутствовали почти у 106 (97,2%) добровольцев, что ожидаемо для данной возрастной категории людей. При физикальном осмотре на скрининге патология выявлялась у части добровольцев со стороны сердечно-сосудистой системы, пищеварительной системы, органов чувств/нервной системы, мочеполовой, эндокринной систем. Однако в большинстве случаев патология не расценивалась как клинически значимая (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты физикального обследования добровольцев на скрининге

Система	Патология / Популяция для анализа (n=109)	Клинически значимо
Сердечно-сосудистая система	да / 19 (17,4%)	нет
Сердечно-сосудистая система	нет / 109 (100%)	-
Кожные покровы и видимые слизистые	нет / 109 (100%)	-
Дыхательная система	нет / 109 (100%)	-
Пищеварительная система	да / 1 (0,9%)	нет
Опорно-двигательный аппарат	да / 5 (4,6%)	нет
Органы чувств и неврологический статус	да / 2 (1,8%)	нет
Мочеполовая система	да / 1 (1,09%)	нет
Эндокринная система	да / 10 (9,2%)	нет
Иммунная система	нет / 109 (100%)	-

Прием какой-либо лекарственной терапии за 30 дней до скрининга был у 74 (67,9%) добровольцев. Прием предшествующей (за 30 дней до скрининга) и сопутствующей (в ходе исследования) терапии был у 91 (83,5%) добровольца.

Всего в ходе исследования было зарегистрировано 55 НЯ у 29 (26,61%) добровольцев: 53 НЯ были легкой степени тяжести и 2 НЯ расценивались как

средней степени тяжести (фибрилляция предсердий и коронавирусная инфекция COVID-19). Случаи СНЯ средней степени тяжести были не связаны с исследуемым препаратом, разрешились выздоровлением, не требовали досрочного прекращения приема исследуемого препарата или выведения добровольца из исследования. Завершились выздоровлением без последствий 47 НЯ из 55, в процессе выздоровления на момент окончания исследования были 6 НЯ. Для 1 НЯ исход был «выздоровление с последствиями» («тахикардия»), и для одного НЯ исход был неизвестен.

Коррекция НЯ не применялась для 29 НЯ у 14 (12,84%) добровольцев, применялась для 23 НЯ у 17 (15,60%) добровольцев. Для остальных 3 НЯ было указано «не применимо».

Обобщенные данные по количеству нежелательных явлений (местные и системные реакции) после вакцинации представлены на рисунке 52.

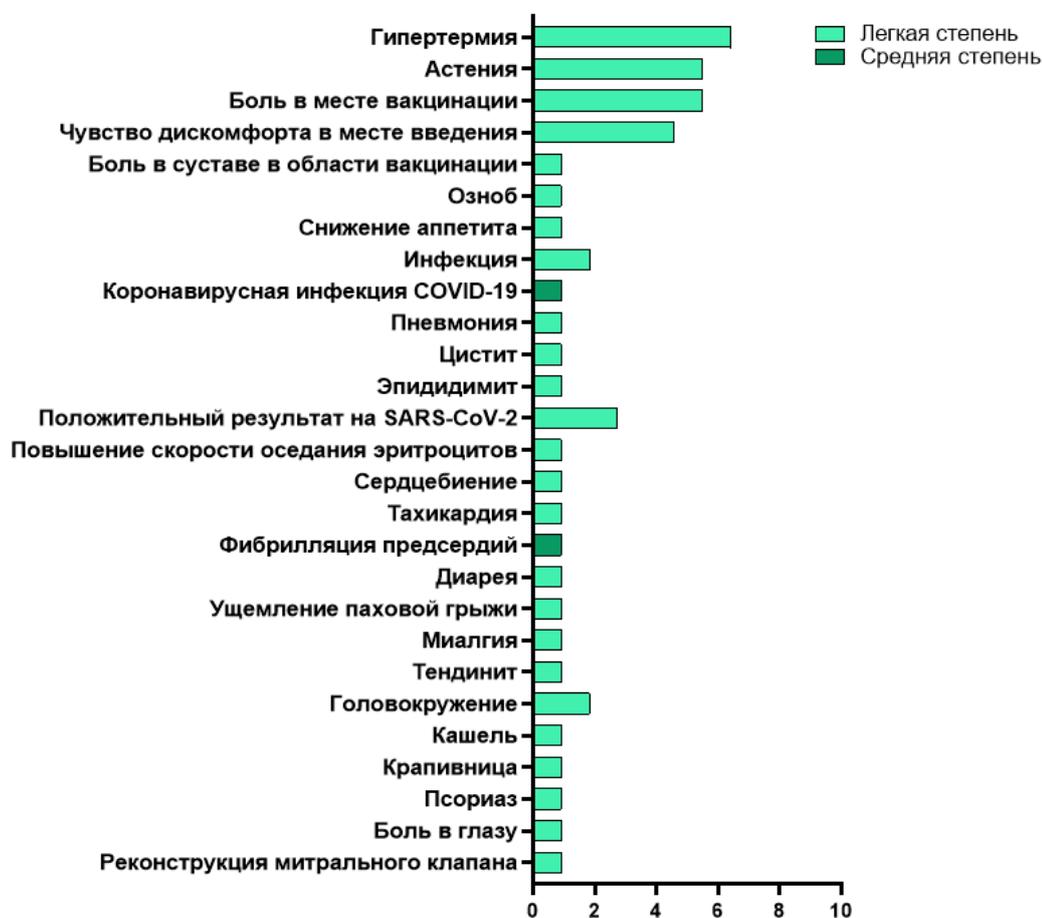


Рисунок 52 – Количество (%) нежелательных явлений (местные и системные реакции) после вакцинации.

Наиболее часто отмечались НЯ категории системно-органного класса словаря MedDRA «Общие нарушения и реакции в месте введения»: 30 НЯ у 16 (14,68%) добровольцев. Менее частыми были НЯ категории «Инфекции и инвазии»: 6 НЯ у 6 (5,50%) добровольцев. Следующими по частоте следовали НЯ категорий «Лабораторные и инструментальные данные» (4 НЯ у 4 (3,67%) добровольцев), «Нарушения со стороны сердца» (4 НЯ у 3 (2,75%) добровольцев). Также зарегистрированы 2 НЯ у 2 (1,83%) добровольцев в каждой из следующих категорий: «Желудочно-кишечные нарушения», «Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани», «Нарушения со стороны нервной системы». Остальные категории системно-органного класса MedDRA встречались с частотой 1 НЯ у одного (0,92%) добровольца. Аллергические реакции на исследуемый препарат не отмечались. Был один случай крапивницы, связь с применением вакцины для которого расценивалась как сомнительная.

Средние значения основных показателей жизнедеятельности добровольцев (температура тела, систолическое и диастолическое АД, ЧСС, ЧДД), полученные на визитах согласно графику процедур протокола, существенно не изменялись. Отдельные случаи повышения температуры тела регистрировались как соответствующие НЯ. В целом можно сказать, что выявленные в ходе исследования нежелательные явления характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов.

3.3.2.2 Оценка иммунологической эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

а) Определение поствакцинального гуморального иммунного ответа

Исследование гуморального иммунного ответа включало определение титра IgG специфических антител к RBD-домену белка S вируса SARS-CoV-2, нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2, а также ВНА к аденовирусным векторам.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст

по титрам IgG антител, специфичных к RBD-домену белка S вируса SARS-CoV-2, представлена на рисунке 53.

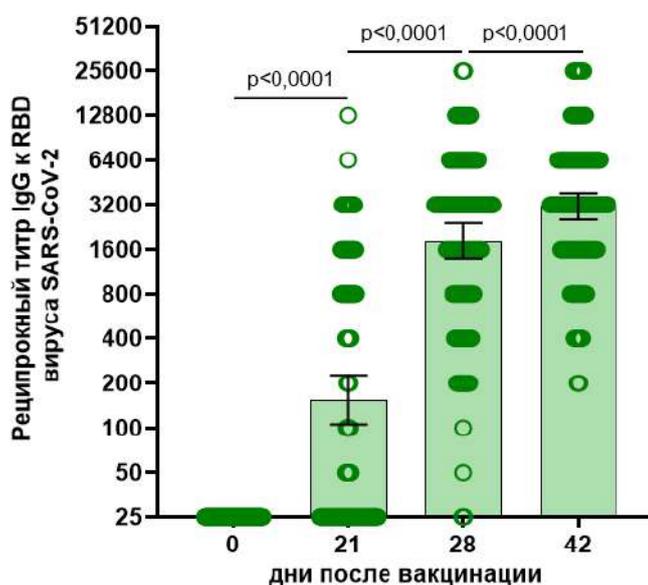


Рисунок 53 – Изменение титров IgG антител, специфичных к RBD-домену S белка вируса SARS-CoV-2 после иммунизации добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ для каждой группы с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по T -критерию Вилкоксона.

В ответ на иммунизацию добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак» наблюдали достоверное повышение уровня RBD-специфичных IgG антител с увеличением дней после иммунизации.

Уровень сероконверсии после введения компонента I на 21-й день исследования составил 53,2% ($n=56$ из 108). На 28-й день исследования сероконверсия наблюдалась у 97,1% добровольцев ($n=100$ из 103). На 42-й день исследования сероконверсия составила 100% ($n=104$ из 104). Увеличение титров специфических IgG антител было статистически значимым уже после введения первого компонента. На 21-й день СГТ=1:154,7 ($p < 0,0001$). Введение компонента II через 7 дней (28-й день исследования) привело к повышению титра специфических IgG антител (СГТ=1:1831) в 11 раз. СГТ к 42-му дню составил

1:3116, что указывает на продолжающееся развитие иммунных ответов после вакцинации.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по титрам нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2, представлена на рисунке 54.

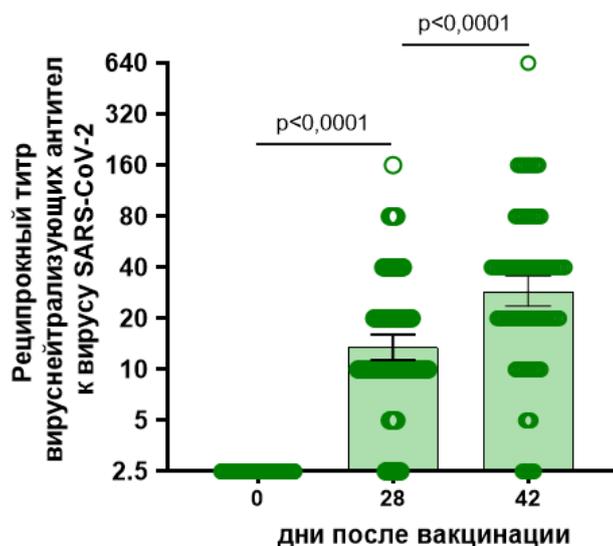


Рисунок 54 – Титры ВНА к вирусу SARS-CoV-2 после иммунизации добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы представляют собой СГТ для каждой группы с 95% ДИ. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

По результатам проведенного анализа было показано, что после иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак» на 28-й день происходит достоверное повышение уровня ВНА к вирусу SARS-CoV-2 у 90,2% добровольцев ($n=92$ из 102) (СГТ=1:12,6). На 42-й день – у 94,3% ($n=99$ из 105) (СГТ=1:27,821).

Кроме того, проводили исследование корреляции между титром IgG-специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 и ВНА к векторам Ад26 и Ад5. Сыворотку крови добровольцев, полученную до начала иммунизации (0-й день), тестировали на наличие ВНА к Ад26 и Ад5 (рисунке 55).

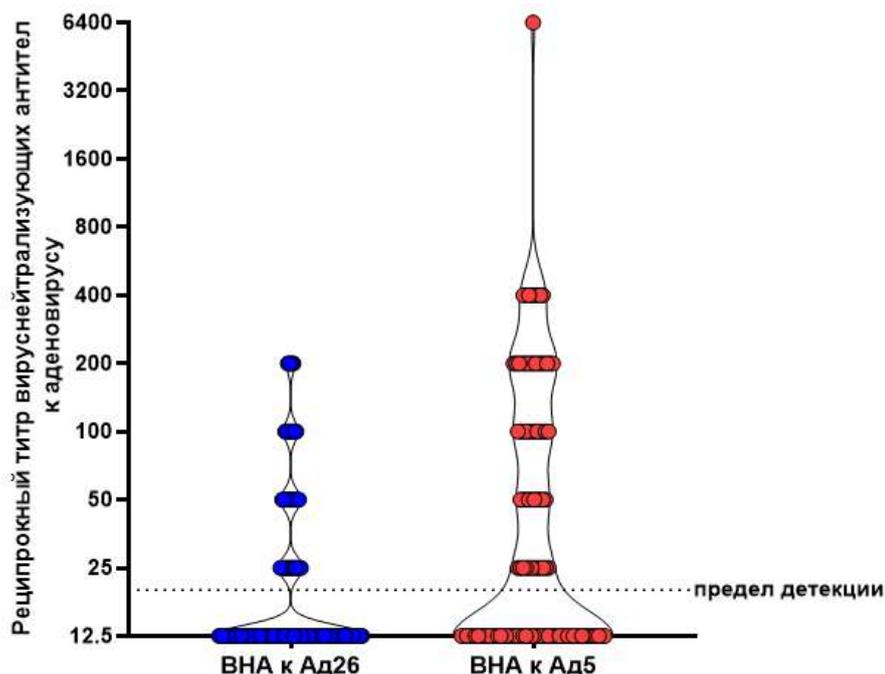


Рисунок 55 – Титры ВНА к аденовирусным векторам 26 и 5 серотипов у добровольцев до вакцинации (0-й день).

По результатам проведенного исследования было показано, что ВНА к Ад26 детектируются у 30% добровольцев ($n=33$ из 110), а к Ад5 – у 52,7% ($n=58$ из 110). При этом ВНА только к Ад26 детектируются у 12,73% добровольцев ($n=14$ из 110), ВНА только к Ад5 – у 35,45% добровольцев ($n=39$ из 110), ВНА к Ад26 и Ад5 детектируются у 17,27% добровольцев ($n=19$ из 110). Значение титра ВНА к Ад26 не превышает 1:200, СГТ=1:19,31. Только у одного добровольца ВНА к Ад5 детектировались на высоком уровне (1:6400), при этом СГТ составил 1:38,13.

Для определения корреляции между титром IgG-специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 и ВНА к Ад26 и Ад5 был проведен анализ данных на нормальность (таблица 15).

Поскольку оба пула данных, характеризующих наличие ВНА к рекомбинантным аденовирусным частицам, не прошли тест на нормальность, дальнейший корреляционный анализ проводили по методу Спирмена.

Таблица 15 – Тест на нормальность распределения данных по методу Д'Агостино-Пирсона

вакцина «Гам-КОВИД-Вак»	ВНА		RBD-специфические IgG		
	Ад26	Ад5	21 день	28 день	42 день
К2	93,08	231,5	134,3	78,54	63,95
Уровень значимости p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Прошел тест на нормальность ($\alpha=0.05$)?	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Количество анализируемых образцов	110	110	108	103	104

В таблице 16 приведены данные коэффициента корреляции Спирмена и уровни значимости при попарном сравнении исследуемых пулов данных: титров ВНА к векторам и уровней иммунного ответа на вакцинный антиген.

Таблица 16 – Результаты корреляционного анализа между титром ВНА к аденовирусным векторам на 0-й день и титром RBD-специфических IgG в сыворотке крови добровольцев на 21-й, 28-й и 42-й дни после вакцинации

	RBD-специфические IgG					
	21 день		28 день		42 день	
	г	p	г	p	г	p
ВНА к Ад26	-0,02038	0,8342	-0,001704	0,9864	-0,02484	0,8024
ВНА к Ад5	0,1621	0,0937	-0,07395	0,4579	-0,1179	0,2333

По результатам проведенного исследования показано отсутствие достоверной корреляции между титром ВНА к аденовирусным векторам и титром RBD-специфических IgG на 21-й, 28-й и 42-й дни после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

Таким образом, резюмируя полученные данные, можно заключить, что иммунизация в режиме прайм-буст вакциной «Гам-КОВИД-Вак» способна сформировать гуморальный антиген-специфический иммунный ответ.

б) *Определение поствакцинального клеточного иммунитета*

Исследование поствакцинального клеточного иммунного ответа включало определение процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и прироста концентрации ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов на 28-й день после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

Динамика развития поствакцинального клеточного иммунного ответа у добровольцев (n=30) возрастной группы старше 60 лет после иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак» по проценту пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов на 0-й (до иммунизации) и 28-й дни исследования представлена на рисунке 56.

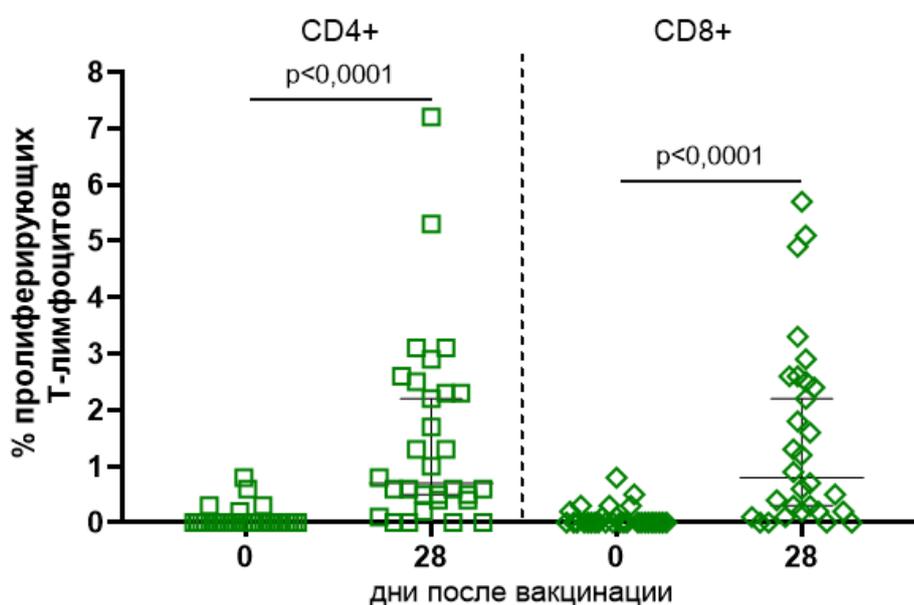


Рисунок 56 – Процент пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов на 0-й день (до иммунизации) и 28-й день после иммунизации добровольцев возрастной группы старше 60 лет вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по T -критерию Вилкоксона.

Стоит отметить, что у пяти участников исследования были выявлены существовавшие ранее CD4⁺ Т-лимфоциты, специфичные к вирусу, а у восьми -

CD8⁺ Т-лимфоциты с аналогичной специфичностью, при этом медианное значение составило 0% (рисунок 55, день 0).

Наблюдается статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов через 28 дней после проведенной вакцинации ($p < 0,0001$). На 28-й день после иммунизации у 83,33% ($n=25$ из 30) отмечено увеличение процента пролиферирующих CD4⁺ и у 80% ($n=24$ из 30) CD8⁺ Т-лимфоцитов. Медианы значений процентов пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов составляют 0,7% (95% ДИ: 0,5-2,2) и 0,8% (95% ДИ: 0,3-2,2), соответственно.

На основании полученных данных можно отметить, что иммунизация вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст формирует выраженный лимфопрлиферативный ответ как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Кроме того, развитие поствакцинального клеточного иммунного ответа дополнительно оценивали по продукции маркерного цитокина ИФН γ *in vitro*.

Динамика развития поствакцинального клеточного иммунного ответа у добровольцев возрастной группы старше 60 лет после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по приросту концентрации ИФН γ мононуклеарными клетками периферической крови после антигенной рестимуляции на 0-й (до иммунизации) и 28-й дни исследования представлена на рисунке 56.

При анализе данных показатели продукции ИФН γ в целом совпадали с данными пролиферативного иммунного ответа. Так, введение добровольцам вакцины «Гам-КОВИД-Вак» активно стимулировало продукцию ИФН γ *in vitro*. Через 28 дней после иммунизации у 76,67% добровольцев ($n=23$ из 30) наблюдался прирост концентрации ИФН γ , медиана составляет 4,04 (95% ДИ: 2,106-6,802) по сравнению с 0-м днем – 1,00 (95% ДИ: 1,00-1,00). Статистически достоверная разница в значениях прироста концентрации ИФН γ через 28 дней после иммунизации составила $p < 0,0002$.

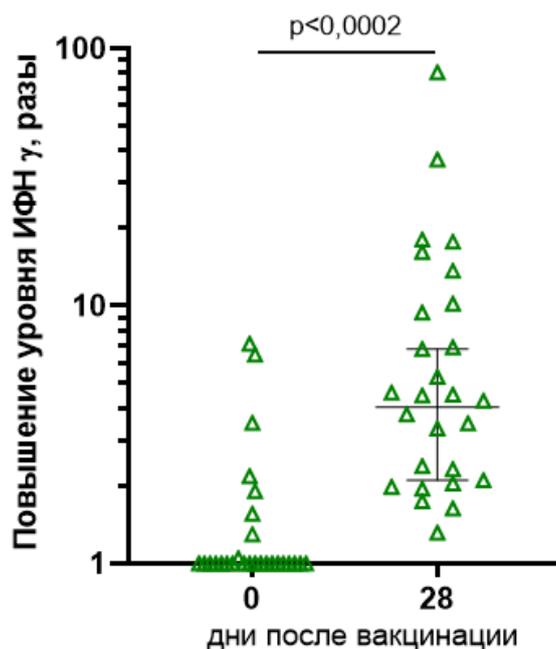


Рисунок 56 – Прирост концентрации ИФН γ (в разях) в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови добровольцев старше 60 лет. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

На основании полученных данных (как по показателям лимфопролиферативного ответа, так и по приросту концентрации ИФН γ) можно сделать вывод о том, что иммунизация вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст способна сформировать поствакцинальный клеточный антиген-специфический иммунный ответ у лиц старшей возрастной группы.

в) Сравнительный анализ поствакцинального иммунного ответа

Суммарные данные по индивидуальным показателям иммунного ответа на 28-й день исследования у иммунизированных добровольцев возрастной группы старше 60 лет представлены в таблице 17.

Все добровольцы (100%) ответили на иммунизацию в режиме прайм-буст тем или иным типом иммунного ответа, что указывает на высокую иммуногенность вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

Таблица 17 – Индивидуальные показатели иммунного ответа у добровольцев возрастной группы старше 60 лет, иммунизированных компонентом I или компонентом II вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

№ добровольца	Гуморальный иммунный ответ		Клеточный иммунный ответ			Любой ответ
	IgG	ВНА	CD4+	CD8+	ИФН γ	
80	+	+	+	+		+
81	+	+	+	+		+
82	+	+	+			+
83	+	+	+	+	+	+
84	+	+	+	+	+	+
85	+	+	+	+		+
87	+	+	+	+	+	+
88	+	+	+	+	+	+
89	+	+			+	+
90	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+		+	+
92	+	+	+	+	+	+
93	+	+	+	+	+	+
94	+	+			+	+
96	+	+	+	+	+	+
98	+	+	+	+	+	+
99	+	+	+	+	+	+
100	+	+			+	+
101	+		+	+		+
102	+	+			+	+
103	+	+	+	+	+	+
105	+	+	+	+	+	+
106	+	+		+	+	+
108	+	+	+	+		+
114	+	+	+	+	+	+

№ добровольца	Гуморальный иммунный ответ		Клеточный иммунный ответ			Любой ответ
	IgG	ВНА	CD4+	CD8+	ИФН γ	
116	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+		+
121	+		+	+	+	+
126	+	+	+	+	+	+
127	+	+	+	+	+	+
Итого	100%	93,33%	83,33%	80%	76,67%	100%

По результатам проведенного исследования показатели гуморального иммунного ответа у добровольцев старше 60 лет сопоставимы с иммунологическими показателями добровольцев 18–60 лет (формируется как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ). Анализ полученных данных позволил сделать заключение о приемлемом соотношении (польза / риск), внести изменения в инструкцию по применению вакцины и использовать ее без ограничения возраста в рамках гражданского оборота.

3.3.3 Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое клиническое исследование эффективности, иммуногенности и безопасности комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в параллельных группах в профилактике коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2

Исследование проводилось с 7 сентября 2020 г. по 16 ноября 2021 г. на базе 25 исследовательских центров г. Москвы на взрослых добровольцах обоих полов в возрасте от 18 до 92 лет с целью оценки эффективности, иммуногенности и безопасности применения вакцины «Гам-КОВИД-Вак». В исследовании было скринировано 66 565 субъектов, 33 864 из которых (50,9 %) соответствовали всем критериям включения/невключения и успешно завершили все скрининговые процедуры, были распределены в две группы в соотношении 3:1 - в группу

исследования (вакцина) (с применением вакцины «Гам-КОВИД-Вак») и в группу контроля (плацебо) (с применением плацебо). Особенностью данного исследования была рандомизация субъектов в пять возрастных страт: 18-30 лет, 31-40 лет, 41-50 лет, 51-60 лет и старше 60. Средний возраст составил $43,9 \pm 12,1$ лет в группе вакцина и $43,9 \pm 12,0$ лет – в группе плацебо. Было включено 22481 доброволец мужского пола (16811 – в группу вакцина и 5670 – в группу плацебо) и 11380 добровольцев женского пола (8574 – в группу вакцина и 2806 – в группу плацебо). Подавляющее большинство добровольцев было европейской расы (около 97%), 1045 добровольцев были азиатской расы и 111 добровольцев были представителями других рас.

Анализ данных по сопутствующим заболеваниям показал, что у 7414 добровольцев (29,2%) в группе «вакцина» и у 2570 добровольцев (30,3%) в группе плацебо были сопутствующие патологии. Статистически значимых отличий между группами по частоте наличия сопутствующих заболеваний не выявлено ($p = 0,052$).

Для большей части добровольцев обеих групп риск инфицирования оценивался как общий. При этом для 91 добровольца (0,4%) в группе «вакцина» и 28 добровольцев (0,3%) в группе плацебо этот риск оценивался как высокий. Статистически значимых отличий между группами по риску инфицирования не выявлено ($p = 0,929$).

Результаты физикального осмотра на визите скрининга показали наличие 1345 отклонений, 49 из которых были клинически значимыми. Большая часть отклонений приходилась на отклонения сердечно-сосудистой системы (749 из 1204 отклонений или 62,2%). Межгрупповое сравнение этих данных не выявило статистически значимых отличий ($p > 0,05$).

Статистически значимых отличий между группами в распределении добровольцев по демографическим и антропометрическим показателям, сопутствующим заболеваниям и риску инфицирования COVID-19, не выявлено, что свидетельствует о равномерном распределении добровольцев по группам и успешной рандомизации.

Длительность участия в исследовании для одного субъекта составила 180 ± 14 дней после введения первой дозы вакцины или плацебо.

В анализ безопасности вошли 33568 добровольцев (все добровольцы, получившие хотя бы одну дозу вакцины или плацебо). Оценку реактогенности и безопасности проводили на основании физикального осмотра, анализа витальных показателей (артериальное давление, частота сердечных сокращений, температура тела) и регистрации нежелательных явлений.

В анализ иммунологической эффективности, PP-популяция, вошли 29069 добровольцев, которые получили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» или плацебо в режиме прайм-буст. Для оценки иммунологической эффективности использовали показатели гуморального иммунного ответа (уровень сероконверсии, средние геометрические титры антител, специфичных к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2, титры нейтрализующих антител) и показатели клеточного иммунного ответа (процент пролиферирующих Т-лимфоцитов и прирост концентрации ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов после рестимуляции гликопротеином S вируса SARS-CoV-2).

Эпидемиологическую эффективность оценивали на основании отношения шансов (OR). Отношение шансов = (число заболевших в группе вакцины / число незаболевших в группе вакцины) / (число заболевших в группе плацебо / число незаболевших в группе плацебо).

3.3.3.1 Оценка реактогенности и безопасности вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

Одну дозу вакцины получили 33568 добровольцев, вакцинацию по полной схеме без значимых отклонений от протокола прошли 29069 добровольцев. Всего в ходе проведения исследования был зарегистрирован 56521 эпизод НЯ, развившийся у 20809 добровольцев (62,0%) после введения вакцины или плацебо.

Для оценки реактогенности вакцины изучали развитие и выраженность всех НЯ в течение 7-ми дней после каждого введения компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак». Частота возникновения местных и системных реакций,

выявленных в течение 7-ми дней после введения компонента I и компонента II и наблюдаемых не менее чем у 20 субъектов в обеих группах, представлена на рисунке 57.

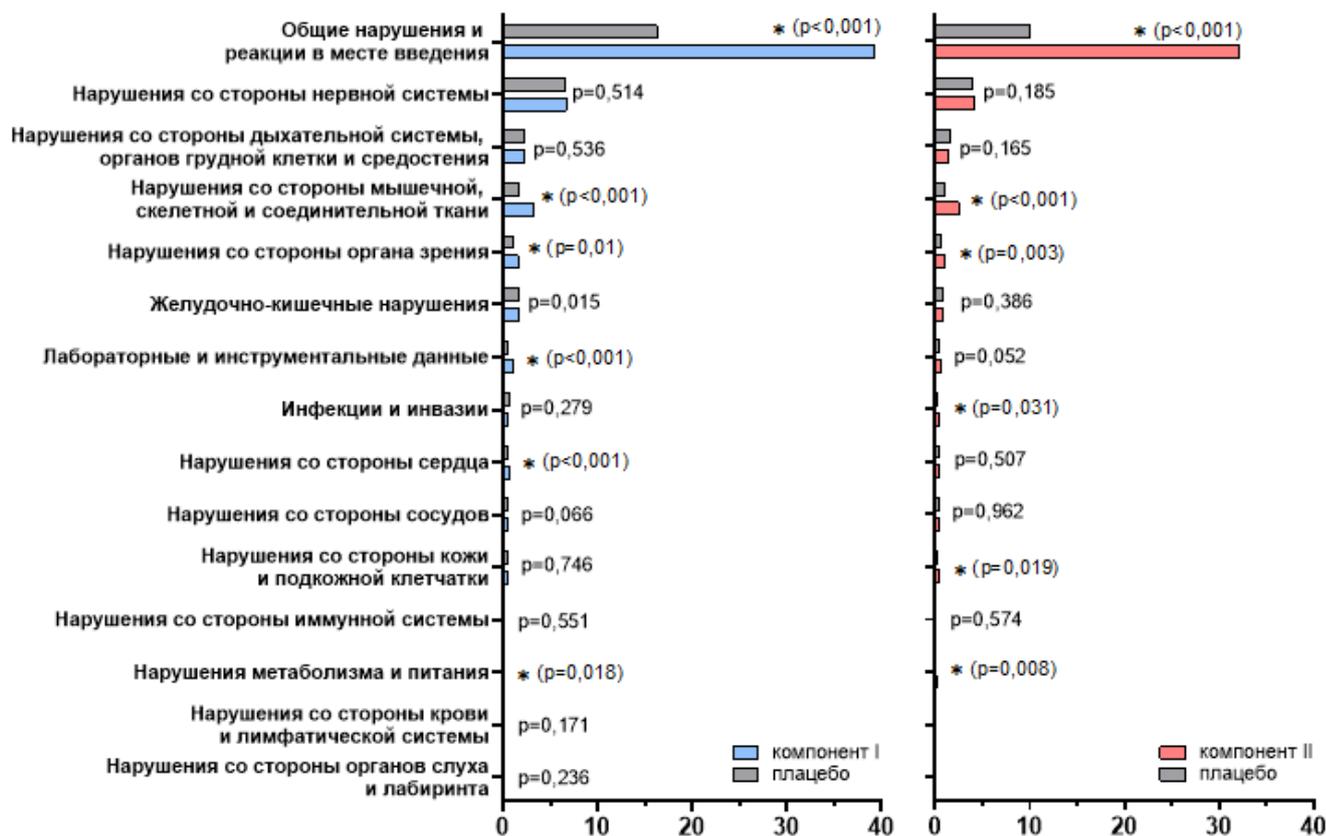


Рисунок 57 – Количество (%) НЯ (местные и системные реакции), выявленных в течение 7-ми дней после введения компонента I и компонента II. * отмечена статистически достоверная разница между группой вакцина и плацебо.

Ожидаемые побочные местные и системные реакции регистрировались как у добровольцев из группы «вакцина», так и из группы плацебо.

Местные реакции наблюдали у 39,3% добровольцев после введения компонента I и у 32,2% добровольцев после введения компонента II. В группе плацебо местные реакции были отмечены у 16,3% участников после первой иммунизации и у 10,1% после второй. Наиболее распространенным системным проявлением, значительно преобладавшим (p<0,001) в группе вакцинированных, был гриппоподобный синдром, зафиксированный у 21,3% после введения

компонента I и у 15,1% после компонента II. У 7% добровольцев, получавших плацебо, также было отмечено гриппоподобное состояние после первого введения и у 4,1% после второго. Повышение температуры тела достоверно чаще ($p < 0,001$) наблюдалось у добровольцев, получивших вакцину: у 3,5% после введения компонента I и у 2,4% после компонента II. В группе плацебо гипертермия регистрировалась у 2,1% после первого и у 1,2% после второго введения.

Достоверно чаще регистрировались миалгия, артралгия, скелетно-мышечная боль, боли в глазу, увеличение частоты сердечных сокращений и снижение аппетита у добровольцев после введения каждого компонента вакцины по сравнению с добровольцами, получившими плацебо.

Большинство НЯ, выявленных в течение 7-ми дней после введения препарата, были легкой степени тяжести. НЯ средней степени, зарегистрированные у добровольцев, получивших вакцину, не имели статистически достоверной разницы по сравнению с группой плацебо.

Для оценки безопасности изучались развитие, выраженность и связь с применением вакцины всех нежелательных явлений в течение всего периода исследования (180 дней). Обобщенные данные по количеству случаев развития нежелательных явлений (местные и системные реакции) после вакцинации, отмечавшиеся у 0,1% или более субъектов, представлены на рисунке 58.

Большинство НЯ были легкой степени тяжести (51,9% в группе «вакцина» и 42,7% в группе плацебо). НЯ средней степени тяжести регистрировались у 13,1%, получивших вакцину и 5,9% добровольцев в группе плацебо. НЯ тяжелой степени были отмечены у 1% в группе «вакцина» и 0,8% в группе плацебо. НЯ очень тяжелой степени были зарегистрированы менее чем у 0,1% субъектов в обеих группах.

Обобщенные данные по количеству случаев развития НЯ (местные и системные реакции) по степени тяжести, отмечавшиеся у 0,1% или более субъектов в исследуемых группах, представлены на рисунке 59.



Рисунок 58 – Количество (%) НЯ (местные и системные реакции) после вакцинации, отмечавшиеся у 0,1% или более субъектов. * отмечена статистически достоверная разница между группой вакцина и плацебо.

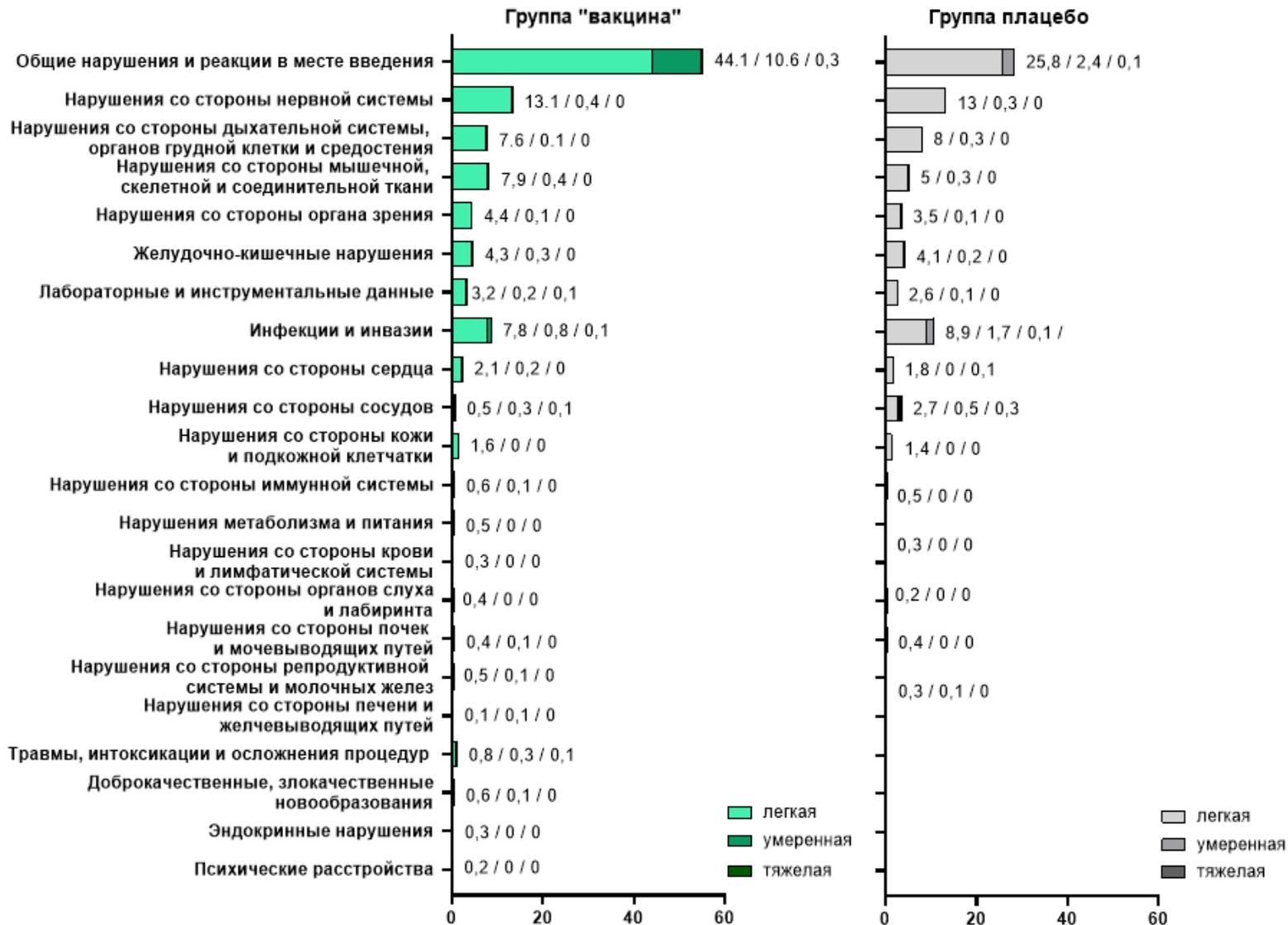


Рисунок 59 – Количество (%) НЯ (местные и системные реакции) по степени тяжести. Значения обозначают количество случаев и степень тяжести: легкая / умеренная / тяжелая.

За время исследования было зафиксировано 545 эпизодов СНЯ: 384 (1,5%) в группе вакцина и 161 (1,9%) в группе плацебо. Ни один из эпизодов СНЯ не имел связи с применением вакцины или плацебо. Разница в частоте развития СНЯ между группами статистически достоверна ($p=0,014$). При этом стоит отметить, что статистически достоверно чаще ($p<0,001$) СНЯ (подозрение на коронавирусную инфекцию COVID-19 и вирусная пневмония) регистрировались в группе плацебо (рисунок 60).

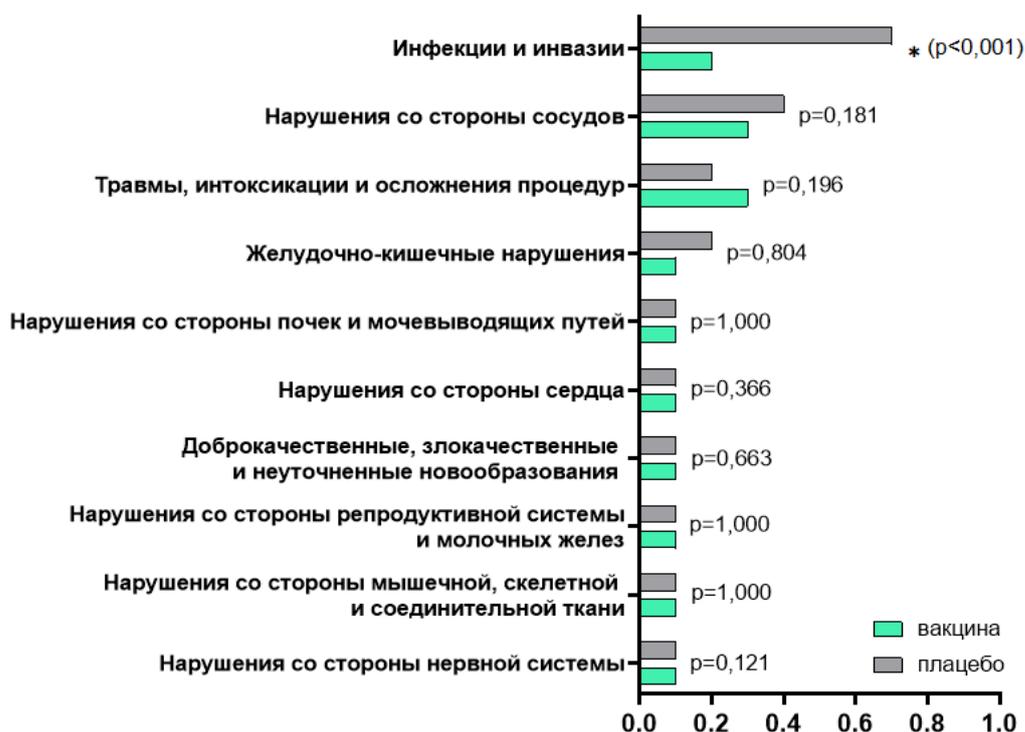


Рисунок 60 – Количество (%) СНЯ (местные и системные реакции) после вакцинации, отмечавшиеся у 0,1% или более субъектов. * отмечена статистически достоверная разница между группой вакцина и плацебо.

За время исследования было зафиксировано 18 серьезных нежелательных явлений с летальным исходом, 10 в группе вакцинированных и 8 в группе, получившей плацебо. Ни один из этих летальных исходов не был обусловлен вакцинацией.

В целом можно сказать, что побочные явления, отмеченные в рамках исследования, типичны для большинства вакцинных препаратов.

3.3.3.2 Оценка иммунологической эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

а) Определение поствакцинального гуморального иммунного ответа

Исследование поствакцинального гуморального иммунного ответа включало определение титра IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 и нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2.

В соответствии с критериями Европейской фармакопеи и рекомендаций ВОЗ по оценке качества, безопасности и эффективности разрабатываемых вакцин против COVID-19, вакцина считается эффективной при достижении уровня сероконверсии в 95% случаев и более.

Оценка титра RBD-специфичных IgG антител после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» или плацебо была проведена у 4681 добровольца на 0-й день, у 4740 – на 42-й день и у 4164 – на 180-й день исследования.

Динамика развития поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст по титрам IgG антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, представлена на рисунке 61.

В ответ на иммунизацию добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак» RBD-специфические IgG антитела определялись у 99% (n=3382 из 3416) добровольцев ($p < 0,0001$) (СГТ=1:9070) на 42-й день после вакцинации. В группе плацебо на 42-й день RBD-специфические IgG антитела определялись у 11,04% (n=124 из 1123) добровольцев. СГТ было минимальным и равно 1:46,74. Через 180 дней (6 месяцев) после вакцинации происходит статистически достоверное ($p < 0,0001$) снижение напряженности поствакцинального иммунитета у добровольцев в группе вакцина (СГТ=1:1729). Уровень сероконверсии составил 94,7% (n=2897 из 3059). При этом в группе плацебо мы, наоборот, детектировали статистически достоверное ($p < 0,0001$) повышение титра специфичных IgG антител (СГТ=1:159,6). Уровень сероконверсии составил 38,24% (n=361 из 994). Рост

титра антител в группе плацебо свидетельствует о заболеваемости добровольцев COVID-19.

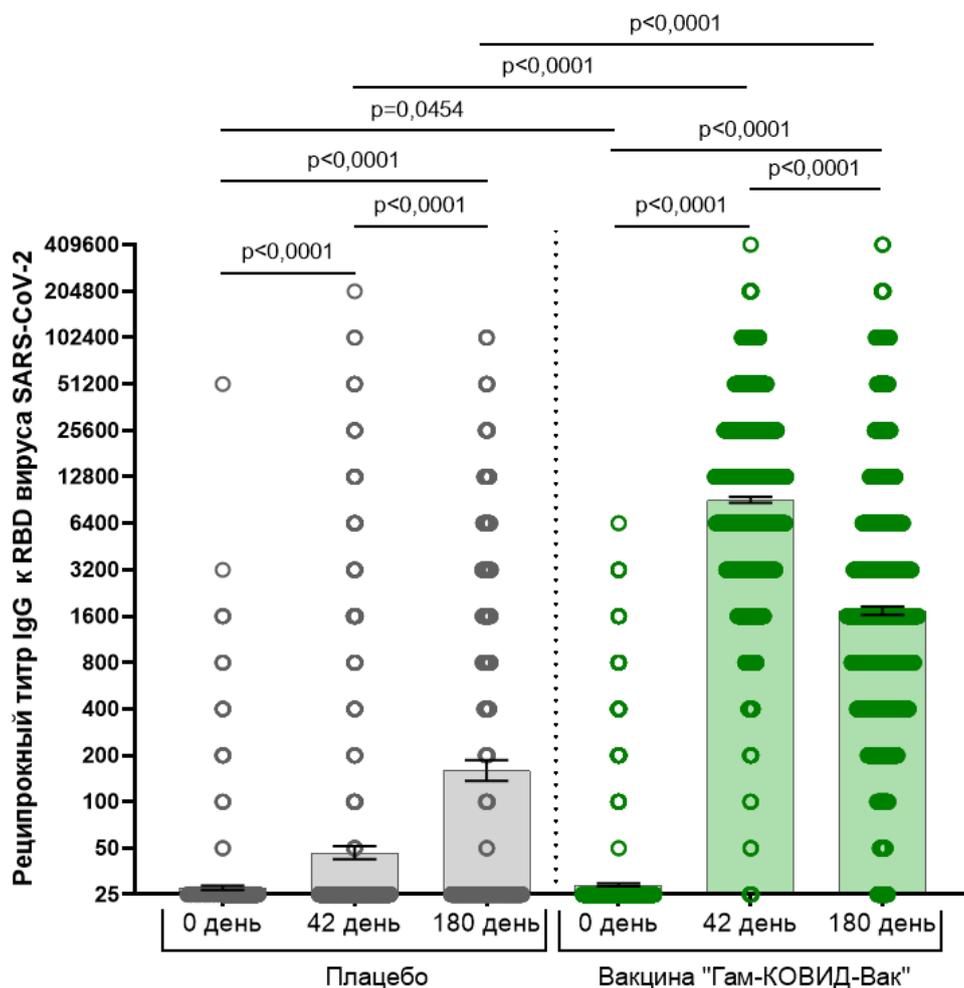


Рисунок 61 – Титры RBD-специфичных IgG антител до вакцинации (0-й день) и на 42-й и 180-й дни исследования. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ для каждой группы. Статистически достоверная разница между значениями в группах вакцина и плацебо обозначена скобкой, над которой указано значение p по Т-критерию Манна-Уитни. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

Кроме того, была проведена оценка уровня поствакцинального гуморального иммунного ответа у добровольцев, получивших вакцину «Гам-КОВИД-Вак», в зависимости от времени, прошедшего после окончания курса вакцинации (рисунок 62).

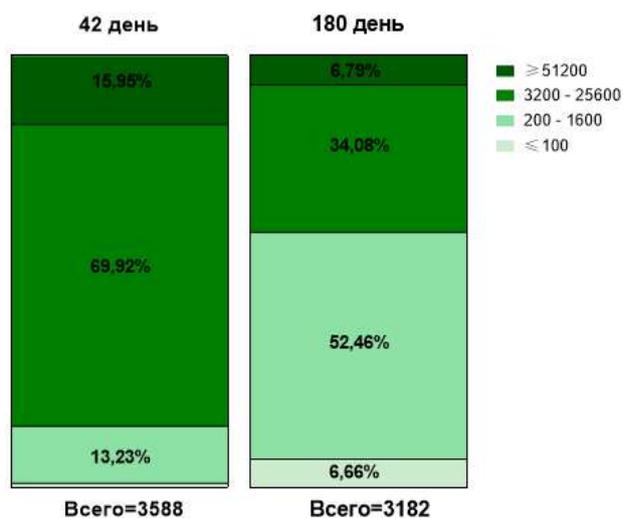


Рисунок 62 – Доля добровольцев с разным титром RBD-специфичных IgG антител на 42 и 180 день после вакцинации.

Установлено, что наивысший уровень антител ($\geq 1:51200$) к RBD-домену S-белка вируса SARS-CoV-2 наблюдался у 15,95% на 42-й день после вакцинации в режиме прайм-буст и сохранялся к 180-му дню у 6,79%. Процент лиц с высокими титрами антител (от 1:3200 до 1:25600) составил 69,92% на 42-й день, а к 180-му дню снизился почти в два раза (33,08%). При этом средний уровень иммунного ответа (от 1:200 до 1:1600) был детектирован у 13,23% добровольцев через 42 дня после вакцинации, а спустя 6 месяцев у большей части вакцинированных (52,46%) эта концентрация специфических антител является доминирующей. Доля добровольцев с титром антител $\leq 1:100$, включая серонегативных, составила 0,9 и 6,67% на 42-й и 180-й дни, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о высокой иммуногенности вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

Следующим этапом исследования явилось изучение особенностей формирования иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 в зависимости от возраста (рисунок 63).

При сравнении уровня RBD-специфичных IgG антител на 42-й день исследования обнаружена статистически достоверная разница между следующими возрастными стратами: 18-30 и 41-50 лет ($p=0,0002$), 18-30 и 51-60 лет ($p=0,0002$), 18-30 и старше 60 лет ($p=0,0002$), а также между 31-40 и 41-50 лет ($p=0,012$). Значение СГТ и уровень сероконверсии для каждой страты следующее:

18-30 (СГТ=1:11032, 98,88%), 31-40 (СГТ=10046, 99,45%), 41-50 (СГТ=1:8740, 99,41%), 51-60 (СГТ=1:8114, 99,6%), старше 60 (СГТ=1:8023, 99,44%). Анализ полученных результатов показал, что высокий иммунный ответ наблюдался у добровольцев в возрасте от 18 до 40 лет.

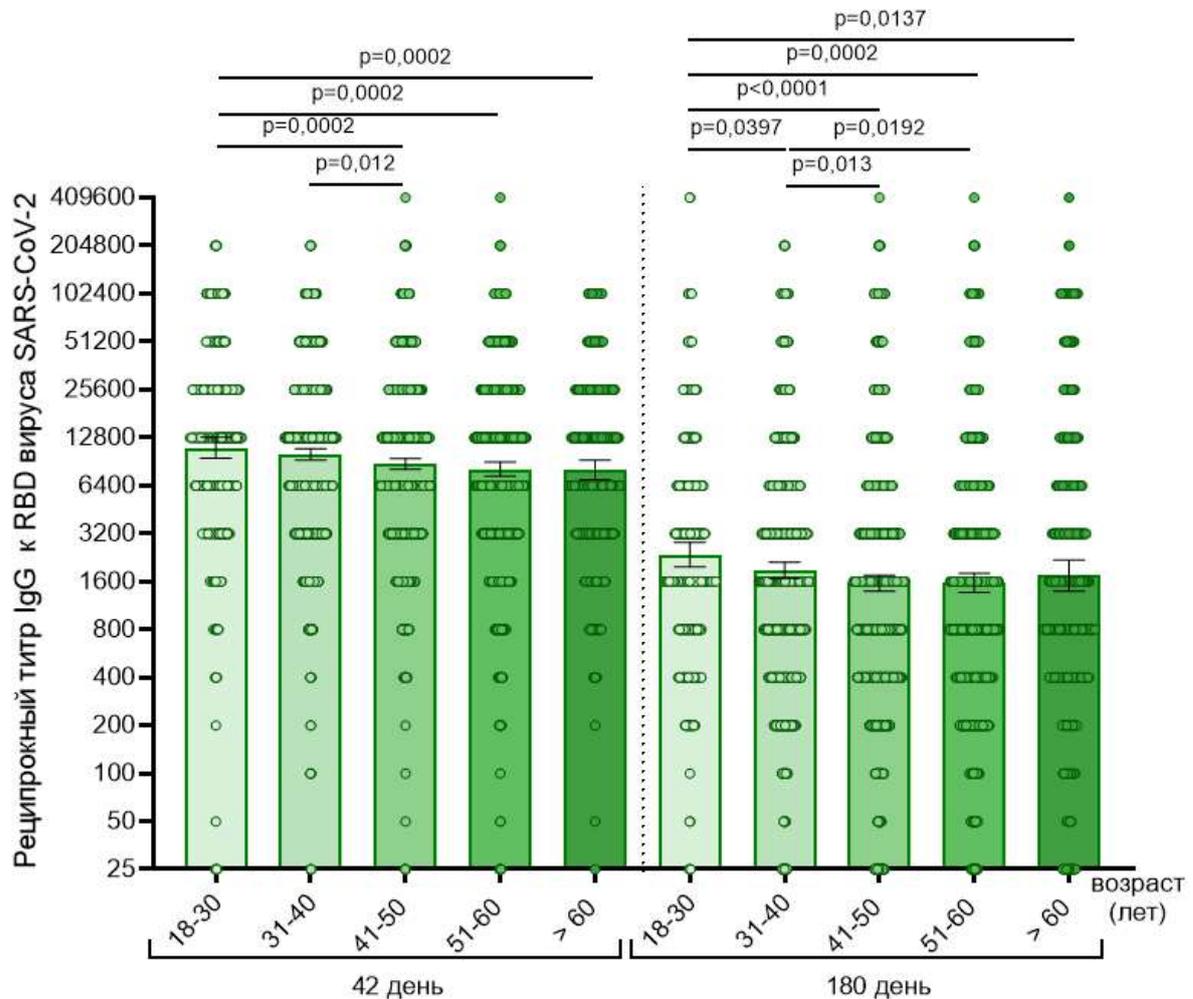


Рисунок 63 – Титры RBD-специфичных IgG антител в возрастных стратах на 42-й и 180-й дни исследования. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ для каждой группы. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

На 180-й день исследования статистически достоверная разница обнаружена между 18-30 лет и всеми другими возрастными стратами: 31-40 ($p=0,0397$), 41-50 ($p<0,0001$), 51-60 ($p=0,0002$), старше 60 ($p=0,0137$). Кроме того, была выявлена разница между стратами 31-40 и 41-50 лет ($p=0,013$) и 31-40 и 51-60 лет ($p=0,0192$). Значение СГТ и уровень сероконверсии для каждой страты

следующие: 18-30 (СГТ=1:2360, 97,3%), 31-40 (СГТ=1:1876, 96,46%), 41-50 (СГТ=1:1561, 93,82%), 51-60 (СГТ=1:1571, 94,59%), старше 60 (СГТ=1:1742, 92,86%). Анализ полученных результатов показал, что через 6 месяцев после вакцинации высокий иммунный ответ наблюдался у добровольцев в возрасте от 18 до 40 лет.

Далее мы изучали влияние пола добровольцев на выработку IgG антител к вирусу SARS-CoV-2. Данные представлены на рисунках 63-65. При сравнении уровня RBD-специфичных IgG антител на 42-й день исследования между группами мужчин и женщин обнаружена статистически значимая разница ($p=0,0316$) (рисунок 64).

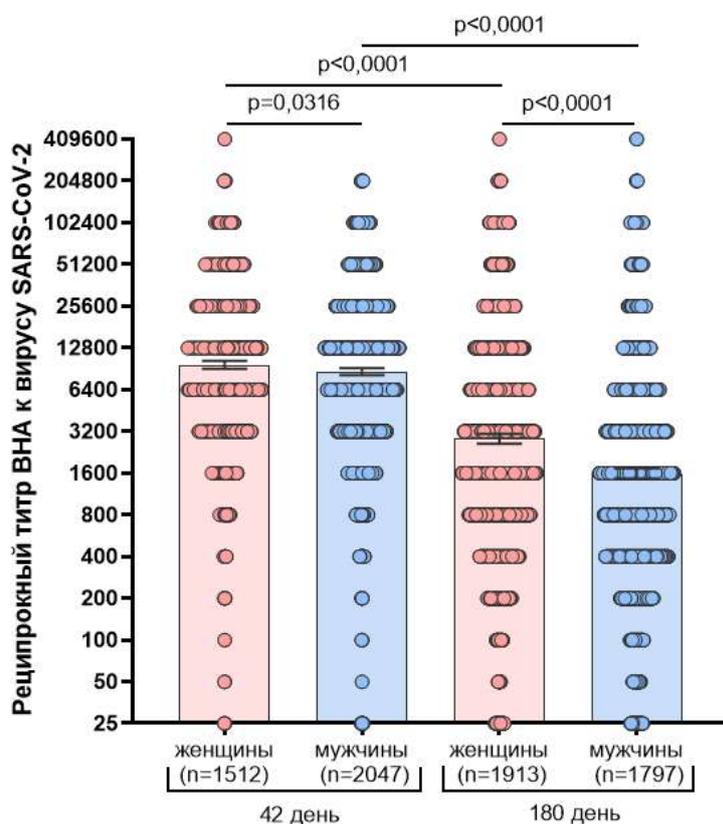


Рисунок 64 – Титры RBD-специфичных IgG антител у женщин и мужчин на 42-й и 180-й дни исследования. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ для каждой группы. Статистически достоверная разница между значениями у женщин и мужчин обозначена скобкой, над которой указано значение p по U -критерию Манна-Уитни. Статистически достоверная разница между значениями у женщин или мужчин на 42-й и 180-й дни исследования обозначена скобкой, над которой указано значение p по критерию Вилкоксона.

СГТ у женщин составил 1:9660, у мужчин – 1:8633. Определение уровня антител через 6 месяцев после начала иммунизации показало, что в обеих группах происходит статистически значимое снижение титра ($p < 0,0001$). При этом у женщин антитела снижаются в 3,4 раза, а у мужчин – в 5,4 раза. СГТ у женщин составил 1:2833, у мужчин – 1:1590.

При сравнении уровня IgG антител между группами мужчин и женщин в разных возрастных стратах на 42-й день исследования статистически значимой разницы не обнаружено (рисунок 65).

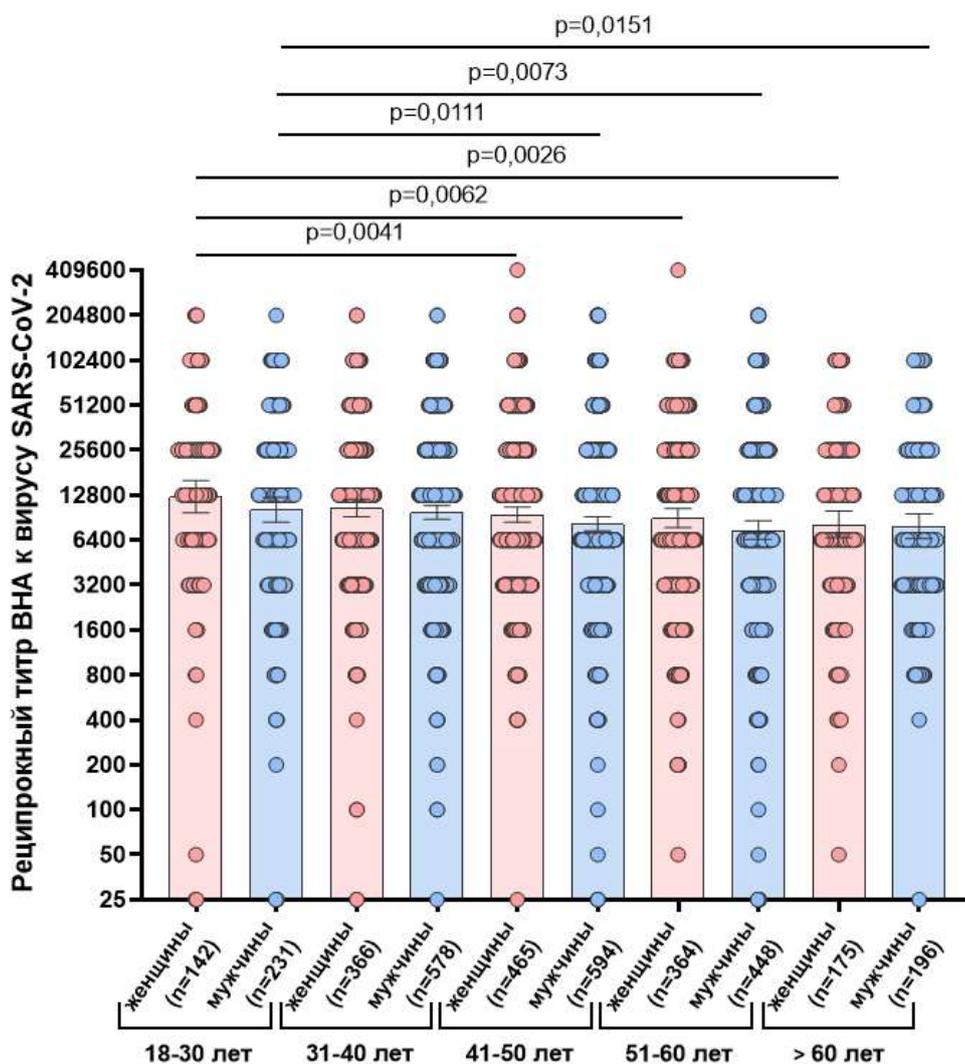


Рисунок 65 – Титры RBD-специфичных IgG антител у женщин и мужчин в возрастных стратах на 42-й день исследования. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ для каждой страты. Статистически достоверная разница между значениями в группах обозначена скобкой, над которой указано значение p по U -критерию Манна-Уитни.

При этом титр антител у молодых людей 18-30 лет (как у женщин, так и у мужчин) был достоверно выше, чем у лиц более старшего возраста (41 год и старше). Значение СГТ для каждой страты у женщин: 18-30 (СГТ=1:12491), 31-40 (СГТ=1:10472), 41-50 (СГТ=1:9458), 51-60 (СГТ=1:8982), старше 60 (СГТ=1:8149). Значение СГТ для каждой страты у мужчин: 18-30 (СГТ=1:10221), 31-40 (СГТ=1:9785), 41-50 (СГТ=1:8215), 51-60 (СГТ=1:7471), старше 60 (СГТ=1:7913).

Анализ результатов уровня IgG антител в группах женщин и мужчин в разных возрастных стратах на 180-й день исследования показал наличие статистически значимой разницы только между женщинами и мужчинами 51-60 лет ($p = 0,0179$) (рисунок 66).

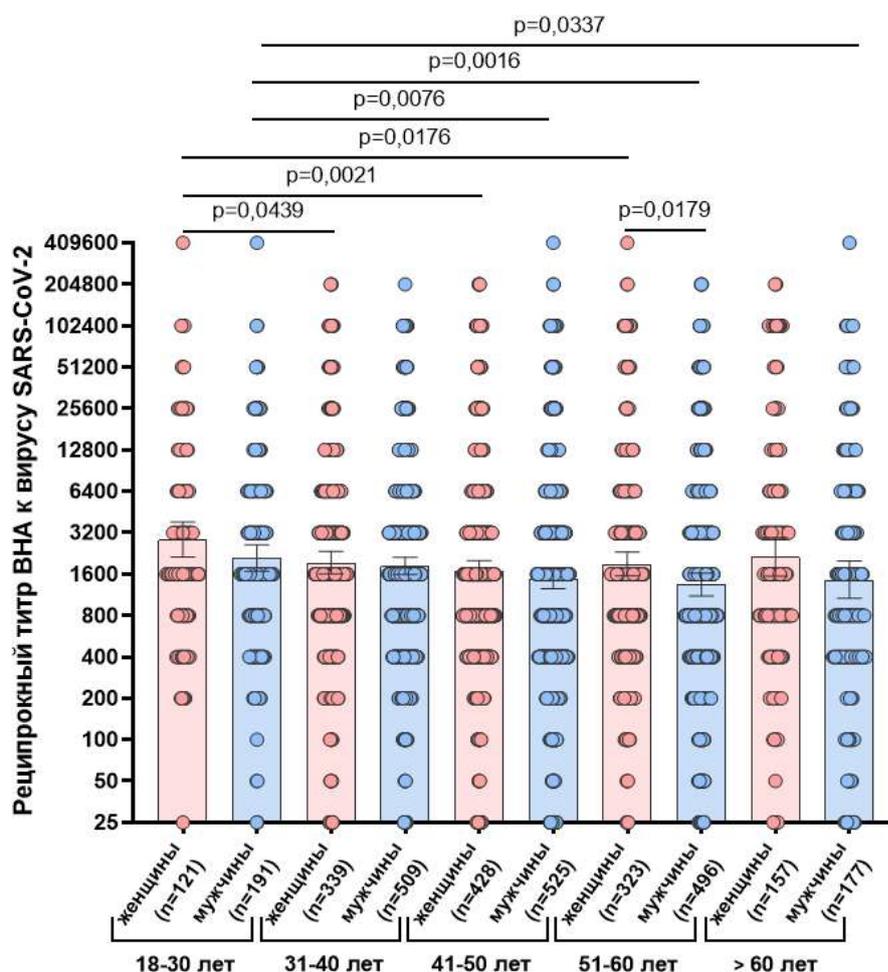


Рисунок 66 – Титры RBD-специфичных IgG антител у женщин и мужчин в возрастных стратах на 180-й день исследования. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ для каждой страты. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

При изучении индукции гуморального иммунного ответа по уровню нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 были проанализированы сыворотки 407 добровольцев на 0-й и 42-й день исследования (301 образец из группы вакцина и 106 образцов из группы плацебо). На 180-й день исследования были проанализированы сыворотки от 302 добровольцев (227 образцов из группы вакцина и 75 образцов из группы плацебо). Результаты исследования титров нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 у добровольцев представлены на рисунке 67.

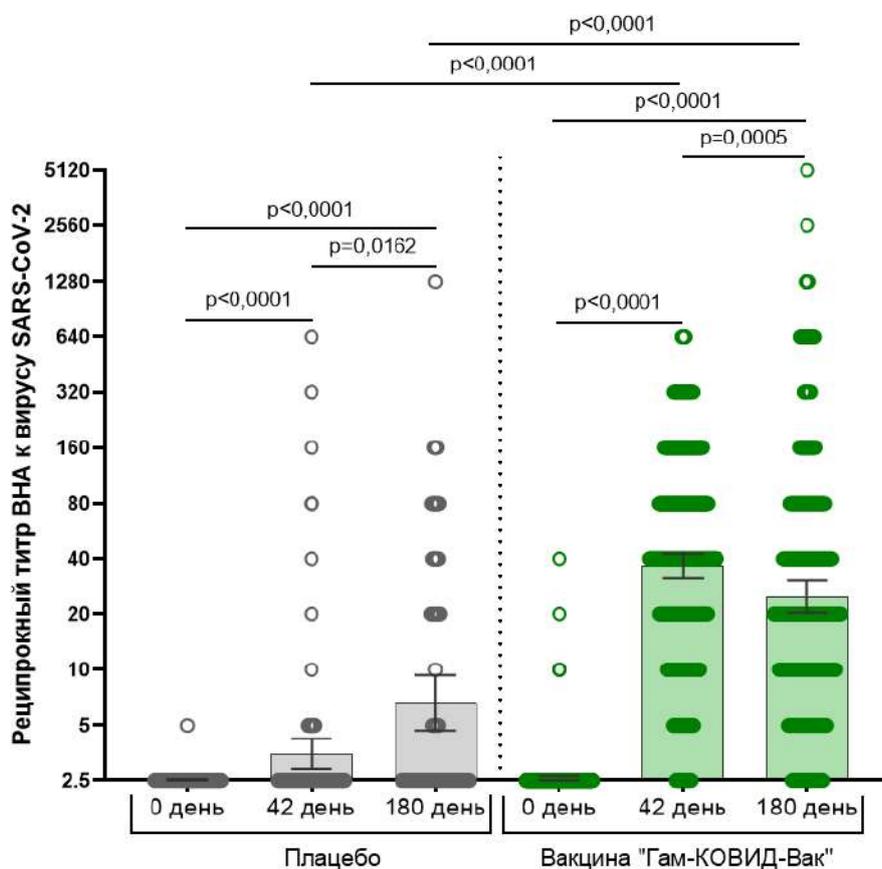


Рисунок 67 – Титры ВНА к вирусу SARS-CoV-2. Столбцы представляют собой СГТ с 95% ДИ для каждой группы. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по Т-критерию Вилкоксона.

По результатам проведенного исследования было показано, что у добровольцев после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на 42-й день происходит достоверное повышение уровня ВНА к вирусу SARS-CoV-2 ($p < 0,0001$) (СГТ=1:36,65), уровень сероконверсии составил 87,37%. Через 6

месяцев (180 дней) после вакцинации происходит статистически достоверное снижение титра ВНА ($p < 0,0001$) (СГТ=1:24,99). Уровень сероконверсии составил 77,53%. В группе плацебо на 42-й день ВНА к вирусу SARS-CoV-2 определялись у 7,55% добровольцев (СГТ=1:3,49) ($p < 0,0001$), на 180-й день у 30,67% добровольцев (СГТ=1:6,6) ($p < 0,0001$).

Далее мы изучали влияние возраста добровольцев на выработку ВНА к вирусу SARS-CoV-2 (рисунок 68).

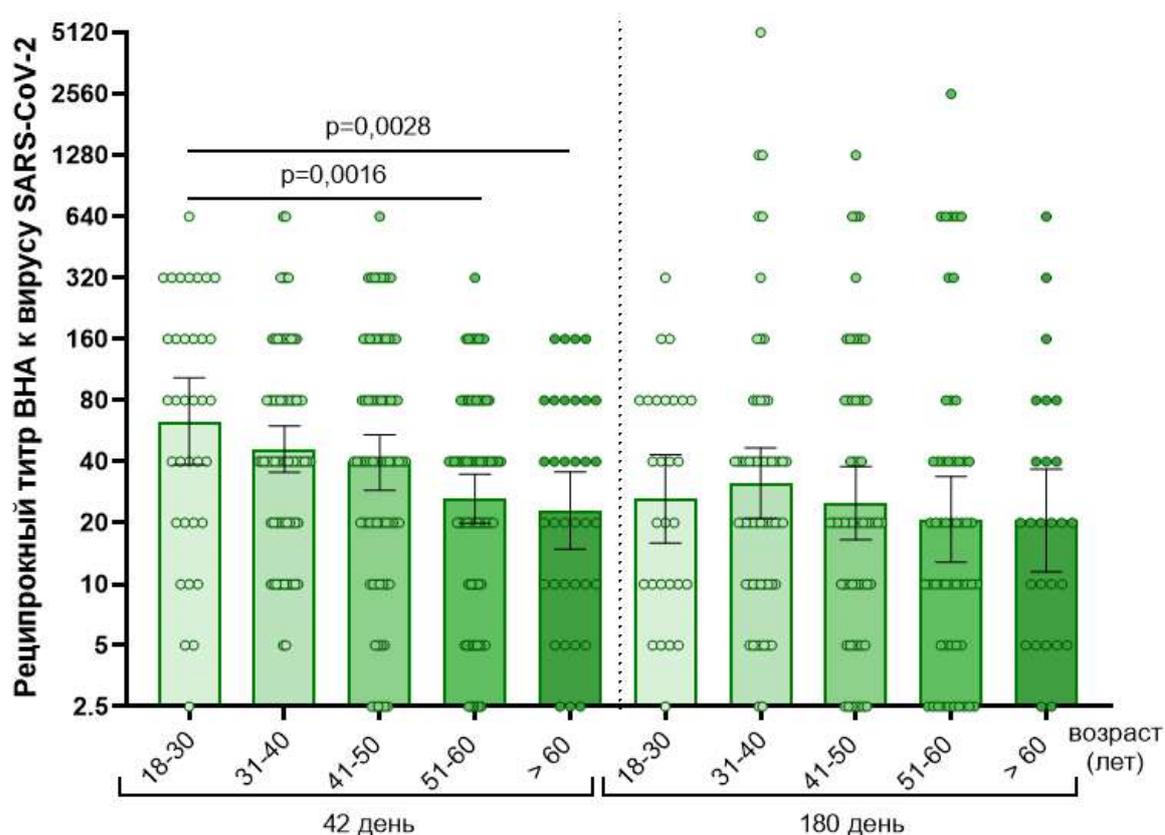


Рисунок 68 – Титры ВНА к вирусу SARS-CoV-2 в возрастных группах до вакцинации (0-й день) и на 42-й и 180-й дни исследования. СГТ представлено в виде черной черты для каждой группы данных. Отклонения обозначают 95% доверительный интервал. Статистическая разница обозначена линией, над которой указано значение p по U-критерию Манна-Уитни.

Анализ полученных результатов показал, что высокий иммунный ответ наблюдался у добровольцев в возрасте от 18 до 50 лет. При сравнении уровня ВНА на 42-й день исследования обнаружена статистически достоверная разница

между возрастными стратами 18-30 и 51-60 лет ($p=0,0016$), а также между стратами 18-30 и старше 60 лет ($p=0,0028$). Значение СГТ для каждой страты следующее: 18-30 (СГТ=1:63,08), 31-40 (СГТ=1:46,03), 41-50 (СГТ=1:39,65), 51-60 (СГТ=1:26,34), старше 60 (СГТ=1:22,97). Статистически достоверной разницы между возрастными стратами на 180-й день исследования не обнаружено. Значение СГТ на этот день для каждой страты следующее: 18-30 (СГТ=1:26,26), 31-40 (СГТ=1:31,38), 41-50 (СГТ=1:25,00), 51-60 (СГТ=1:20,79), старше 60 (СГТ=1:20,54).

При сравнении уровня ВНА между группами мужчин и женщин не обнаружено статистически значимой разницы (на 42-й день $p=0,2164$, на 180-й день $p=0,2133$) (рисунок 69).

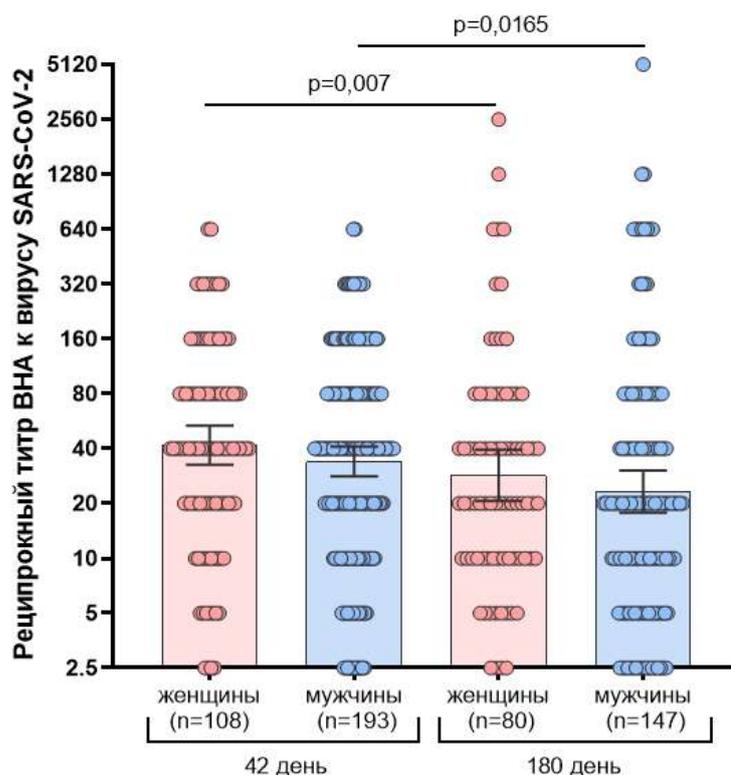


Рисунок 69 – Титры ВНА к вирусу SARS-CoV-2 в группе «вакцина» у женщин и мужчин. Столбцы представляют собой СГТ для каждой страты с 95% ДИ. Статистически достоверная разница между значениями у женщин или мужчин обозначена линией, над которой указано значение p по критерию Вилкоксона.

СГТ на 42-й день у женщин составил 1:41,84, у мужчин – 1:34,03. Определение уровня антител через 6 месяцев после начала иммунизации показало, что в обеих группах происходит статистически значимое снижение титра в 1,46 раза. СГТ у женщин составил 1:28,53, у мужчин – 1:23,26.

Таким образом, резюмируя полученные данные, можно заключить, что напряженность гуморального иммунитета на 42-й и 180-й дни исследования достоверно выше в группе добровольцев, вакцинированных препаратом «Гам-КОВИД-Вак», по сравнению с группой плацебо.

б) Определение поствакцинального клеточного иммунитета

Исследование клеточного иммунного ответа включало определение процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови в культуре *in vitro* после рестимуляции рекомбинантным S-белком вируса SARS-CoV-2 и прироста концентрации интерферона гамма в культуре Т-лимфоцитов после рестимуляции S-белком вируса SARS-CoV-2.

Согласно плану клинического исследования для оценки клеточного иммунного ответа была проведена процедура «расслепления» части добровольцев до и на 28-й день исследования. Для определения процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов *in vitro* – 50 субъектов: 38, получивших вакцину, и 12, получивших плацебо. Для определения прироста концентрации ИФН γ – 97 субъектов: 75, получивших вакцину, и 22, получивших плацебо.

Результаты определения прироста поствакцинального клеточного иммунного ответа у добровольцев после иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак» по проценту пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов на 0-й (до иммунизации) и 28-й дни исследования представлены на рисунке 70.

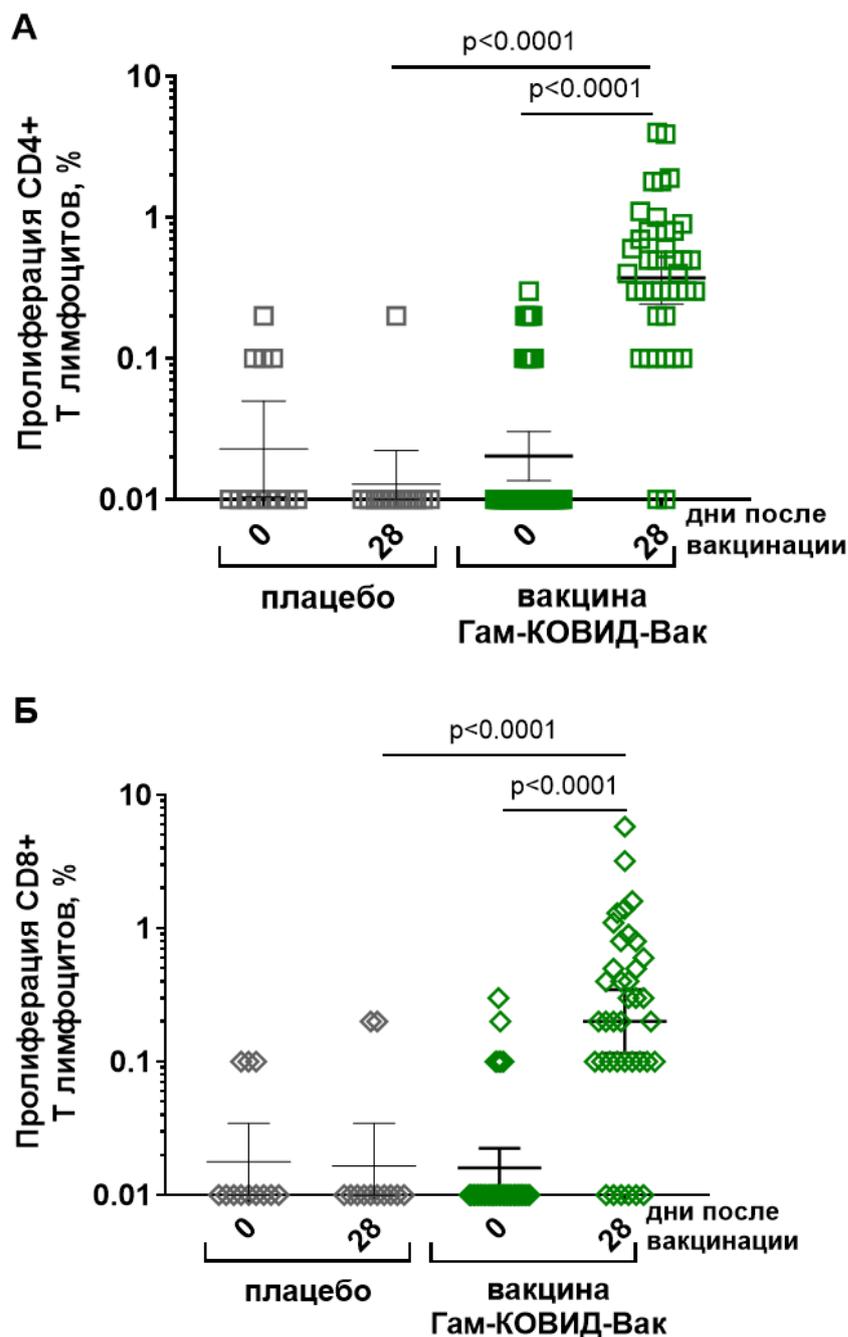


Рисунок 70 – Процент пролиферирующих CD4+ (А) и CD8+ (Б) Т-лимфоцитов на 0-й день (до иммунизации) и 28-й день после иммунизации добровольцев. Медиана значений представлена в виде черной черты для каждой группы данных с 95% ДИ. Статистически достоверная разница между значениями групп обозначена скобкой и символом p по U-критерию Манна-Уитни. Статистически достоверная разница между значениями внутри группы обозначена скобкой и символом p по T-критерию Вилкоксона.

Стоит отметить, что у 33,33% (n=4 из 12) добровольцев в группе плацебо и 26,3% (n=10 из 38) в группе «вакцина» были обнаружены предсуществующие вирус-специфические CD4+ Т-лимфоциты с медианой 0,01%. У 16,67% (n=2 из 12) добровольцев в группе плацебо и 18,4% (n=7 из 38) в группе «вакцина» были обнаружены предсуществующие вирус-специфические CD8+ Т-лимфоциты с медианой 0,01%. Данный факт может быть объяснен различными факторами, включая, например, наличие кросс-реактивных Т-лимфоцитов, сформированных ранее на сезонные близкие по антигенной структуре штаммы коронавируса [Mateus et al., 2020].

У вакцинированных добровольцев на 28-й день исследования процент пролиферирующих CD4+ Т-лимфоцитов составил 0,45 (95% ДИ: 0,3-0,6) по сравнению со значением 0,01 (95% ДИ: 0-0) до проведения вакцинации (0-й день). Статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих CD4+ Т-лимфоцитов до иммунизации и на 28-й день составила $p < 0,0001$. У 5,26% (n=2 из 38) добровольцев не было детектировано повышения процента пролиферирующих антиген-специфичных CD4+ Т-лимфоцитов. Процент добровольцев, у которых было обнаружено повышение процента пролиферирующих антиген-специфичных CD4+ Т-лимфоцитов на 28-й день исследования, составил 94,7% (n=36 из 38). В группе добровольцев, получивших плацебо, медиана значений процента пролиферирующих CD4+ Т-лимфоцитов до вакцинации и на 28-й день после введения составила 0,01 (95% ДИ: 0,01-0,01). Статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих CD4+ Т-лимфоцитов на 28-й день исследования между группами добровольцев, получивших вакцину или плацебо, составила $p < 0,001$.

У добровольцев в группе «вакцина» на 28-й день исследования процент пролиферирующих CD8+ Т-лимфоцитов, согласно медиане значений, составил 0,2 (95% ДИ: 0,1-0,65) по сравнению со значением 0,01 (95% ДИ: 0,01-0,01) до проведения вакцинации (0-й день). Статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих CD8+ Т-лимфоцитов до иммунизации и на 28-й день составила $p < 0,0001$. У 21,05% (n=8 из 38) добровольцев не было

детектировано повышения процента пролиферирующих антиген-специфичных CD8+ Т-лимфоцитов. Процент добровольцев, у которых было обнаружено повышение процента пролиферирующих антиген-специфичных CD8+ Т-лимфоцитов, составил 78,95% (n=30 из 38). В группе добровольцев, получивших плацебо, медиана значений процента пролиферирующих CD8+ Т-лимфоцитов до иммунизации и на 28-й день составила 0,01 (95% ДИ: 0,01-0,01). Статистически достоверная разница в значениях пролиферирующих CD8+ Т-лимфоцитов на 28-й день исследования между группами добровольцев, получивших вакцину или плацебо, составила $p < 0,001$.

Важно отметить, что при комплексном учете иммунных ответов обеих субпопуляций Т-лимфоцитов оказалось, что у каждого добровольца, иммунизированного вакциной «Гам-КОВИД-Вак», наблюдалось повышение процента пролиферирующих антиген-специфичных CD4+ и/или CD8+ Т-лимфоцитов (таблица 18).

Таблица 18 – Индивидуальные показатели клеточного иммунного ответа у добровольцев, иммунизированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак»

№ добровольца (ID)	Клеточный иммунный ответ		Любой ответ
	CD4+	CD8+	
9-0240	+	+	+
9-0246	+	+	+
9-0254	+	+	+
9-0260	+	+	+
9-0270	+	+	+
9-0271	+		+
9-0277	+	+	+
9-0286	+	+	+
9-0295	+	+	+
9-0304	+	+	+
9-0318	+	+	+

№ добровольца (ID)	Клеточный иммунный ответ		Любой ответ
	CD4+	CD8+	
9-0330	+	+	+
9-0331	+		+
9-0335	+	+	+
9-0344	+	+	+
9-0347	+		+
9-0352	+	+	+
9-0353		+	+
9-0372	+	+	+
9-0398	+	+	+
9-0408	+	+	+
9-0413	+		+
9-0419	+		+
9-0420	+	+	+
9-0421	+	+	+
9-0426	+	+	+
9-0427		+	+
9-0429	+	+	+
9-0434	+	+	+
9-0440	+	+	+
9-0453	+		+
9-0455	+	+	+
9-0456	+	+	+
9-0458	+	+	+
9-0459	+	+	+
9-0461	+		+
9-0464	+	+	+
9-0466	+		+
Итого	94,7%	78,95%	100%

Кроме того, напряженность поствакцинального клеточного иммунного ответа дополнительно оценивали по продукции маркерного цитокина ИФН γ *in vitro*.

Результаты определения прироста концентрации ИФН γ на 0-й день (до иммунизации) и на 28-й день после иммунизации добровольцев вакциной «Гам-КОВИД-Вак» представлены на рисунке 71.

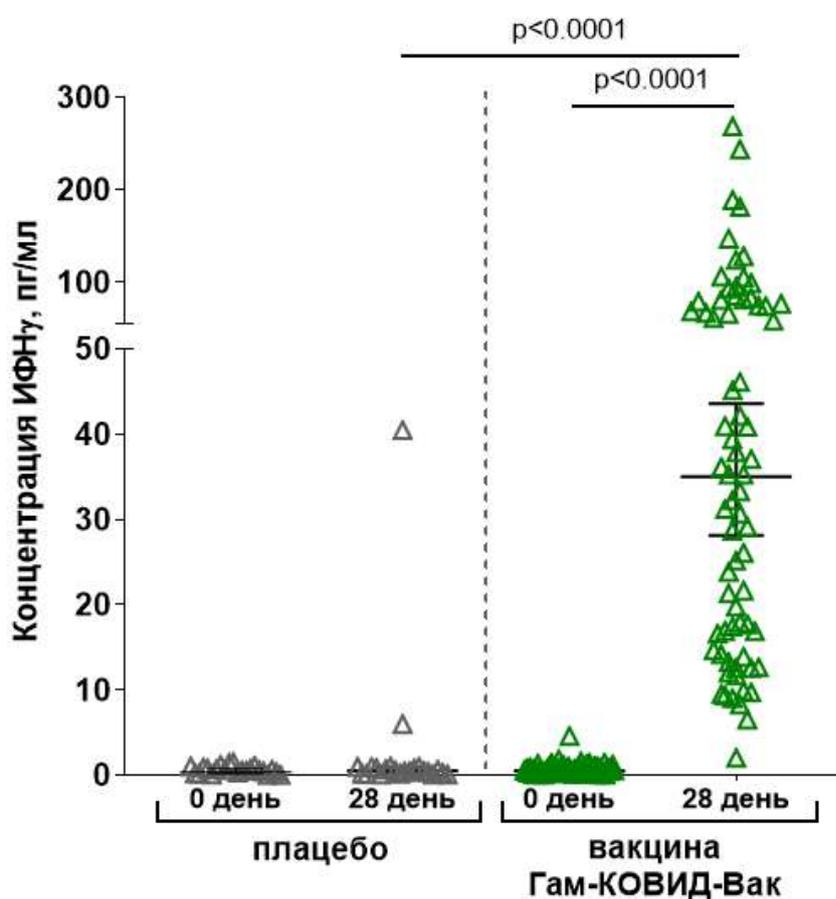


Рисунок 71 – Концентрация ИФН γ в культуральной среде мононуклеарных клеток периферической крови в ответ на рестимуляцию белком S вируса SARS-CoV-2. Медиана значений представлена в виде черной черты с 95% ДИ. Порог обнаружения (ниже 2 пг/мл) обозначен серой линией. Статистически достоверная разница между значениями в группах вакцина и плацебо обозначена скобкой и значением p по U -критерию Манна-Уитни. Статистически достоверная разница между значениями на 0-й и 28-й дни в группе «вакцина» или плацебо обозначена скобкой и значением p по T -критерию Вилкоксона.

При анализе данных показатели продукции ИФН γ в целом совпадали с данными пролиферативного иммунного ответа. Так, введение добровольцам вакцины «Гам-КОВИД-Вак» активно стимулировало продукцию ИФН γ *in vitro*. К 28-му дню все добровольцы из группы «вакцина» (n=75 из 75) показали значительно более высокие уровни секреции ИФН γ при рестимуляции антигеном (медиана значений составила 36,14 пг/мл (95% ДИ: 16,88-74,69)) по сравнению с результатами, полученными у тех же добровольцев до введения вакцины (0-й день) (p<0,0001), и относительно группы плацебо (p<0,0001). Медиана значений в группе «вакцина» до иммунизации (0-й день) составила 0,5381 пг/мл (95% ДИ: 0,3357-0,9249). Медиана значений в группе плацебо до иммунизации (0-й день) составила 0,5815 пг/мл (95% ДИ: 0,2845-0,9357), а после (28-й день) – 0,5028 пг/мл (95% ДИ: 0,1932-0,9342).

На основании полученных данных (как по показателям лимфопролиферативного ответа, так и по приросту концентрации ИФН γ) можно сделать вывод о том, что иммунизация вакциной «Гам-КОВИД-Вак» в режиме прайм-буст способна сформировать клеточный антиген-специфический иммунный ответ.

3.3.3.3 Оценка эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак»

Различие в заболеваемости вакцинированных и невакцинированных добровольцев является критерием эффективности вакцины и основой для определения ее защитного эффекта, который принято выражать в процентах.

В рамках данного исследования, помимо определения итоговой эффективности, предполагалось выполнение трех промежуточных анализов (на 20, 39 и 78 случаях). Это делалось для предварительной оценки характеристик эффективности. В течение исследования выполнен промежуточный анализ на 20 и 78 случаев, соответствующих критериям оценки эффективности (первичная конечная точка). Анализ 39 случаев не проводили, так как накопление случаев происходило слишком быстро.

Расчет эффективности был проведен в соответствии с протоколом исследования. Эффективность определяли на основании отношения шансов.

В первый промежуточный анализ (20 случаев) включено 12296 добровольцев и 27 случаев, верифицированных на момент закрытия базы данных (18 ноября 2020 года). В группу «вакцина» вошли 9258 субъектов, в группу плацебо – 3038. Согласно проведенному анализу, в группе «вакцина» COVID-19 был подтвержден у 3 добровольцев (0,03%), тогда как в группе плацебо отмечалось 24 случая (0,79%) заболевания (таблица 19).

Таблица 19 – Данные по доле заболевших субъектов

Группа	Доля заболевших		P (χ^2)
	Заболело	Не заболело	
группа «вакцина»	3/9258 (0,03%)	9255/9258 (99,97%)	<0,0001
группа плацебо	24/3038 (0,79%)	3014/3038 (99,21%)	
OR (95% ДИ)	0,041 (0,012; 0,135)		

Для анализа этих данных был использован χ^2 -критерий. Таким образом, отношение шансов равно 0,041 (95% ДИ: 0,012–0,135). Эпидемиологическая эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» составляет 95,9% (95% ДИ: 86,5%–98,8%).

Поскольку в ноябре в Москве наблюдался рост заболеваемости COVID-19, второе закрытие базы данных было выполнено 24 ноября 2020 года, когда было зарегистрировано 78 случаев. Второй промежуточный анализ эффективности включил 14964 добровольца, получивших вакцину «Гам-КОВИД-Вак», и 5435 добровольцев, получивших плацебо по полной схеме иммунизации. Согласно проведенному анализу, 16 случаев COVID-19 было подтверждено в группе «вакцина» (0,1%), тогда как в группе плацебо отмечалось 62 случая (1,3%) (таблица 20).

Таблица 20 – Данные по доле заболевших субъектов

Группа	Доля заболевших		P (χ^2)
	Заболело	Не заболело	
группа «вакцина»	16/14964 (0,1%)	14948/14964 (99,9%)	<0,0001
группа плацебо	62/4902 (1,3%)	4840/4902 (98,7%)	
OR (95% ДИ)	0,084 (0,048; 0,144)		

Для анализа этих данных был использован χ^2 -критерий. Таким образом, отношение шансов равно 0,084 (95% ДИ: 0,048–0,144). Эпидемиологическая эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» составляет 91,6% (95% ДИ: 85,6%–95,2%).

Сравнительный график Каплана-Мейера (с 95% ДИ) для первого симптоматического, ПЦР-положительного случая COVID-19 у добровольцев, получивших по крайней мере один компонент вакцины или одну дозу плацебо, представлен на рисунке 72.

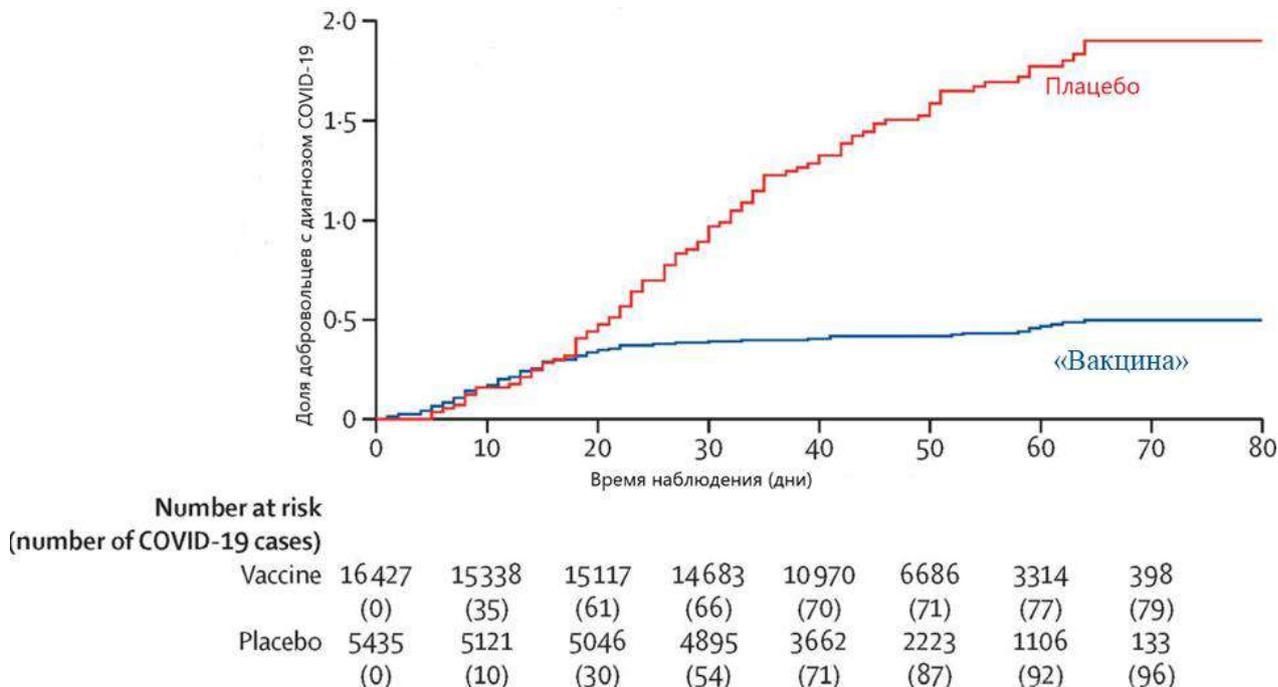


Рисунок 72 – Кривые Каплана-Мейера для данных по заболеваемости COVID-19 у добровольцев, получивших, по крайней мере, один компонент вакцины или одну дозу плацебо [Logunov et al., 2021].

Полученные данные демонстрируют, что кривые Каплана-Мейера заметно расходятся, значение $p < 0,0001$, что указывает на значительно более низкую заболеваемость среди добровольцев из группы «вакцина» по сравнению с добровольцами из группы плацебо.

За все время исследования среди добровольцев в РР-популяции (популяция, в анализ которой включены только те добровольцы, которые получили вакцину «Гам-КОВИД-Вак» или плацебо по полной схеме иммунизации) было выявлено 933 подтвержденных случая COVID-19, диагностированных начиная с 22-го дня после введения первого компонента вакцины. Основным критерием эффективности в данном анализе является доля добровольцев, заболевших COVID-19, который развился в течение 6 месяцев после получения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» или второй дозы плацебо и был подтвержден методом ПЦР после планового завершения вакцинации (через 21 день после получения первой дозы).

Согласно проведенному анализу, в группе «вакцина» доля заболевших составила 455 из 21939 добровольцев (2,07%), тогда как в группе плацебо отмечалось 478 из 7130 (6,70%) (таблица 21). Для анализа этих данных был использован χ^2 -критерий. Таким образом, отношение шансов равно 0,295 (95% ДИ: 0,258–0,336). Эпидемиологическая эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» составляет 70,5% (95% ДИ: 66,4%–74,2%).

Таблица 21 – Данные по доле заболевших субъектов

Группа	РР-популяция		P (χ^2)
	Доля заболевших		
	Заболело	Не заболело	
группа «вакцина»	455/21939 (2,07%)	21484/21939 (97,93%)	<0,0001
группа плацебо	478/7130 (6,70%)	6652/7130 (93,30%)	
OR (95% ДИ)	0,295 (0,258; 0,336)		

Сравнительный график Каплана-Мейера (с 95% ДИ), начиная со дня первого введения первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак», в отношении первичной конечной точки эффективности (заболевание COVID-19, подтвержденное методом ПЦР) представлен на рисунке 73.

Полученные данные демонстрируют, что кривые Каплана-Мейера заметно расходятся, значение $p < 0,0001$, что указывает на значительно более низкую заболеваемость среди добровольцев из группы «вакцина» по сравнению с добровольцами из группы плацебо.

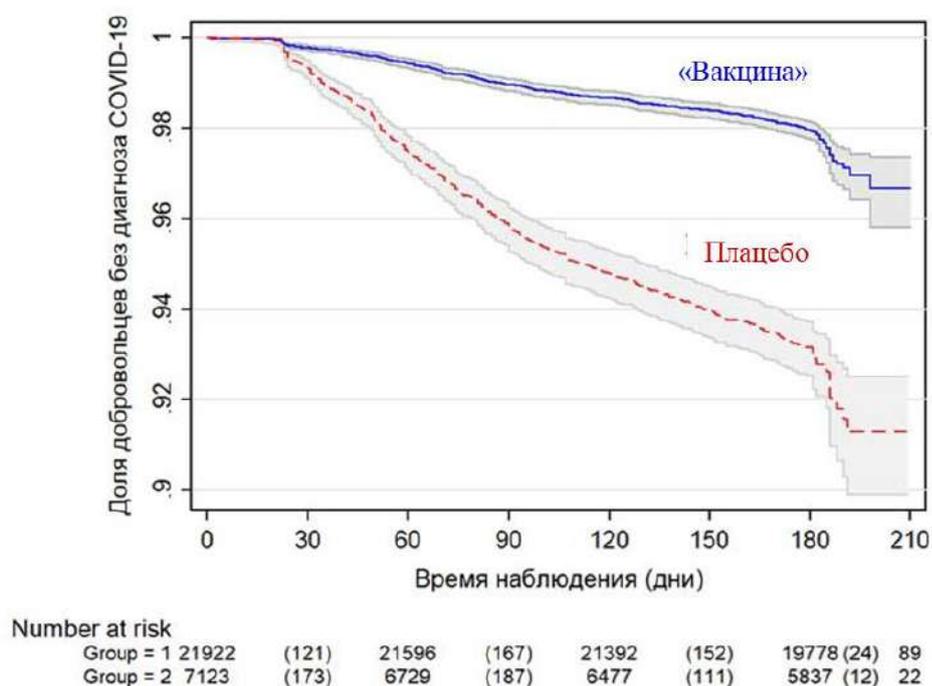


Рисунок 73 – Кривые Каплана-Мейера для данных по заболеваемости COVID-19, начиная со дня первого введения вакцины или плацебо.

Для оценки возможного влияния различных ковариат (пол, возраст, данные анамнеза) на заболеваемость COVID-19 было проведено построение модели логистической регрессии (таблица 22).

Таблица 22 – Результаты построения модели логистической регрессии при анализе данных по доле заболевших субъектов

Фактор	OR	p	95% ДИ для OR	
Группа	0,295	<0,001	0,258	0,336
Возраст	1,011	<0,001	1,005	1,016
Пол (Жен = реф)	0,981	0,784	0,855	1,125
Наличие сопутствующих заболеваний	2,335	<0,001	2,035	2,679

Для каждого включенного фактора была дана точечная оценка для соотношения шансов (OR), а также 95% доверительный интервал для OR. Анализ показал, что группа субъекта имела статистически значимую взаимосвязь с риском заболевания ($p < 0,001$). Фактор наличия сопутствующих заболеваний ($p < 0,001$) и возраст ($p < 0,001$) также имели статистически значимую ассоциацию с риском заболевания, тогда как фактор пола не показал наличие статистически значимой ассоциации ($p = 0,784$).

Представленные сведения основаны на суммарном количестве участников в группах, получавших плацебо и вакцину «Гам-КОВИД-Вак». Однако существуют разногласия относительно выбытия добровольцев из группы плацебо и факта их последующей вакцинации. В связи с этим, точное определение размера группы плацебо затруднительно, что может приводить к заниженной оценке эффективности вакцины.

На графике Каплана-Мейера (рисунок 74) и в таблице 23 представлены результаты сравнительной оценки по доле субъектов исследования с легким, средним, тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19, начиная со дня первого введения вакцины или плацебо.

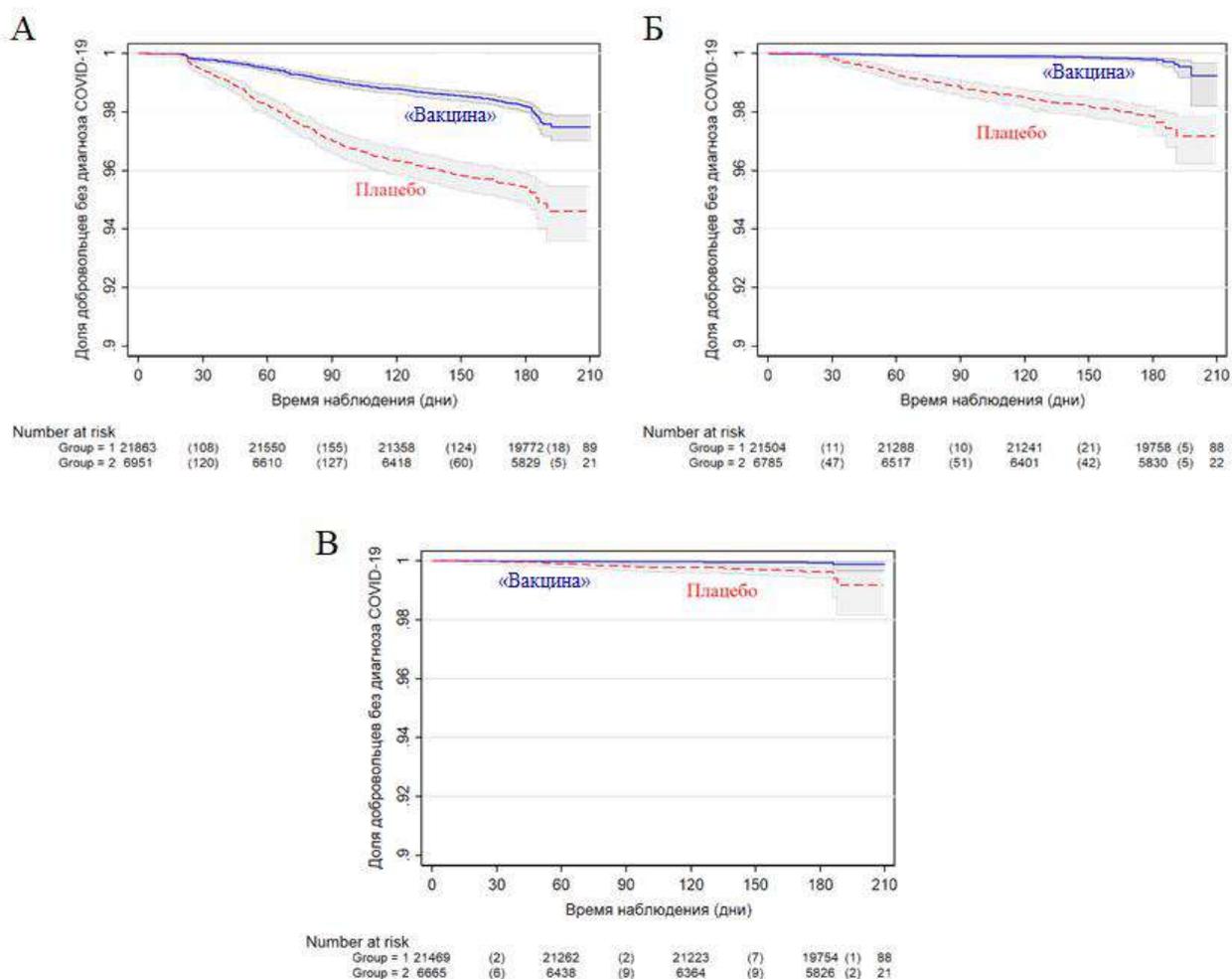


Рисунок 74 – Кривые Каплана-Мейера для данных по заболеваемости COVID-19 легкой (А), тяжелой (Б) и крайне-тяжелой (В) степени, начиная со дня первого введения вакцины.

Полученные данные демонстрируют, что кривые Каплана-Мейера заметно расходятся, значение $p < 0,0001$, что указывает на значительно более низкую заболеваемость среди добровольцев из группы «вакцина» по сравнению с добровольцами из группы плацебо.

Таблица 23 – Данные по доле заболевших субъектов в РР-популяции с различной степенью тяжести

Степень тяжести	Доля заболевших		Р
	Вакцина	Плацебо	
легкая	397/21939 (1,81%)	308/7130 (4,32%)	<0,001
средняя	46/21939 (0,21%)	145/7130 (2,03%)	
тяжелая	10/21939 (0,05%)	23/7130 (0,32%)	
крайне-тяжелая	2/21939 (0,01%)	2/7130 (0,03%)	

Далее проведен анализ зависимости эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» среди субъектов в РР-популяции, входящих в подгруппу с повышенным риском инфицирования (таблица 24). В данную группу входили профессии, связанные с повышенным риском заражения (деятельность подразумевает работу с больными, у которых подтвержден COVID-19), и со средним уровнем риска (профессиональное взаимодействие с обширным кругом лиц: врачи общего профиля, сотрудники социальных служб, работники торговли и т.п.).

Таблица 24 – Данные по эффективности вакцины среди субъектов с повышенным риском инфицирования

Группа	РР-популяция		Р (χ^2)
	Доля заболевших		
	Заболело	Не заболело	
группа «вакцина»	117/5405 (2,16%)	5288/5405 (97,84%)	<0,0001
группа плацебо	122/1743 (7,00%)	1621/1743 (93,00%)	
OR (95% ДИ)	0,294 (0,227; 0,381)		

Согласно проведенному анализу, в группе «вакцина» доля заболевших составила 117 из 5405 добровольцев (2,16%), тогда как в группе плацебо отмечалось 122 из 1743 (7,00%). Таким образом, OR=0,294 (95% ДИ: 0,227–0,381),

эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в подгруппе с повышенным риском инфицирования составляет 70,6%.

Данные по анализу зависимости эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» среди субъектов в РР-популяции, входящих в подгруппу с наличием сопутствующих заболеваний, представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Данные по эффективности вакцины среди субъектов РР-популяции с наличием сопутствующих заболеваний

Группа	Доля заболевших		P (χ^2)
	Заболело	Не заболело	
группа «вакцина»	233/6750 (3,45%)	6517/6750 (96,55%)	<0,0001
группа плацебо	254/2272 (11,18%)	2018/2272 (88,82%)	
OR (95% ДИ)	0,284 (0,236; 0,342)		

Согласно проведенному анализу, в группе «вакцина» доля заболевших составила 233 из 6750 добровольцев (3,45%), тогда как в группе плацебо отмечалось 254 из 2272 (11,18%). Таким образом, OR=0,284 (95% ДИ: 0,236–0,342), эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в подгруппе с наличием сопутствующих заболеваний составляет 71,6%.

В таблице 26 приведены результаты анализа эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в зависимости от возраста и пола.

При сравнении эффективности вакцины между разными возрастными стратами статистически значимой разницы не обнаружено. Эффективность вакцинации против COVID-19 с учётом возрастного фактора составила: 66% для субъектов 18-30 лет, 71% для 31-40 лет, 66,7% для 41-50 лет, 73,8% для 51-60 лет и 73,6% для субъектов старше 60 лет.

COVID-19 статистически значительно чаще регистрировался среди женщин молодого возраста 18-40 лет, чем среди мужчин того же возраста. Эффективность вакцины для женщин 18-30 лет и 31-40 лет составила 57,2% и 54%, соответственно. Эффективность вакцины для мужчин 18-30 лет составила 70,2%,

для 31-40 – 72,9%. При этом схожая эффективность наблюдалась между женщинами и мужчинами в других возрастных страт.

Таблица 26 – Данные по эффективности вакцины в различных стратах по возрасту и полу

Возраст, лет	Пол	Группа вакцина	Группа плацебо	P	OR (95% ДИ)	Эффективность (%)
18-30	Оба пола	37/2709 (1,37%)	35/895 (3,91%)	<0,001	0,340 (0,213; 0,544)	66
31-40		96/5865 (1,64%)	102/1882 (5,42%)	<0,001	0,290 (0,218; 0,386)	71
41-50		144/6325 (2,28%)	134/2049 (6,54%)	<0,001	0,333 (0,262; 0,424)	66,7
51-60		127/4946 (2,57%)	148/1621 (9,13%)	<0,001	0,262 (0,205; 0,335)	73,8
Старше 60		51/2091 (2,44%)	59/683 (8,64%)	<0,001	0,264 (0,180; 0,389)	73,6
18-30	Мужчины	22/1969 (1,12%)	24/658 (3,65%)	<0,001	0,298 (0,166; 0,536)	70,2
31-40		63/4066 (1,55%)	72/1311 (5,49%)	<0,001	0,271 (0,192; 0,382)	72,9
41-50		75/3945 (1,90%)	89/1310 (6,79%)	<0,001	0,266 (0,194; 0,364)	73,4
51-60		81/3030 (2,67%)	87/1015 (8,57%)	<0,001	0,293 (0,215; 0,400)	70,7
Старше 60		32/1227 (2,61%)	38/404 (9,41%)	<0,001	0,258 (0,159; 0,419)	74,2
18-30	Женщины	15/740 (2,03%)	11/237 (4,64%)	0,034	0,425 (0,192; 0,939)	57,5
31-40		33/1799 (1,83%)	30/571 (5,25%)	<0,001	0,460 (0,313; 0,677)	54
41-50		69/2380 (2,90%)	45/739 (6,09%)	<0,001	0,266 (0,194; 0,364)	73,4
51-60		46/1916 (2,40%)	61/606 (10,07%)	<0,001	0,220 (0,148; 0,326)	78
Старше 60		19/864 (2,20%)	21/279 (7,53%)	<0,001	0,276 (0,146; 0,522)	72,4

Данные по эффективности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в зависимости от степени тяжести течения COVID-19 представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Данные по эффективности вакцины в зависимости от степени тяжести

Степень тяжести	Группа «вакцина»	Группа плацебо	P	OR (95% ДИ)	Эффективность (%)
легкая	397/21939 (1,81%)	308/7130 (4,32%)	<0,001	0,408 (0,351; 0,475)	59,2
средняя	46/21939 (0,21%)	145/7130 (2,03%)	<0,001	0,101 (0,073; 0,141)	89,9
тяжелая	10/21939 (0,05%)	23/7130 (0,32%)	<0,001	0,141 (0,067; 0,296)	85,9
крайне-тяжелая	2/21939 (0,01%)	2/7130 (0,03%)	0,261	0,325 (0,046; 2,307)	67,5

Риск развития любого из исходов у вакцинированных добровольцев резко снижается. Расчетная эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в предотвращении легкого заболевания составляет 59,2%. С наибольшей эффективностью вакцина защищает от средней и тяжелой форм заболевания: 89,9% и 85,9%, соответственно. В предотвращении крайне-тяжелого заболевания COVID-19 эффективность составляет 67,5%, однако оценить достоверность не представляется возможным из-за малого числа событий (по 2 случая в каждой группе).

Полученные результаты показали высокую профилактическую эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак».

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вспышка новой коронавирусной инфекции COVID-19, начавшаяся в конце декабря 2019 г. и переросшая в пандемию, стала огромным вызовом для всей мировой системы здравоохранения. Имеющийся опыт борьбы с инфекционными заболеваниями показывает, что одним из наиболее эффективных методов прекращения и предотвращения распространения заболевания или контроль над заболеванием является вакцинация [Calina et al., 2020; Лобзин и соавт., 2020]. Проведение вакцинации позволяет не только снизить риск заражения вирусом SARS-CoV-2, но и уменьшить риск развития тяжелых форм течения COVID-19, а также летальных исходов. В кратчайшие сроки во многих странах было начато множество исследований по разработке эффективных и безопасных средств специфической защиты и профилактики. Важно подчеркнуть, что в условиях пандемии возможна регистрация вакцины по ускоренной схеме. В Российской Федерации было утверждено Постановление Правительства № 4411, которое дополняет существующие нормативные акты. Это постановление упрощает и ускоряет процесс создания и утверждения лекарственных средств в период пандемии. В частности, допускается частичное сокращение ДКИ, которые могут проводиться параллельно с КИ, при условии их достаточной полноты. Документ предусматривает возможность одобрения вакцины на основе предварительных клинических данных с обязательным завершением всех необходимых этапов исследований после регистрации препарата.

¹ Постановление Правительства Российской Федерации от 03.04.2020 № 441 (ред. от 01.09.2020) «Об особенностях обращения лекарственных препаратов для медицинского применения, которые предназначены для применения в условиях угрозы возникновения, возникновения и ликвидации чрезвычайной ситуации и для организации оказания медицинской помощи лицам, пострадавшим в результате чрезвычайных ситуаций, предупреждения чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний, представляющих опасность для окружающих, заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических, радиационных факторов».

В отношении вакцины против COVID-19 приоритетной задачей является создание высокоэффективного препарата, предназначенного как для иммунизации групп высокого риска, так и для проведения массовой иммунизации с целью формирования коллективного иммунитета, который будет препятствовать дальнейшему распространению инфекции.

Кроме того, с учетом изменяющейся эпидемиологической ситуации, когда в эпидсезон возможно циркулирование возбудителей сразу нескольких вирусных инфекций («тридемия», «квадридемия»), создание новых типов вакцин для формирования защитного коллективного иммунитета имеет важное значение [Лобзин, Белозеров, 2024].

Обязательной характеристикой любой вакцины является, в первую очередь, ее безопасность [Calina et al., 2020]. Однако невозможно одной вакциной охватить индивидуальные особенности людей, поэтому для минимизации рисков возникновения поствакцинальных осложнений уже на начальных стадиях разработки вакцинных препаратов возможно отсеять небезопасные кандидаты.

В этой связи необходимо отметить, что технологическая платформа на основе рекомбинантного аденовирусного вектора обладает преимуществом в плане возможности производства вакцины в промышленных масштабах, что обеспечит возможность проведения массовой иммунизации. При этом такая технологическая платформа характеризуется благоприятным профилем безопасности и хорошо себя зарекомендовала в разработке вакцин против других инфекционных заболеваний, в отношении которых отсутствовали эффективные средства защиты, например, БВВЭ и БВРС [Dolzikhova et al., 2017; Ожаровская и соавт., 2019; Должикова и соавт., 2020; Ковыршина и соавт., 2020]. В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в 2015 году была разработана и зарегистрирована комбинированная векторная вакцина «ГамЭвак-Комби» против БВВЭ. Эта вакцина состоит из двух компонентов: компонент А представляет собой вектор на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита; компонент Б – это вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа. Оба вектора экспрессируют гликопротеин GP вируса Эбола. В 2018

году была разработана комбинированная векторная вакцина «БВРС-ГамВак-Комби» для профилактики ближневосточного респираторного синдрома, которая также состоит из двух компонентов. Компонент I представляет собой вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, а компонент II – вектор на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа. Подбор двух векторов в этих вакцинах позволил реализовать стратегию гетерологичной прайм-буст иммунизации, когда для первичной и вторичной иммунизации используются разные иммунологически непохожие вирусные векторы. Такая вакцинация позволяет сформировать более выраженный и длительный иммунитет к целевому антигену, а также дает возможность модулировать определенный иммунный ответ.

В этом аспекте рациональным представляется решение использовать вышеуказанную стратегию в нашем исследовании. Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» основана на комбинации двух рекомбинантных аденовирусов. Для компонента I был сконструирован рекомбинантный вектор на основе Ад26, кодирующий полноразмерный ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 с кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью под экспрессию в клетках млекопитающих (rAd26-S-CoV2). Вектор rAd26-S-CoV2 является репликативно-дефектным в результате делеции E1-области генома аденовируса. Дополнительно rAd26-S-CoV2 несет делецию E3-области для увеличения пакующей емкости и модификацию белка 34K в E4-области, обеспечивающую эффективную продукцию рекомбинантного вируса в производственной клеточной линии НЕК 293. Для компонента II был получен рекомбинантный вектор на основе Ад5, кодирующий полноразмерный ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 с кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательностью под экспрессию в клетках млекопитающих (rAd5-S-CoV2). rAd5-S-CoV2 является репликативно-дефектным в результате делеции E1-области генома аденовируса. Дополнительно rAd5-S-CoV2 несет делецию E3-области для увеличения пакующей емкости.

Выбор аденовируса в качестве вектора обусловлен его биологическими свойствами. Среди них прежде всего стоит отметить эффективность трансдукции

клеток млекопитающих, в частности, антигенпрезентирующих, и высокий уровень экспрессии целевого антигена непосредственно в этих клетках [Сухова и соавт., 2024б]. Синтез целевого антигена обеспечивает эффективную доставку его эпитопов к главному комплексу гистосовместимости антигенпрезентирующих клеток для распознавания Т-лимфоцитами и последующей индукции В- и Т-клеточного иммунного ответа. Кроме того, аденовирусный вектор может трансдуцировать непосредственно антигенпрезентирующие клетки. При этом сам вектор обладает потенциальным адьювантным эффектом. Аденовирусы человека 5 и 26 серотипов давно и хорошо изучены, а по сравнению с нечеловеческими аденовирусами являются более безопасными. Так, например, аденовирус шимпанзе изолята Y25 вакцины ChAdOx1 отличается наиболее высоким содержанием последовательностей, гомологичных белкам нервной системы человека и потенциально имеет наибольший риск вызывать иммуновоспалительные поражения [Харченко, 2020].

Выбор гликопротеина S в качестве целевого антигена также обусловлен его биологическими свойствами. Этот поверхностный белок представляет интерес для создания вакцинных препаратов, так как к нему вырабатывается наиболее широкий спектр антител, включая вируснейтрализующие [Liu et al., 2020]. Структурные белки M и N потенциально могут служить мишенями для включения в состав вакцин, однако в данном исследовании показано, что только S-белок обладает 100% протективной эффективностью [Должикова и соавт., 2024].

Нами был использован нативный вариант гликопротеина S, без дополнительной стабилизации. Результатом стабилизации (введения в последовательность гена двух пролинов) является сохранение S-белка в так называемой форме «до слияния» [Wrapp et al., 2020]. Для этого состояния характерно экспонирование одного или нескольких RBD доменов на поверхности тримера – «открытая» конформация. При этом часть эпитопов, присущих для нативной «закрытой» формы S-белка, закрывается. В этом случае иммунитет преимущественно формируется по отношению к RBD и, в меньшей степени, на остальные части молекулы. Это приводит к драматическому падению

вируснейтрализующей активности сывороток у вакцинированных препаратами mRNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (Pfizer/BioNTech), поскольку именно RBD является лидером по числу мутаций (более 30 мутаций содержит RBD штамма Омикрон и его сублинии), возникающих в процессе эволюции вируса (адаптация к рецептору ACE2, появление эскейп-мутаций, позволяющих вирусу распространяться среди иммунной части популяции) [Lara et al., 2022]. Таким образом, использование антигена в нативной форме является важным преимуществом вакцины «Гам-КОВИД-Вак», особенно в условиях появляющихся новых вариантов вируса SARS-CoV-2, вызывающих обеспокоенность.

Полученные рекомбинантные аденовирусы rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 были охарактеризованы по различным параметрам, результаты анализа которых подтвердили чистоту и функциональность. Высокая степень очистки способна обеспечить низкую реактогенность, а высокая экспрессия антигена – необходимую иммуногенность.

Иммуногенные свойства rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2, экспрессирующих ген полноразмерного гликопротеина S, изучены на лабораторных животных (мышьях). Было показано, что сконструированные рекомбинантные аденовирусные векторы индуцируют формирование сбалансированного адаптивного иммунитета. Уже через 14 дней после иммунизации отмечено наличие IgG специфических антител в достаточно высоком титре, который продолжает расти и к 42-му дню достигает значения 1:51200 для rAd26-S-CoV2 и 1:162550 для rAd5-S-CoV2.

Разница в значениях титра между аденовирусными векторами обусловлена их разной иммуногенностью, которая напрямую зависит от серотипа [Wang et al., 2023]. Аденовирусы вида *Mastadenovirus caesari*, к которым относится аденовирус человека 5 серотипа, обладают высокой иммуногенностью, эффективно активируют иммунную систему, тем самым усиливая иммунный ответ на несущий антиген [Marquez-Martinez et al., 2023]. Несмотря на то, что Ад26 явно уступает в иммуногенности перед Ад5 в моделях экспериментальных животных

[Liu et al., 2008; Abbink et al., 2007; Sadoff et al., 2021], у человека он обладает достаточно высокой эффективностью [Sadoff et al., 2021].

Детальный анализ гуморального иммунного ответа продемонстрировал, что специфические IgG антитела представлены всеми четырьмя изотипами с преобладанием изотипа IgG1 для rAd26-S-CoV2 и IgG1, IgG2a для rAd5-S-CoV2. Полученные данные также были подтверждены другими исследователями [Костин и соавт., 2022]. При сравнении добровольцев, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» или «КовиВак», только в образцах сывороток из группы «Гам-КОВИД-Вак» наряду с изотипом антител IgG1 были также обнаружены антитела изотипа IgG3.

Иммунизация животных препаратами рекомбинантных аденовирусов rAd26-S-CoV2 и rAd5-S-CoV2 повышает процент пролиферирующих как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-лимфоцитов после антигенной рестимуляции *in vitro*. Результаты исследования цитокинового профиля показали, что введение рекомбинантных аденовирусов активирует транскрипцию различных цитокинов, способствуя регуляции механизмов В- и Т-клеточного иммунного ответа. Через 21 день после введения обоих типов рекомбинантных векторов отмечена активация экспрессии ИФН γ – маркерного цитокина, отвечающего за реакции клеточного иммунитета, а также центрального регуляторного цитокина ИЛ-2. ИФН γ усиливает экспрессию молекул МНС I и II класса на макрофагах, моноцитах, дендритных клетках и поддерживает баланс Th1/Th2. Секреция ИЛ-12, который действует как ростовой фактор при активации Т-лимфоцитов, естественных киллеров, опосредует переход Th0 в Th1-клетки. Также оба рекомбинантных вектора активировали экспрессию ИЛ-4 и ИЛ-10. ИЛ-4 – маркерный цитокин Th2-клеток, обеспечивает дифференцировку Th0 в Th2. Обладая синергизмом в подавлении клеточного иммунитета, ИЛ-4 и ИЛ-10 принимают участие в регуляции баланса Th1/Th2. Таким образом, экспрессия ИФН γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-12 свидетельствует о функциональной активности обоих звеньев иммунитета.

Наши результаты соотносятся с данными, полученными при разработке зарубежных векторных вакцин: Ad26.COVS.S компании Johnson & Johnson и Ad5-

nCoV компании CanSino. Tostanoski L.H. et al. [Tostanoski et al., 2020] и Mercado N.B. et al. [Mercado et al., 2020] показали, что рекомбинантный Ад26, экспрессирующий ген стабилизированного белка S вируса SARS-CoV-2 (Ad26.COV2.S) после иммунизации животных индуцирует развитие адаптивного иммунного ответа. В исследованиях Wu S. et al. [Wu et al., 2020] показано, что рекомбинантный Ад5, экспрессирующий оптимизированный ген белка S вируса SARS-CoV-2 (Ad5-nCoV) также вызывает сильный гуморальный и клеточный иммунитет.

Учитывая данные, что рекомбинантные аденовирусы rAd26 и rAd5 оказывают разное воздействие на иммунную систему, нами на лабораторных животных (мышьях линии BALB/c) изучена стратегия гетерологичной прайм-буст иммунизации. Полученные результаты сравнительного изучения эффективности различных схем иммунизации показали сопоставимые уровни индукции синтеза специфических антител при гомологичной rAd5/rAd5 и гетерологичной rAd26/rAd5 стратегиях иммунизации. Однако лучший эффект обеспечивала гетерологичная стратегия. Показано, что праймирование иммунной системы рекомбинантным аденовирусом rAd26-S-CoV2 обеспечивает при последующем введении рекомбинантного аденовируса rAd5-S-CoV2 (через 21 день) значительное усиление иммунного ответа [Зубкова и соавт., 2024a].

Исходя из вышеизложенного, нами был разработан состав кандидатной комбинированной векторной вакцины для профилактики COVID-19, названной «Гам-КОВИД-Вак», и определена схема иммунизации. «Гам-КОВИД-Вак» производится в виде жидкого замороженного препарата, состоящего из двух компонентов. Компонент I содержит 1×10^{11} вирусных частиц rAd26-S-CoV2. Компонент II содержит 1×10^{11} вирусных частиц rAd5-S-CoV2. Вакцина предназначена для внутримышечного введения. Вакцинация проводится в режиме прайм-буст: вначале вводится компонент I, затем через 3 недели (21 день) вводится компонент II.

Кандидатная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» успешно прошла все этапы доклинических исследований, продемонстрировав свою безопасность, иммуногенность и защитную эффективность.

Токсикологические исследования включали в себя изучение острой, хронической, репродуктивной токсичности, эмбриотоксичности, иммунотоксичности, гиперчувствительности немедленного и замедленного типов, местно-раздражающего действия, аллергических реакций, а также биораспределение препарата в организме экспериментальных животных. Установлено отсутствие острой и хронической токсичности. Кандидатная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» не вызывает аллергических и иммунотоксических реакций, не обладает эмбриотоксическим и тератогенным эффектами.

Подобный высокий профиль безопасности ожидаем, поскольку ранее было показано, что аналогичная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома обладает низкой реактогенностью [Должикова и соавт., 2020].

Исследования иммуногенности проводили на различных видах животных (мыши, нечеловеческие приматы, игрунковые обезьяны). Показано, что вакцина «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует формирование напряженного гуморального и клеточного иммунитета. Выявлен дозозависимый характер иммунного ответа – по мере повышения дозы препарата возрастал титр специфических антител. Установлено, что ответ на праймирующую иммунизацию компонентом I (rAd26-S-CoV2) характеризуется постепенным повышением уровня специфических IgG антител с 7-го по 21-й день. Вторая, бустирующая, иммунизация компонентом II (rAd5-S-CoV2) на 21-й день приводит к значительному увеличению титра IgG антител, в том числе вируснейтрализующих, уже через 7 дней после введения. Титр антител претерпевает значительный подъем к 42-му дню (более чем в 60 раз) при условии бустирующей иммунизации. Иммунный ответ на иммунизацию компонентом I или компонентом II характеризуется постепенным повышением уровня специфических IgG антител с 14-го по 42-й день в 5-8 раз. Бустирующая иммунизация, кроме того, приводила к сохранению высокого уровня

специфических антител, в том числе и вируснейтрализующих, в течение не менее 7 месяцев.

Одной из основных задач при планировании доклинических исследований по изучению вакцин является выбор оптимальной экспериментальной животной модели. На момент распространения COVID-19 научное сообщество уже имело представление о животных моделях для исследования этого нового заболевания – трансгенные мыши, экспрессирующие ангиотензинпревращающий фермент 2 человека (hACE2). Однако на время начала разработки вакцины в России не было этой модели, поэтому в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России разработана модель летальной инфекции на золотистых сирийских хомячках с индуцированным иммунодефицитом [Гроусова, 2024]. При использовании данной модели вакцинированные животные продемонстрировали полную устойчивость к летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1, исключая какие-либо клинические признаки заболевания и репликацию активного вируса в дыхательных путях. Протективная активность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» обеспечивает защиту 100% hACE2-трансгенных мышей от летальной инфекции SARS-CoV-2.

На основании данных доклинических исследований получено разрешение на проведение клинических исследований.

В соответствии с утвержденными протоколами в данной работе было проведено три самостоятельных клинических исследования.

Первое исследование проходило как открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» при участии здоровых добровольцев. Проведенное клиническое исследование вакцины «Гам-КОВИД-Вак» с участием добровольцев в возрасте 18-60 лет (всего 38 добровольцев) проходило в два этапа. Результаты первого этапа клинического исследования (когда исследовали безопасность и иммуногенность отдельных компонентов вакцины) показали, что вакцина была безопасной и хорошо переносилась добровольцами, не вызывая серьезных побочных эффектов или тяжелой реактогенности. Вакцинальные реакции были слабой и средней степени

выраженности. Следует отметить преобладание местных реакций в структуре всех выявленных нежелательных явлений после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак», которые были представлены болью в месте введения препарата, зудом в месте введения и гипертермией. Подобный профиль поствакцинальных реакций характерен для вакцин, основанных на рекомбинантных вирусных векторах [Zhu et al., 2020a; Zhu et al., 2020b; Sadoff et al., 2021; Sadoff et al., 2022; Tsuchiya et al., 2023]. У 100% добровольцев, получивших компонент I, и 88,89% добровольцев, получивших компонент II, выявлены изменения в иммунологическом статусе. Поскольку иммунизация компонентами вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на основе аденовирусных векторов вызывает процесс, аналогичный вирусному инфекционному процессу, изменение в иммунограмме, в частности снижение числа естественных киллеров, может свидетельствовать о затухании воспалительного процесса, вызванного вакцинацией. Выявленные изменения в иммунном статусе не приводят к нарушениям в функционировании иммунной системы. Полученные нами данные также подтверждаются другими исследователями [Инвиева и соавт., 2022].

В ходе проведенного нами исследования не было обнаружено отрицательного воздействия компонентов вакцины на основные физиологические параметры, результаты общеклинических и биохимических исследований крови и мочи. Анализ электрокардиограмм, направленный на выявление кардиотоксических эффектов, в частности нарушений сердечной проводимости, не выявил каких-либо аномалий.

На этом этапе также проводили оценку иммуногенности компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак». При оценке иммунологической эффективности использовали методологический подход на основе сравнения показателей напряженности иммунного ответа со значениями показателей до введения исследуемого препарата. Для адекватной оценки иммуногенности компонентов вакцины использовали несколько иммунологических тестов: определение титра IgG антител специфичных к RBD-домену белка S вируса SARS-CoV-2, нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 и вируснейтрализующих антител

к аденовирусным векторам, а также определение процента пролиферирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов периферической крови и прироста концентрации ИФН γ в культуре Т-лимфоцитов.

Иммунизация компонентом I или II способна вызвать формирование напряженного антиген-специфического гуморального и клеточного звена противоинфекционного иммунитета, что подтверждается высокой степенью статистической достоверности в измеряемых параметрах до и после иммунизации. Сформированные иммунные ответы отличались высоким уровнем, поскольку у всех добровольцев (100%) к 28-му дню наблюдали титры специфических IgG антител на уровне 1:800 и выше. Кроме того, у значительной доли добровольцев (66,67%) были выявлены ВНА. Также отмечено существенное увеличение вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов (77,78%).

Одним из факторов, который может оказывать негативное влияние на иммунологическую эффективность рекомбинантных аденовирусов, является предсуществующий иммунный ответ на используемый вектор, Ад5 или Ад26. Проведенный нами корреляционный анализ – сравнение титра ВНА к rAd26 и rAd5 с показателями напряженности гуморального иммунного ответа – показал, что наличие предсуществующего иммунного ответа к векторам не оказывает влияние на напряженность S-специфического иммунного ответа при введении одного из компонентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак». Полученные результаты согласуются с данными других клинических исследований вакцин на основе аденовирусов человека 5 и 26 серотипов. По результатам I фазы клинических исследований вакцины Ad5-nCoV компании CanSino показано, что, несмотря на наличие высокого предсуществующего иммунитета к Ад5, иммунные ответы к вирусу SARS-CoV-2 на 28-й день исследования наблюдали у 60%, 84% и 100% добровольцев получивших дозу 5×10^{10} , 1×10^{11} и $1,5 \times 10^{11}$ в.ч., соответственно [Zhu et al., 2020]. Уровни нейтрализующих антител к Ад26 не коррелировали с уровнями нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 ни на 29-й, ни на 71-й день [Sadoff et al., 2021; Le Gars et al., 2022]. Анализ III фазы клинического исследования вакцины Ad26.COV2.S (NCT04505722) показал отсутствие влияния

иммунитета к Ад26 на развитие иммунных реакций, вызванных вакцинацией. Среди вакцинированных в Бразилии и Южной Африке, 31% и 66% соответственно, имели нейтрализующие антитела к Ад26, при этом они имели одинаковые уровни поствакцинальных S-специфических антител [Le Gars et al., 2022].

Хорошая переносимость компонентов вакцины позволила перейти ко второму этапу – оценке безопасности, переносимости и иммуногенности вакцины при способе введения, который предполагается в клинической практике.

В ходе второго этапа исследования (введение вакцины в режиме прайм-буст: Компонент I и компонент II с интервалом в 21 день) у 95% участников наблюдались общие нарушения и реакции в месте введения, у 100% добровольцев выявлены отклонения в иммунологическом статусе, в общем анализе крови и мочи. Большинство местных реакций имели слабовыраженный характер и не оказывали существенного влияния на общее состояние. В целом можно сказать, что выявленные в ходе второго этапа исследования нежелательные явления характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов.

По результатам оценки иммунологической эффективности показано, что иммунизация в режиме прайм-буст вакциной «Гам-КОВИД-Вак» вызывает значительно более высокие титры IgG антител (1:5382) по сравнению с иммунизацией компонентом I (1:1866) или II (1:2352), и тем самым демонстрирует преимущества бустерной схемы вакцинации и позволяет рекомендовать ее для дальнейшей клинической практики. Антиген-специфичные IgG антитела, в том числе вируснейтрализующие, детектируются у 100% добровольцев. При сравнении титров IgG антител у вакцинированных добровольцев на 28-й день от начала вакцинации с титрами у реконвалесцентов после COVID-19 (реконвалесценты, у которых заболевание протекало в легкой и средней форме, через месяц после полного выздоровления) показано превышение титров более чем в 4 раза. Иммунизация в режиме прай-буст формирует клеточный антиген-специфический иммунитет большей напряженности по сравнению с иммунизацией отдельными компонентами.

Следующее исследование проходило как открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» при участии здоровых добровольцев в возрастной группе старше 60 лет. В ходе исследования, включая 180-дневный период наблюдения, было зарегистрировано в общей сложности 55 НЯ у 29 (26,61%) добровольцев. Количество СНЯ составило 2 у 2 (1,83%) добровольцев. К ним относились фибрилляция предсердий и коронавирусная инфекция COVID-19. Оба случая СНЯ были средней степени тяжести, были не связаны с исследуемым препаратом, разрешились выздоровлением, не требовали досрочного прекращения или выведения добровольца из исследования. У 14,68% участников исследования наиболее часто наблюдались общие нарушения и реакции в месте введения. Реже встречались НЯ категорий «Инфекции и инвазии» (у 5,50% добровольцев), отклонения в «Лабораторных и инструментальных данных» (у 3,67% участников), а также «Нарушения со стороны сердца», зарегистрированные у 2,75% добровольцев. Остальные категории НЯ встречались у менее чем 2% добровольцев. Аллергические реакции на исследуемый препарат не отмечались. Стоит отметить, что нежелательные явления у добровольцев старше 60 лет регистрировались в два раза реже, чем у добровольцев в возрасте 18-60 лет. В целом можно сказать, что выявленные в ходе этого исследования нежелательные явления характерны для большинства вакцинных лекарственных препаратов.

По результатам оценки иммунологической эффективности показано, что иммунизация в режиме прайм-буст вакциной «Гам-КОВИД-Вак» приводит к формированию специфических IgG антител с титром 1:3115,82 на 42-й день после иммунизации. Антиген-специфичные IgG антитела детектируются у 100% добровольцев. ВНА детектируются у 94,3% добровольцев. Иммунизация в режиме прайм-буст вакциной «Гам-КОВИД-Вак» способна вызвать формирование напряженного антиген-специфического клеточного звена противoinфекционного иммунитета у добровольцев возрастной группы старше 60 лет (на основании данных лимфопролиферативного ответа, а также секреции

ИФНγ), что подтверждается высокой степенью статистической достоверности в измеряемых параметрах до и после иммунизации.

По результатам проведенных клинических исследований вакцина «Гам-КОВИД-Вак» получила временную регистрацию 11 августа 2020 года в рамках действующего постановления Правительства РФ №441 (регистрационный номер ЛП-006395 (приложение В)) и стала первой в мире зарегистрированной вакциной для профилактики COVID-19.

Полученные нами результаты эффективности использования вакцинации в режиме прайм-буст были применены другими разработчиками вакцин для профилактики COVID-19. В 2021 году ВОЗ рекомендовало следующие гетерологичные схемы прайм-буст вакцинации: инактивированная вакцина – праймирующая иммунизация, векторная или мРНК-вакцина – бустирующая иммунизация; векторная – праймирующая иммунизация, мРНК – бустирующая иммунизация; мРНК – праймирующая иммунизация, векторная – бустирующая иммунизация. Целесообразность такой стратегии иммунизации в последнее время продемонстрирована во многих исследованиях [Skowronski et al., 2022; Normark et al., 2021; Sapkota et al., 2022; Launay, Thill, 2022; Nguyen et al., 2022; Ho et al., 2021; Benning et al., 2021; Cohen et al., 2022].

Дальнейшее изучение вакцины проходило в рамках пострегистрационного клинического исследования как рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое клиническое исследование эффективности, иммуногенности и безопасности комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в параллельных группах в профилактике коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.

Оценка реактогенности «Гам-КОВИД-Вак» показала, что вакцина хорошо переносилась добровольцами. Ожидаемые побочные местные и системные реакции регистрировались как у добровольцев из группы вакцина, так и из группы плацебо. Вакцина обладала низкой реактогенностью, так как через 7 дней после введения каждого компонента местные и общие поствакцинальные реакции наблюдали у 39,6% добровольцев. В группе плацебо аналогичные реакции

регистрировались у 16,3%. Следует отметить, что на введение первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» прослеживается тенденция большего выявления общего нарушения в виде гриппоподобного заболевания (21,3%) по сравнению со вторым компонентом вакцины (15,1%). При этом у добровольцев группы плацебо достоверно чаще ($p < 0,001$) регистрировались вирусная пневмония (0,8%), по сравнению с добровольцами, получившими вакцину (0,2%).

Результаты регистрации нежелательных явлений в течение 6 месяцев после вакцинации были легкой степени тяжести и наблюдались немного чаще в вакциновой группе (51,9%) по сравнению с контрольной (42,7%). НЯ умеренной степени выявляли чаще в группе привитых вакциной (13,1%) по сравнению с группой получивших плацебо (5,9%). Несколько тяжелых побочных явлений наблюдались одинаково часто в вакциновой и контрольной группах.

Ни один из эпизодов СНЯ не имел связь с применением вакцины или плацебо.

Следует отметить, что наиболее разнообразный спектр системных реакций и процент лиц, у которых отмечались те или иные симптомы, был зарегистрирован в группе привитых вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Анализ клинических проявлений местного характера показал, что у 35,3% привитых реакции в месте введения вакцины отмечались непосредственно после инъекции. Оценка общего вакцинального процесса свидетельствует, что 92,9% добровольцев переносили вакцинацию без температуры. Полученные результаты позволяют утверждать, что вакцина «Гам-КОВИД-Вак» для профилактики COVID-19 имеет благоприятный профиль безопасности.

Полученные нами результаты не противоречат данным других исследователей, которые изучали безопасность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в ходе массовой вакцинации населения против COVID-19. По данным Национального медицинского исследовательского центра терапии и профилактической медицины, получены сведения о благоприятном профиле переносимости и безопасности [Драпкина и соавт., 2021]. В проспективном исследовании переносимости вакцины среди студентов г. Краснодара

продемонстрирован схожий профиль безопасности [Сутовская и соавт., 2022]. Вакцинация беременных показала благоприятные результаты, ни у одной пациентки не возникло побочных реакций и осложнений беременности и родов, требующих предоставления медицинской помощи [Свиридова и соавт., 2021]. В рамках проспективного наблюдательного исследования, проводимого на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России, вакцина «Гам-КОВИД-Вак» не вызывала серьезных нежелательных явлений. В наблюдаемом периоде (2 месяца) не выявлено ни одного случая миокардита, перикардита, либо повреждения печени, не зарегистрировано случаев артериального или венозного тромбоза. Возникшие местные и системные реакции были кратковременны и не потребовали госпитализации [Драпкина и соавт., 2022]. Анализ безопасности вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в ходе массовой вакцинации реципиентов Дальневосточного федерального округа характеризовался приемлемым уровнем реактогенности, сопоставимым с другими векторными вакцинами [Мамровская и соавт., 2021].

По результатам оценки поствакцинального гуморального иммунного ответа установлен достаточно высокий уровень IgG к вирусу SARS-CoV-2 через 42 дня после иммунизации в режиме прайм-буст вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Среднее геометрическое значение титра IgG составило 1:9070, уровень сероконверсии – 99,41%. ВНА к вирусу SARS-CoV-2 были определены у 87,37% добровольцев, СГТ=1:36,65. В группе плацебо специфичные IgG определялись у 11,04% добровольцев, СГТ был минимальным и равен 1:46,74. Отмечено естественное снижение защитных титров антител в динамике. Через 6 месяцев после вакцинации СГТ=1:1729, при этом уровень сероконверсии составил 94,92%. К 180-му дню также наблюдается статистически достоверное снижение титра ВНА (СГТ=24,99). У подавляющего большинства вакцинированных лиц молодого, среднего и пожилого возраста сформировался напряженный гуморальный иммунный ответ. Высокие уровни антител, в том числе вируснейтрализующих, наблюдались у добровольцев более молодого возраста (до 40 лет) вне

зависимости от пола. В ходе проведенного исследования не обнаружено существенных различий в иммунном ответе в зависимости от пола и возраста, данные результаты сопоставимы с результатами, полученными в других исследованиях [Жолондзь и соавт., 2022; Андреев и соавт., 2022; Чистякова и соавт., 2022].

В нашем исследовании со временем у всех добровольцев детектировали снижение титра антител, что свидетельствует о необходимости проведения ревакцинации через 6 месяцев. К аналогичному выводу приходят также и другие исследователи [Кириллов и соавт., 2022; Андреев и соавт., 2022].

При оценке поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа были получены следующие результаты: у 94,7% обнаружены антиген-специфичные CD4+ Т-лимфоциты и 78,95% добровольцев – CD8+. На 28-й день исследования (через 7 дней после введения второго компонента вакцины) у всех участников из группы вакцинированных наблюдали значительно более высокие уровни экспрессии ИФН γ при повторной стимуляции антигеном (медиана 36,14 пг/мл (95% ДИ: 16,88-74,69)) по сравнению с исходным значением (до вакцинации). У добровольцев из группы плацебо не выявлен специфический Т-клеточный иммунный ответ. Полученные нами результаты не противоречат данным других исследователей, которые изучали особенности формирования клеточного иммунитета [Платонова и соавт., 2022; Потеряев и соавт., 2021; Ключева и соавт., 2024]. В исследованиях Платоновой Т.А. у 95,8% участников исследования детектирован Т-клеточный иммунитет после вакцинации, в том числе у лиц без серопротекции по IgG [Платонова и соавт., 2021]. Платонова Т.А. также сравнила Т-клеточный иммунитет у переболевших и вакцинированных и получила следующие результаты: Т-клеточный иммунитет был выявлен у 95,6% вакцинированных и у 100% переболевших. У переболевших более выраженный ответ был на М- и N-белки, по сравнению с S-белком. У вакцинированных Т-клеточный ответ формировался только на стимуляцию S-белком, что соответствует составу используемой вакцины [Платонова и соавт., 2022].

Проведённое пострегистрационное клиническое исследование подтвердило высокую эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» против COVID-19, которое выразалось в уменьшении количества заражений, госпитализаций и летальных исходов среди вакцинированных в сопоставлении с группой, получавшей плацебо. Эпидемиологическая эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» по результатам наших исследований составила 70,5%. При сравнении эффективности вакцины между мужчинами и женщинами и разными возрастными стратами статистически значимой разницы не обнаружено. Фактор наличия сопутствующих заболеваний и возраст имели статистически значимую ассоциацию с риском заболевания COVID-19. Расчетная эффективность вакцины в предотвращении легкого заболевания составляет 59,2%. С наибольшей эффективностью вакцина защищает от средней и тяжелой форм заболевания: 89,9% и 85,9% соответственно. В предотвращении тяжелого заболевания COVID-19 эффективность составляет 67,5%, однако оценить достоверность не представляется возможным из-за малого числа событий (по 2 случая в каждой группе).

Сходные результаты были получены в других исследованиях. В проспективном когортном исследовании, проводившемся на базе перепрофилированной клиники им. Е.М. Тареева с 26.10.2021 по 31.12.2021 гг., показано, что летальность вакцинированных пациентов была достоверно ниже, чем среди госпитализированных больных, не прошедших вакцинацию (6,9% и 17,3% соответственно). Вакцинация «Гам-КОВИД-Вак» снижает риск смерти от любых причин во время пребывания в стационаре примерно на 60% [Надточеева и соавт., 2022]. В исследовании эффективности вакцинации работников ОАО «РЖД» эффективность вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» против заболевания COVID-19 составила 97,8%, против госпитализации с COVID-19 – 97,5%, против летальности от COVID-19 оказалась на уровне 95,2% [Костенко и соавт., 2022]. По результатам ретроспективных исследований в Республике Беларусь эпидемиологическая эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» составила 96,3% [Ala et al., 2021].

Интересные результаты получены в исследовании сравнительной эффективности векторных и мРНК вакцин, сделанном в Венгрии. Согласно этим данным, защитная эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» в предотвращении симптоматической инфекции составила 86%, а способность предотвращать смерти, связанные с COVID-19 – 97%, и эти показатели превосходят аналогичные для других вакцин [Vokó et al., 2022]. На основании анализа данных клинических исследований, проведенных в Бахрейне, эффективность вакцины в предотвращении смертей превышает 90% [AlQahtani et al., 2021]. В Иране скорректированная эффективность оценивалась в 95% [Heidarzadeh et al., 2023]. Согласно проведенному исследованию в Аргентине, эффективность против летального исхода COVID-19 составила 93,3%.

Кроме того, показана высокая эффективность вакцины для лиц с сопутствующими заболеваниями. Так, у вакцинированных пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями частота развития COVID-19 составила 7,7%, при этом отмечено легкое течение инфекции [Куликов и соавт., 2022]. Вакцинация «Гам-КОВИД-Вак» 2134 больных с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями привела к снижению заболеваемости COVID-19 с 26,2 до 0,25% и предотвращению летальных исходов среди иммунизированных лиц (смертность среди неиммунизированных составила 2,8%; $p < 0,0001$) [Gaydukova et al., 2022]. Согласно исследованию, проведенном в Аргентине, вакцинация людей с указанным выше заболеванием в анамнезе способствовала бессимптомному или легкому течению COVID-19 в 85,9% случаев [Isnardi et al., 2022].

Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» рекомендуется всем онкологическим больным, не только завершившим противоопухолевое лечение, вне зависимости от стадии и формы заболевания, а также больным в процессе противоопухолевого лечения¹.

¹ Временные методические рекомендации «Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19» от 24.07.2021 г. МЗ РФ и ФГБУ «НМИЦ ТПМ» МЗ РФ.

Эпидемиологическая эффективность «Гам-КОВИД-Вак» в когорте ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих противовирусную терапию, составила 76,33% [Gushchin et al., 2022].

По результатам проведенных пострегистрационных клинических исследований вакцина «Гам-КОВИД-Вак» получила постоянную регистрацию 11 января 2022 года (приложение В) и включена в Национальный календарь профилактических прививок РФ по эпидемическим показаниям (приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2021 г. № 1122н).

Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» зарегистрирована в 74 странах мира. В РФ в гражданский оборот вышло свыше 126 миллионов доз компонента I и свыше 105 миллионов доз компонента II.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного диссертационного исследования разработана рекомбинантная векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» (торговое название – Спутник V). Для этого на первом этапе сконструированы рекомбинантные аденовирусные векторы Ад26 и Ад5, экспрессирующие ген гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2. В исследованиях с использованием лабораторных животных, включая приматов, было показано, что рекомбинантные аденовирусные конструкции обладают высокой иммуногенностью и защитной эффективностью в предложенном порядке введения векторов (первый компонент – Ad26-S-CoV2, второй компонент – Ad5-S-CoV2), интервале (21 день) и дозах. В доклинических токсикологических исследованиях было показано, что предложенная вакцинная формуляция обладает хорошим профилем безопасности.

На основании проведенных доклинических исследований Минздравом России был выдан ряд последовательных разрешений на проведение клинических исследований вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (разрешение №241 от 16.06.2020 г. и разрешение №450 от 25.08.2020 г.). В ходе реализации первого протокола клинических исследований I-II фазы в отношении здоровых добровольцев (18-60 лет) была показана высокая иммуногенность, безопасность и низкая реактогенность вакцины «Гам-КОВИД-Вак». Дополнительные клинические исследования I-II фазы были проведены с участием добровольцев старше 60 лет, где также были продемонстрированы безопасность и иммуногенность вакцины «Гам-КОВИД-Вак». По результатам исследований I-II фазы в отношении здоровых добровольцев (18-60 лет), с учетом чрезвычайной ситуации и в соответствии с принятым Постановлением Правительства №441, Минздравом России 11 августа 2020 года было принято решение о регистрации вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (на условиях проведения исследований III фазы параллельно с гражданским оборотом вакцины). Протокол третьей фазы стартовал 7 сентября 2020 г. В исследование было включено 33864 человека. Результаты данного исследования показали, что вакцина имеет благоприятный профиль безопасности

и обладает высокой эффективностью (эффективность вакцины через 2,5 месяца составила 91,6%, через 180 дней – 70,2%). 11 января 2022 года вакцина «Гам-КОВИД-Вак» получила постоянное регистрационное удостоверение (ЛП-006395) и включена в Национальный календарь профилактических прививок РФ по эпидемическим показаниям (приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2021 г. № 1122н). В РФ вакцину «Гам-КОВИД-Вак» получили около 80 млн человек.

Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» под торговым названием Спутник V также была зарегистрирована в других странах мира. 74 страны разрешили ее применение в условиях чрезвычайной ситуации. По данным Российского фонда прямых инвестиций, более 100 млн человек было вакцинировано за пределами РФ.

ВЫВОДЫ

1. Впервые сконструированы рекомбинантные репликативно-дефектные векторы на основе аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующие гликопротеин S коронавируса SARS-CoV-2. Определена оптимальная схема иммунизации в режиме прайм (rAd26-S-CoV2) – буст (rAd5-S-CoV2) с интервалом в 21 день, обеспечивающая 100% защиту животных (хомяки, трансгенные мыши) в условиях экспериментального заражения.

2. В доклинических исследованиях безопасности кандидатной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» показано отсутствие токсичности при однократном и повторном введении, аллергизирующего и иммунотоксического действия, репродуктивной токсичности, эмбриотоксических и тератогенных свойств.

3. Клинические исследования I-II фазы у добровольцев 18-60 лет продемонстрировали безопасность, низкую реактогенность и иммунологическую эффективность вакцины. При иммунизации в режиме прайм-буст детектировано образование антиген-специфичных IgG антител и вируснейтрализующих антител у 100% добровольцев, антиген-специфичных клеток обеих популяций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов у 85% и ИФН γ у 90% добровольцев (повышение по крайней мере одного из трех показателей CD4+/CD8+/ ИФН γ клеточного иммунитета было обнаружено у 100% добровольцев).

4. Вакцинация добровольцев в возрастной группе старше 60 лет вакциной «Гам-КОВИД-Вак» безопасна и способна приводить к образованию антиген-специфичных IgG антител у 100% добровольцев, вируснейтрализующих антител у 93,33% добровольцев, антиген-специфичных CD4+ Т-лимфоцитов у 83,33% добровольцев, CD8+ Т-лимфоцитов у 80% и ИФН γ у 76,67% добровольцев (повышение по крайней мере одного из трех показателей CD4+/CD8+/ ИФН γ клеточного иммунитета было обнаружено у 100% добровольцев).

5. По результатам пострегистрационного клинического исследования комбинированная векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» обладает благоприятным профилем безопасности. За время исследования было

зафиксировано 545 эпизодов серьезных нежелательных явлений: 384 (1,5%) в группе «вакцина» и 161 (1,9%) в группе плацебо (при рандомизации в соотношении 3:1). Ни один из эпизодов не имел связи с применением вакцины или плацебо.

6. Иммунизация добровольцев комбинированной векторной вакциной «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует образование антиген-специфичных IgG антител у 99% и вируснейтрализующих антител более чем у 94% вакцинированных, что указывает высокую иммуногенность данного препарата.

7. Иммунизация в режиме прайм-буст вакциной «Гам-КОВИД-Вак» приводит к достоверно меньшей заболеваемости, чем в группе плацебо. Эпидемиологическая эффективность вакцины через 2,5 месяца составила 91,6%, через 180 дней – 70,5%.

8. По результатам проведенных клинических исследований впервые зарегистрирована для медицинского применения и введена в гражданский оборот комбинированная векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» (ЛП-006395).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ад (Ad) – аденовирус

Ад ВНА – аденовирус-нейтрализующие антитела

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АПК – антигенпрезентирующие клетки

АСТ – аспаратаминотрансфераза

в.ч. – вирусная частица

ВИТТ – вакцинно-индуцированная иммунная тромбоцитическая тромбоцитопения

ВНА – вируснейтрализующие антитела

ГМ-КСФ – гранулоцитарный-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДИ – доверительный интервал

ДКИ – доклинические исследования

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ-10 – интерлейкин 10

ИЛ-1 β – интерлейкин 1 β

ИЛ-2 – интерлейкин 2

ИЛ-7 – интерлейкин 7

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН α – интерферон α

ИФН β – интерферон β

ИФН γ – интерферон γ

КИ – клинические исследования

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

мРНК – матричная РНК

НЯ – нежелательные явления

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ОРС – открытая рамка считывания

ПААГ – полиакриламидный гель

РНК – рибонуклеиновая кислота

СГТ – средний геометрический титр
СК-МВ – креатинкиназа-МВ
СНЯ – серьезные нежелательные явления
СРБ – С-реактивный белок
ФНО α – фактор некроза опухоли α
АСЕ2 – ангиотензин-превращающий фермент 2
САI – индекс адаптации кодонов
сGAS – циклическая гуанозинмонофосфат-АМФ-синтаза
СМV – цитомегаловирус
СТ – цитоплазматический домен
СТD – С-концевой домен
ЕМА – европейское агентство по лекарственным средствам
ЕРGIC – промежуточный компартмент эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи
FDA – управление по контролю за продуктами и лекарствами США
FP – пептид слияния
HR – гептадный повтор
IgG – иммуноглобулины класса G
IgM – иммуноглобулины класса M
IP-10 – ИФН γ -индуцируемый белок 10
MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1
MHC – главный комплекс гистосовместимости
MVA – модифицированный вирус осповакцины штамма Анкара
NF- κ B – ядерный фактор κ B
NK – натуральные киллеры
nsр – неструктурный белок
NTD – N-концевой домен
rAd – репликативно-дефектный аденовирусный вектор
RBD – рецептор-связывающий домен
RNP – рибонуклеопротеиновый комплекс

Sf9 – клетки насекомых

TLR – Toll-подобные рецепторы

TM – трансмембранный домен

TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2-го типа

TRS – последовательности, регулирующие транскрипцию

UTR – нетранслируемая область

VSV – вирус везикулярного стоматита

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакушина Е.В. Иммунологические аспекты коронавирусной болезни, вызванной SARS-COV-2. / Абакушина Е.В. // Гены & Клетки. – 2020. – Т. XV. – № 3. – С. 14-21.
2. Андреев А.И. Взаимосвязь между возрастом и напряженностью поствакцинального гуморального иммунного ответа у лиц, ранее переболевших COVID-19. / Андреев А.И., Андреев И.В., Нечай К.О., Есаулова Д.Р., Баклакова О.С., Вечорко В.И., Шиловский И.П., Кофиади И.А., Гудима Г.О., Мартынов А.И., Смирнов В.В., Кудлай Д.А., Хайтов М.Р. // Иммунология. – 2022. – Т. 43. – № 5. – С. 583-592.
3. Андреев И.В. Поствакцинальный и постинфекционный гуморальный иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2. / Андреев И.В., Нечай К.О., Андреев А.И., Зубарёва А.П., Есаулова Д.Р., Аленова А.М., Николаева И.А., Чернявская О.П., Ломоносов К.С., Шульженко А.Е., Курбачева О.М., Латышева Е.А., Шартанова Н.В., Назарова Е.В., Романова Л.В., Черченко Н.Г., Смирнов В.В., Аверков О.В., Мартынов А.И., Вечорко В.И., Гудима Г.О., Кудлай Д.А., Хайтов М.Р., Хайтов Р.М. // Иммунология. – 2022. – Т. 43. – № 1. – С. 18-32.
4. Атауллаханов Р.И. Исследование антигенной специфичности Т-клеточных иммунных реакций в ответ на иммунизацию лабораторных мышей рекомбинантным аденовирусным вектором, кодирующим Spike-белок SARS-CoV-2. / Атауллаханов Р.И., Ушакова Е.И., Пичугин А.В., Лебедева Е.С., Иванов С.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Щербинин Д.Н., Банделюк А.С., Зубкова О.В., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // Иммунология. – 2023. – Т. 44. – № 5. – С. 557-74.
5. Бобик Т.В. COVID-19 в России: клинические и иммунологические особенности пациентов первой волны. / Бобик Т.В., Костин Н.Н., Скрябин Г.А., Цабай П.Н., Симонова М.А., Кнорре В.Д., Стратиенко О.Н., Алешенко Н.Л., Воробьев И.И., Хурс Е.Н., Мокрушина Ю.А., Смирнов И.В., Алехин А.И., Никитин А.Э., Габибов А.Г. // Acta Naturae. – 2021. – Т. 13. – № 1. – С. 102-115.

6. Болдырева М.Н. Вирус SARS-CoV-2 и другие эпидемические коронавирусы: патогенетические и генетические факторы развития инфекций. / Болдырева М.Н. // Иммунология. – 2020. – Т. 41. – № 3. – С. 197-205.
7. Вавилова И.В. Исследование тропизма и биораспределения рекомбинантного аденовируса обезьян 25-го серотипа *in vitro* и *in vivo*. / Вавилова И.В., Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Попова О., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Зрелкин Д.И., Джаруллаева А.Ш., Должикова И.В., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2024. – Т. 101. – № 5. – С. 594–605.
8. Горенков Д.В. Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: в-короновирусы как угроза глобальному здравоохранению. / Горенков Д.В., Хантимирова Л.М., Шевцов В.А., Рукавишников А.В., Меркулов В.А., Олефир Ю.В. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. – Т. 20. – № 1. – С. 6-20.
9. Гроусова Д.М. Оценка эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в отношении различных вариантов вируса SARS-CoV-2 на экспериментальных моделях. // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи. Москва. – 2024.
10. Должикова И.В. Доклинические исследования иммуногенности, протективности и безопасности комбинированной векторной вакцины для профилактики ближневосточного респираторного синдрома. / Должикова И.В., Гроусова Д.М., Зубкова О.В., Тухватулин А.И., Ковыршина А.В., Лубенец Н.Л., Ожаровская Т.А., Попова О., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Евграфова И.М., Недорубов А.А., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Мишин Д.В., Логинова С.Я., Борисевич С.В., Дерябин П.Г., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // ACTA NATURAE. – 2020. – Т. 12. – № 3. – С. 114-123.
11. Должикова И.В. Протективный потенциал структурных белков вируса SARS-CoV-2 в защите от COVID-19. / Должикова И.В., Гроусова Д.М., Зорков И.Д.,

- Илюхина А.А., Ковыршина А.В., Зубкова О.В., Попова О.Д., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Савина Д.М., Самохвалова Е.Г., Тухватулин А.И., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.– 2024. – Т. 101. –№ 6. –С. 769–778.
12. Драпкина О.М. Реактогенность различных схем вакцинации против COVID-19. / Драпкина О.М., Бернс С.А., Горшков А.Ю., Рыжакова Л.Н., Жданова О.В., Чащин М. Г., Литинская О.А. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21. – № 12. – С. 3476.
13. Драпкина О.М. Первый опыт применения вакцины Гам-КОВИД-Вак «Спутник V» в условиях реальной клинической практики. / Драпкина О.М., Рыжакова Л.Н., Шишкова В.Н., Скрипникова И.А., Бернс С.А., Горшков А.Ю., Литинская О.А., Имамгазова К.Э., Лобачев И.М., Веретенникова А.В. // Профилактическая медицина. – 2021. – Т. 24. – № 10. – С. 53-60.
14. Драпкина О.М. Ассоциация гуморального иммунного статуса и параметров тромбодинамики после вакцинации Гам-КОВИДВак и КовиВак. / Драпкина О.М., Бернс С.А., Горшков А.Ю., Рыжакова Л.Н., Иванова А.А., Емельянов А.В., Воинова С.Н., Каратеев Р.А., Араблинский Н.А., Родионова А.А., Башняк В.С., Покровская М.С. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21. – № 6. – С. 3295.
15. Данилов А.Н. Предварительный анализ эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики COVID-19 на территории Саратовской области. /Данилов А.Н., Абрамян Т.Л., Мамонова И.А., Иришкова И.Е., Тейшерская Д.А. // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2022. – Т. 11. – № 1. – С. 34–40.
16. Зубкова О.В. Комплексная оценка иммунологической активности рекомбинантных AD26 и AD5, экспрессирующих ген S белка вируса SARS-COV-2. / Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Воронина Д.В., Зрелкин Д.И., Тухватулин А.И., Джаруллаева А.Ш., Должикова И.В., Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2024а. – №4. –С. 47-54.

17. Зубкова О.В. Исследование влияния оптимизации нуклеотидной последовательности целевого гена на иммуногенность рекомбинантного аденовирусного вектора. / Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Коробова Е.В., Голдовская П.П., Зрелкин Д.И., Щербинин Д.Н., Щепляков Д.В. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2024б. – Т. 42. – №4. – С. 43-48.
18. Жолондзь Н.Н. Опыт использования вакцины Гам-Ковид-Вак: влияние на гуморальный иммунный ответ и оценка ее безопасности. / Жолондзь Н.Н., Макаревич Е.М., Булкина В.Ю., Рукина Н.Ю., Краснова Н.А., Шкунова М.С., Денисов В.Р. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2022. – № 3. – С. 25-29.
19. Иванова И.А. Оценка формирования и напряженности адаптивного иммунитета у переболевших COVID-19. / Иванова И.А., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Омельченко Н.Д., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Березняк Е.А., Соколова Е.П., Носков А.К., Тотолян А.А. // Инфекция и иммунитет. – 2023. – Т. 13. – № 2. – С. 319-328.
20. Инвьяева Е.В. Клеточный и гуморальный иммунный ответ после введения комбинированной векторной вакцины Гам-Ковид-Вак. / Инвьяева Е.В., Вторушина В.В., Драпкина Ю.С., Кречетова Л.В., Долгушина Н.В., Хайдуков С.В. // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12. – № 6. – С. 1051-1060.
21. Костин Н.Н. ИФА-платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-COV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности. / Костин Н.Н., Бобик Т.В., Скрыбин Г.А., Симонова М.А., Кнорре В.Д., Абрикосова В.А., Мокрушина Ю.А., Смирнов И.В., Алешенко Н.Л., Круглова Н.А., Мазуров Д.В., Никитин А.Э., Габибов А.Г. // Acta Naturae. – 2022. – Т. 14. – № 3. – С. 109-119.
22. Кириллов И.А. Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак. / Кириллов И.А., Пирожков А.П., Рубцов В.В., Логинова С.Я., Сайфулина Н.А., Плеханова Т.М., Тимофеев М.А., Кутаев Д.А., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.,

- Борисевич С.В. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. – Т. 22. – № 4. – С. 435-445.
23. Ключева С.Н. Сравнительная характеристика клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 при инфекции и вакцинации. / Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Кравцов А.Л., Каштанова Т.Н., Кожевников В.А. // Медицинская иммунология. – 2024. – Т. 26. – № 2. – С. 345-354.
24. Ковыршина А.В. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. / Ковыршина А.В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Тухватулин А.И., Токарская Е.А., Симакова Я.В., Есмагамбетов И.Б., Щепляков Д.В., Евграфова И.М., Дерябин П.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Иммунология. – 2020. – Т. 41. – № 2. – С. 135-43.
25. Костенко Н.А. Оценка эффективности вакцинации сотрудников ОАО «Российские железные дороги» /. Костенко Н.А, Жидкова Е.А., Горяев А.А., Шаньгин И.В., Халтурина Д.А., Матвеев Ю.Н., Устюжанин В.В., Гуревич К.Г. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2022. – Т. 21. – № 5. – С. 29-37.
26. Куликов А.Н. Эффективность и безопасность вакцины Гам-КОВИД-Вак у пациентов с иммуновоспалительными ревматическими заболеваниями: предварительные данные проспективного наблюдения. / Куликов А.Н., Муравьева Н.В., Белов Б.С., Гриднева Г.И., Аронова Е.С. // Современная ревматология. – 2023. – Т. 17. – № 6. – С. 72-78.
27. Лобзин Ю.В. Современные тенденции инфекционной заболеваемости у детей в Российской Федерации. / Лобзин Ю.В., Рычкова С.В., Усков А.Н., Скрипченко Н.В., Федоров В.В. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2020. – Т. 27. – № 4. – С. 119–133.

28. Лобзин Ю.В. Инфекционные болезни – одна из ведущих проблем здравоохранения. / Лобзин Ю.В., Белозеров Е.С. // Морская медицина. – 2024. – Т. 10. – № 3. – С. 14-25.
29. Мамровская Т.П. Безопасность вакцинопрофилактики COVID-19: обзор литературы и собственный опыт применения. / Мамровская Т.П., Краснова Н.А., Пирог Л.В., Добрых В.А.. // Far Eastern Medical Journal. – 2021. – № 3. – С. 6-12.
30. Надточеева В.Б. Эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) в профилактике тяжелого течения COVID-19 и смерти у госпитализированных взрослых пациентов. / Надточеева В.Б., Буланов Н.М., Акулкина Л.А., Берзегова Т.К., Будко А.А., Калашников М.В., Моисеев А.С., Таирова Н.А., Тао Е.А., Твердохлебов Г.А., Филатова Е.Е., Чучин Г.К., Шахгильдян Н.В., Щепалина А.А., Суворов А.Ю., Кучиева А.М., Васильева М.П., Новиков П.И., Сорокин Ю.Д., Шоломова В.И., Бровко М.Ю., Моисеев С.В. // Клин фармакол тер. – 2022. – Т. 31. – № 2. – С. 20-26.
31. Сухова М.М. Вектор-нейтрализующая активность сывороточных антител при ревакцинации аденовирусной вакциной «Спутник Лайт». / Сухова М.М., Бязрова М.Г., Банделюк А.С., Зубкова О.В., Михайлов А.А., Прилипов А.Г., Шмаров М.М., Филатов А.В. // Иммунология. – 2024а. – Т. 45. – № 5. – С. 582–593.
32. Сухова М.М. Сравнение эффективности трансдукции дендритных клеток человека с помощью аденовирусных векторов различных серотипов. / Сухова М.М., Бязрова М.Г., Банделюк А.С., Зубкова О.В., Михайлов А.А., Прилипов А.Г., Шмаров М.М., Филатов А.В. // Иммунология. – 2024б. – Т. 45. – № 5. – С. 550–560.
33. Ожаровская Т.А. Иммуногенность различных форм гликопротеина S коронавируса ближневосточного респираторного синдрома. / Ожаровская Т.А., Зубкова О.В., Должикова И.В., Громова А.С., Гроусова Д.М., Тухватулин А.И., Попова О., Щебляков Д.В., Щербинин Д.Н., Джаруллаева А.Ш., Ерохова А.С.,

- Шмаров М.М., Логинова С.Я., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // *Acta naturae*. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 38-47.
34. Ожаровская Т.А. Разработка и характеристика векторной системы на основе аденовируса обезьян 25-го серотипа. / Ожаровская Т.А., Попова О., Зубкова О.В., Вавилова И.В., Почтовый А.А., Щепляков Д.В., Гушин В.А., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // *ВЕСТНИК РГМУ*. – 2023. – № 1. – С. 4-11.
35. Пащенко М.В. Иммуный ответ против эпидемических коронавирусов. / Пащенко М.В., Хайтов М.Р. // *Иммунология*. – 2020. – Т. 41. – № 1. – С. 5-18.
36. Платонова Т.А. Оценка специфического Т-клеточного иммунитета у переболевших и вакцинированных против COVID-19. / Платонова Т.А., Скляр М.С., Голубкова А.А., Семенов Т.А., Карбовничая Е.А., Чернышев М.А., Воробьев А.В., Смирнова С.С. // *Журнал инфектологии*. – 2022. – Т. 14. – № 1. – С. 96-104.
37. Потеряев Д.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2. / Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатъева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2021. – Т. 21. – № 3. – С. 178-192.
38. Свиридова А.В. Первичные данные о вакцинации беременных против коронавирусной инфекции. / Свиридова А.В., Константинова О.Д., Кшнясева С.К., Митрофанова И.В., Логинова Е.А., Уколова Е.С., Месяц Д.С., Мазуровская О.П., Демина Л.М., Сенникова Ж.В., Воронцова Н.А. // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2021. – Т. 12. – № 114. – С. 168-171.
39. Смирнов В.С. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции. / Смирнов В.С., Тотолян А.А. // *Инфекция и иммунитет*. – 2020. – Т. 10. – № 2. – С. 259-268.
40. Сутовская Д.В. Иммуногенность, эффективность и переносимость вакцины «Гам-КОВИД-Вак» среди студентов: проспективное исследование. / Сутовская

- Д.В., Бурлуцкая А.В., Дубова Л.В., Крылова Д.Р., Горбачева Л.В. // Педиатрическая фармакология. – 2022. – Т. 19. – № 2. – С. 196-200.
41. Харченко Е.П. Вакцины против Covid-19: сравнительная оценка рисков аденовирусных векторов. / Харченко Е.П. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2020. – Т. 19. – № 5. – С. 4-17.
42. Черенова Л.В. Разработка вакцин на основе аденовирусных векторов: обзор зарубежных клинических исследований. / Черенова Л.В., Каштиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. // Медицинская иммунология. – 2017а. – Т. 19. – № 2. – С. 111-126.
43. Черенова Л.В. Разработка вакцин на основе аденовирусных векторов: обзор зарубежных клинических исследований. / Черенова Л.В., Каштиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. // Медицинская иммунология. – 2017б. – Т. 19. – № 4. – С. 329-358.
44. Чистякова Г.Н. Формирование противоиногокционного и поствакцинального гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 у медицинских работников перинатального центра. / Чистякова Г.Н., Мальгина Г.Б., Устюжанин А.В., Ремизова И.И. // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12. – № 4. – С. 688-700.
45. Шестопапов А.М. Биоразнообразие и эпидемический потенциал коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) рукокрылых. / Шестопапов А.М., Кононова Ю.В., Гаджиев А.А., Гуляева М.А., Маранди М.В., Алексеев А.Ю., Джамалутдинов Д.М., Щелканов М.Ю. // Юг России: экология, развитие. – 2020. – Т. 15. – № 2. – С. 17-34.
46. Щелканов М.Ю. COVID-19: этиология, клиника, лечение. / Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А., Кружкова И.С., Малеев В.В. // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10. – № 3. – С. 421-445.
47. Abbink P. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. / Abbink P., Lemckert A.A., Ewald B.A., Lynch D.M., Denholtz M., Smits S., Holterman L., Damen I., Vogels R., Thorner A.R., O'Brien K.L., Carville A., Mansfield K.G.,

- Goudsmit J., Havenga M.J., Barouch D.H. // *J Virol.* – 2007. – Vol. 81. – № 9. – P. 4654-63.
48. Abbink P. Construction and evaluation of novel rhesus monkey adenovirus vaccine vectors. / Abbink P., Maxfield L.F., Ng'ang'a D., Borducchi E.N., Iampietro M.J., Bricault C.A., Teigler J.E., Blackmore S., Parenteau L., Wagh K., Handley S.A., Zhao G., Virgin H.W., Korber B., Barouch D.H. // *J Virol.* – 2015. – Vol. 89. – № 3. – P. 1512-22.
49. Abbink P. Rapid cloning of novel rhesus adenoviral vaccine vectors. / Abbink P., Kirilova M., Boyd M., Mercado N., Li Z., Nityanandam R., Nanayakkara O., Peterson R., Larocca R.A., Aid M., Tartaglia L., Mutetwa T., Blass E., Jetton D., Maxfield L.F., Borducchi E.N., Badamchi-Zadeh A., Handley S., Zhao G., Virgin H.W., Havenga M.J., Barouch D.H. // *J Virol.* – 2018. – Vol. 92. – № 11. – P. 00159-18.
50. Adams W.C. Adenovirus type-35 vectors block human CD4⁺ T-cell activation via CD46 ligation. / Adams W.C., Gujer C., McInerney G., Gall J.G., Petrovas C., Karlsson Hedestam G.B., Koup R.A., Loré K. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108. – № 18. – P. 7499-504.
51. Aderem A. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Aderem A., Ulevitch R.J. // *Nature.* – 2000. – Vol. 406. – № 6797. – P. 782-7.
52. Adhikari S.P. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. / Adhikari S.P., Meng S., Wu Y.J., Mao Y.P., Ye R.X., Wang Q.Z., Sun C., Sylvia S., Rozelle S., Raat H., Zhou H. // *Infect Dis Poverty.* – 2020. – Vol. 9. – № 9. – P. 29.
53. Agarwal D. Structural, genomic information and computational analysis of emerging coronavirus (SARS-CoV-2). / Agarwal D., Zafar I., Ahmad S.U., Kumar S., Ain Q.U., Sundaray J.K., Rather M.A. // *Bull Natl Res Cent.* – 2020. – Vol. 46. – № 1. – P. 170.
54. Al Kaabi N. Effect of 2 inactivated SARS-CoV-2 vaccines on symptomatic COVID-19 infection in adults: a randomized clinical trial. / Al Kaabi N., Zhang Y.,

- Xia S., Yang Y., Al Qahtani M.M., Abdulrazzaq N., Al Nusair M., Hassany M., Jawad J.S., Abdalla J., Hussein S.E., Al Mazrouei S.K., Al Karam M., Li X., Yang X., Wang W., Lai B., Chen W., Huang S., Wang Q., Yang T., Liu Y., Ma R., Hussain Z.M., Khan T., Saifuddin Fasihuddin M., You W., Xie Z., Zhao Y., Jiang Z., Zhao G., Zhang Y., Mahmoud S., ElTantawy I., Xiao P., Koshy A., Zaher W.A., Wang H., Duan K., Pan A., Yang X. // *JAMA*. – 2021. – Vol. 326. – № 1. – P. 35-45.
55. Albert M.L. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. / Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. // *Nature*. – 1998. – Vol. 392. – № 6671. – P. 86-89.
56. Alekseeva E. Enhancement of the expression of HCV core gene does not enhance core-specific immune response in DNA immunization: advantages of the heterologous DNA prime, protein boost immunization regimen. / Alekseeva E., Sominskaya I., Skrastina D., Egorova I., Starodubova E., Kushners E., Mihailova M., Petrakova N., Bruvere R., Kozlovskaya T., Isaguliants M., Pumpens P. // *Genet Vacc Ther*. – 2009. – Vol. 7. – № 7. – P. 1-17.
57. Alfagih I.M. Nanoparticles as adjuvants and nanodelivery systems for mRNA-based vaccines. / Alfagih I.M., Aldosari B., Alquadeib B., Almurshedi A., Alfagih M.M. // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-27.
58. Allen T.M. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. / Allen T.M., Vogel T.U., Fuller D.H. // *J Immunol*. – 2000. – Vol. 164. – № 9. – P. 4968-78.
59. Amigorena S. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. / Amigorena S., Savina A. // *Curr. Opin. Immunol*. – 2010. – Vol. 22. – № 1. – P. 109-117.
60. Anderson E.J. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. / Anderson E.J., Rouphael N.G., Widge A.T., Jackson L.A., Roberts P.C., Makhene M., Chappell J.D., Denison M.R., Stevens L.J., Pruijssers A.J., McDermott A.B., Flach B., Lin B.C., Doria-Rose N.A., O'Dell S., Schmidt S.D., Corbett K.S., Swanson P.A., Padilla M., Neuzil K.M., Bennett H., Leav B.,

- Makowski M., Albert J., Cross K., Edara V.V., Floyd K., Suthar M.S., Martinez D.R., Baric R., Buchanan W., Luke C.J., Phadke V.K., Rostad C.A., Ledgerwood J.E., Graham B.S., Beigel J.H. // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol. 383. – № 25. – P. 2427-2438.
61. Angelini M.M. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. / Angelini M.M., Akhlaghpour M., Neuman B.W., Buchmeier M.J. // *mBio.* – 2013. – Vol. 4. – № 4. – P. 00524-13.
62. Anywaine Z. Safety and immunogenicity of a 2-dose heterologous vaccination regimen with Ad26.ZEBOV and MVA-BN-Filo Ebola vaccines: 12-month data from a phase 1 randomized clinical trial in Uganda and Tanzania. / Anywaine Z., Whitworth H., Kaleebu P., Praygod G., Shukarev G., Manno D., Kapiga S., Grosskurth H., Kalluvya S., Bockstal V., Anumendem D., Luhn K., Robinson C., Douoguih M., Watson-Jones D. // *J Infect Dis.* – 2019. – Vol. 220. – № 1. – P. 46–56.
63. Appledorn D.M. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. / Appledorn D.M., Patial S., McBride A., Godbehere S., Van Rooijen N., Parameswaran N., Amalfitano A. // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – № 3. – P. 2134-44.
64. Appledorn D.M. TRIF, and TRIF-interacting TLRs differentially modulate several adenovirus vector-induced immune responses. / Appledorn D.M., Patial S., Godbehere S., Parameswaran N., Amalfitano A. // *J Innate Immun.* – 2009. – Vol. 1. – № 4. – P. 376-88.
65. Arens R. Plasticity in programming of effector and memory CD8+T-cell formation. / Arens R., Schoenberger S.P. // *Immunol Rev.* – 2010. – Vol. 235. – № 1. – P. 190-205.
66. Arya R. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. / Arya R., Kumari S., Pandey B., Mistry H., Bihani S.C., Das A., Prashar V., Gupta G.D., Panicker L. and Kumar M.J. // *Mol Biol.* – 2021. – Vol. 433. – № 2. – P. 166725.
67. Atasheva S. Cytokine Responses to Adenovirus and Adenovirus Vectors. / Atasheva S., Shayakhmetov D.M. // *Viruses.* – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. 888.

68. Atasheva S. Innate immunity to adenovirus: Lessons from mice. / Atasheva S., Yao J., Shayakhmetov D.M. // *FEBS Lett.* – 2019. – Vol. 593. – № 24. – P. 3461-3483.
69. Baden L.R. Assessment of the Safety and Immunogenicity of 2 Novel Vaccine Platforms for HIV-1 Prevention: A Randomized Trial. / Baden L.R., Karita E., Mutua G., Bekker L.G., Gray G., Page-Shipp L., Walsh S.R., Nyombayire J., Anzala O., Roux S., Laher F., Innes C., Seaman M.S., Cohen Y.Z., Peter L., Frahm N., McElrath M.J., Hayes P., Swann E., Grunenber N., Grazia-Pau M., Weijtens M., Sadoff J., Dally L., Lombardo A., Gilmour J., Cox J., Dolin R., Fast P., Barouch D.H., Laufer D.S.; B003-IPCAVD004-HVTN091 Study Group. // *Ann Intern Med.* – 2016. – Vol. 164. – № 5. – P. 313-322.
70. Baden L.R. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. / Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupheal N., Creech C.B., McGettigan J., Khetan S., Segall N., Solis J., Brosz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., Mascola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham BS., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J., Zaks T., COVE Study Group. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 384. – № 5. – P. 403-416.
71. Bai C. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. / Bai C., Zhong Q., Gao G.F. // *Sci China Life Sci.* – 2022. – Vol. 65. – № 2. – P. 280-294.
72. Bangari D.S. Comparative transduction efficiencies of human and nonhuman adenoviral vectors in human, murine, bovine, and porcine cells in culture. / Bangari D.S., Shukla S., Mittal S.K. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol. 327. – № 3. – P. 960-966.
73. Bangari D.S. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. / Bangari D.S., Mittal S.K. // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24. – № 7. – P. 849-862.
74. Barouch D.H. Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. / Barouch D.H., Pau M.G., Custers J.H., Koudstaal W., Kostense S., Havenga M.J., Truitt D.M., Sumida S.M., Kishko M.G., Arthur J.C., Koriath-Schmitz B., Newberg M.H., Gorgone D.A., Lifton M.A.,

- Panicali D.L., Nabel G.J., Letvin N.L., Goudsmit J. // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – № 10. – P. 6290-6297.
75. Barouch D.H. International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. / Barouch D.H., Kik S.V., Weverling G.J., Dilan R., King S.L., Maxfield L.F., Clark S., Ng'ang'a D., Brandariz K.L., Abbink P., Sinangil F., de Bruyn G., Gray G.E., Roux S., Bekker L.G., Dilraj A., Kibuuka H., Robb M.L., Michael N.L., Anzala O., Amornkul P.N., Gilmour J., Hural J., Buchbinder S.P., Seaman M.S., Dolin R., Baden L.R., Carville A., Mansfield K.G., Pau M.G., Goudsmit J. // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – № 32. – P. 5203-5209.
76. Barouch D.H. Plasmid chemokines and colony stimulating factors enhance the immunogenicity of DNA priming-viral vector boosting human immunodeficiency virus type 1 vaccines. / Barouch D.H., McKay P.F., Sumida S.M., Santra S., Jackson S.S., Gorgone D.A., Lifton M.A., Chakrabarti B.K., Xu L., Nabel G.J., Letvin N.L. // *J Virol.* – 2003. – Vol. 77. – № 16. – P. 8729-8735.
77. Barouch D.H. Protective efficacy of a global HIV-1 mosaic vaccine against heterologous SHIV challenges in rhesus monkeys. / Barouch D.H., Stephenson K.E., Borducchi E.N., Smith K., Stanley K., McNally A.G., Liu J., Abbink P., Maxfield L.F., Seaman M.S., Dugast A.S., Alter G., Ferguson M., Li W., Earl P.L., Moss B., Giorgi E.E., Szinger J.J., Eller L.A., Billings E.A., Rao M., Tovanabutra S., Sanders-Buell E., Weijtens M., Pau M.G., Schuitemaker H., Robb M.L., Kim J.H., Korber B.T., Michael N.L. // *Cell.* – 2013. – Vol. 155. – № 3. – P. 531-539.
78. Barouch D.H. Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. / Barouch D.H., Alter G., Broge T., Linde C., Ackerman M.E., Brown E.P., Borducchi E.N., Smith K.M., Nkolola J.P., Liu J., Shields J., Parenteau L., Whitney J.B., Abbink P., Ng'ang'a D.M., Seaman M.S., Lavine C.L., Perry J.R., Li W., Colantonio A.D., Lewis M.G., Chen B., Wenschuh H., Reimer U., Piatak M., Lifson J.D., Handley S.A., Virgin H.W., Koutsoukos M., Lorin C., Voss G., Weijtens M., Pau M.G., Schuitemaker H. // *Science.* – 2015. – Vol. 349. – № 6245. – P. 320-324.

79. Barrett J.R. Phase 1/2 trial of SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 with a booster dose induces multifunctional antibody responses. / Barrett J.R., Belij-Rammerstorfer S., Dold C., Ewer K.J., Folegatti P.M., Gilbride C., Halkerston R., Hill J., Jenkin D., Stockdale L., Verheul M.K., Aley P.K., Angus B., Bellamy D., Berrie E., Bibi S., Bittaye M., Carroll M.W., Cavell B., Clutterbuck E.A., Edwards N., Flaxman A., Fuskova M., Gorringe A., Hallis B., Kerridge S., Lawrie A.M., Linder A., Liu X., Madhavan M., Makinson R., Mellors J., Minassian A., Moore M., Mujadidi Y., Plested E., Poulton I., Ramasamy M.N., Robinson H., Rollier C.S., Song R., Snape M.D., Tarrant R., Taylor S., Thomas K.M., Voysey M., Watson M.E.E., Wright D., Douglas A.D., Green C.M., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S., Pollard A.J.; Oxford COVID Vaccine Trial Group. // *Nat Med.* – 2021. – Vol. 27. – № 2. – P. 279-288.
80. Bassett J.D. CD8⁺ T-cell expansion and maintenance after recombinant adenovirus immunization rely upon cooperation between hematopoietic and nonhematopoietic antigen-presenting cells. / Bassett J.D., Yang T.C., Bernard D., Millar J.B., Swift S.L., McGray A.J., VanSeggelen H., Boudreau J.E., Finn J.D., Parsons R., Eveleigh C., Damjanovic D., Grinshtein N., Divangahi M., Zhang L., Xing Z., Wan Y., Bramson J.L. // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – № 4. – P. 1146-1155.
81. Bauerschmitz G.J. Tripletargeted oncolytic adenoviruses featuring the cox2 promoter, E1A transcomplementation, and serotype chimerism for enhanced selectivity for ovarian cancer cells. / Bauerschmitz G.J., Guse K., Kanerva A., Menzel A., Herrmann I., Desmond R.A., Yamamoto M., Nettelbeck D.M., Hakkarainen T., Dall P., Curiel D.T., Hemminki A. // *Mol Ther.* – 2006. – Vol. 14. – № 2. – P. 164-174.
82. Belouzard S. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. / Belouzard S., Chu V.C., Whittaker G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106. – № 14. – P. 5871-5876.
83. Benevento M. Adenovirus composition, proteolysis, and disassembly studied by in-depth qualitative and quantitative proteomics. / Benevento M., Di Palma S., Snijder

- J., Moyer C.L., Reddy V.S., Nemerow G.R., Heck A.J.R. // *J Biol Chem.* – 2014. – Vol. 289. – № 16. – P. 11421-11430.
84. Benning L. Heterologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 Prime-Boost Vaccination Induces Strong Humoral Responses among Health Care Workers. / Benning L., Töllner M., Hidmark A., Schaier M., Nussbag C., Kälble F., Reichel P., Buylaert M., Grenz J., Ponath G., Klein K., Zeier M., Süsal C., Schnitzler P., Morath C., Speer C. // *Vaccines (Basel).* – 2021. – Vol. 9. – № 8. – P. 857.
85. Bestle D. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. / Bestle D., Heindl M.R., Limburg H., Van Lam van T., Pilgram O., Moulton H., Stein D.A., Hards K., Eickmann M., Dolnik O., Rohde C., Klenk H.D., Garten W., Steinmetzer T., Böttcher-Friebertshäuser E. // *Life Sci Alliance.* – 2020. – V. 3. – № 9 – P. e202000786.
86. Bischoff J.R. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. / Bischoff J.R., Kirn D.H., Williams A., Heise C., Horn S., Muna M., Ng L., Nye J.A., Sampson-Johannes A., Fattaey A., McCormick F. // *Science.* – 1996. – Vol. 274. – № 5286. – P. 373-376.
87. Blakney A.K. An Update on Self-Amplifying mRNA Vaccine Development. / Blakney A.K., Ip S., Geall A.J. // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 97.
88. Blanco-Melo D. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. / Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Møller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D., Wang T.T., Schwartz R.E., Lim J.K., Albrecht R.A., tenOever B.R. // *Cell.* – 2020. – Vol. 181. – № 5. – P. 1036-1045.
89. Boni M.F. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. / Boni M.F., Lemey P., Jiang X., Lam T.T., Perry B.W., Castoe T.A., Rambaut A., Robertson D.L. // *Nat Microbiol.* – 2020. – Vol. 5. – № 11. – P. 1408-1417.
90. Bosch B.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. / Bosch B.J., Martina B.E.E., Van Der Zee R., Lepault J., Haijema B.J., Versluis C., Heck A.J.R., De Groot

- R., Osterhaus A.D.M.E., Rottier P.J.M. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2004. – Vol. 101. – № 22. – P. 8455-60.
91. Bosch B.J. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. / Bosch B.J., van der Zee R., de Haan C.A., Rottier P.J. // *J Virol.* – 2003. – Vol. 77. – № 16. – P. 8801-11.
92. Buchbinder S.P. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. / Buchbinder S.P., Mehrotra D.V., Duerr A., Fitzgerald D.W., Mogg R., Li D., Gilbert P.B., Lama J.R., Marmor M., Del Rio C., McElrath M.J., Casimiro D.R., Gottesdiener K.M., Chodakewitz J.A., Corey L., Robertson M.N.; Step Study Protocol Team. // *Lancet.* – 2008. – Vol. 372. – № 9653. – P. 1881-1893.
93. Burdette D.L. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. / Burdette D.L., Monroe K.M., Sotelo-Troha K., Iwig J.S., Eckert B., Hyodo M., Hayakawa Y., Vance R.E. // *Nature.* – 2011. – Vol. 478. – № 7370. – P. 515–8.
94. Calina D. Towards effective COVID-19 vaccines: Updates, perspectives and challenges (Review). / Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G., Shtilman M.I., Kostoff R., Carvalho F., Vinceti M., Spandidos D.A., Tsatsakis A. // *Int J Mol Med.* – 2020. – Vol. 46. – № 1. – P. 3-16.
95. Capone S. Development of chimpanzee adenoviruses as vaccine vectors: challenges and successes emerging from clinical trials. / Capone S., D'Alise A.M., Ammendola V., Colloca S., Cortese R., Nicosia A., Folgori A. // *Expert Rev Vaccines.* – 2013. – Vol. 12. – № 4. – P. 379-93.
96. Casimiro D.R. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. / Casimiro D.R., Chen L., Fu T.M., Evans R.K., Caulfield M.J., Davies M.E., Tang A., Chen M., Huang L., Harris V., Freed D.C., Wilson K.A., Dubey S., Zhu D.M., Nawrocki D., Mach H., Troutman R., Isopi L., Williams D., Hurni W., Xu Z., Smith J.G., Wang S., Liu X., Guan L., Long R., Trigona W., Heidecker G.J., Perry H.C., Persaud N., Toner T.J., Su Q., Liang X.,

- Youil R., Chastain M., Bett A.J., Volkin D.B., Emini E.A., Shiver J.W. // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – № 11. – P. 6305-13.
97. Castano-Rodriguez C. Role of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporins E, 3a, and 8a in Replication and Pathogenesis. / Castaño-Rodriguez C., Honrubia J.M., Gutiérrez-Álvarez J., DeDiego M.L., Nieto-Torres J.L., Jimenez-Guardeño J.M., Regla-Nava J.A., Fernandez-Delgado R., Verdía-Báguena C., Queralt-Martín M., Kochan G., Perlman S., Aguilera V.M., Sola I., Enjuanes L. // *mBio.* – 2018. – Vol. 9. – № 3. – P. e02325-17.
98. Catanzaro A.T. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. / Catanzaro A.T., Koup R.A., Roederer M., Bailer R.T., Enama M.E., Moodie Z., Gu L., Martin J.E., Novik L., Chakrabarti B.K., Butman B.T., Gall J.G., King C.R., Andrews C.A., Sheets R., Gomez P.L., Mascola J.R., Nabel G.J., Grafton, B. S., Vaccine Research Center 006 Study Team. // *J Infect Dis.* – 2006. – Vol. 194. – № 12. – P. 1638-49.
99. Chakraborty S. Proinflammatory IgG Fc structures in patients with severe COVID-19. / Chakraborty S., Gonzalez J., Edwards K., Mallajosyula V., Buzzanco A.S., Sherwood R., Buffone C., Kathale N., Providenza S., Xie M.M., Andrews J.R., Blish C.A., Singh U., Dugan H., Wilson P.C., Pham T.D., Boyd S.D., Nadeau K.C., Pinsky B.A., Zhang S., Memoli M.J., Taubenberger J.K., Morales T., Schapiro J.M., Tan G.S., Jagannathan P., Wang T.T. // *Nat Immunol.* – 2021. – Vol. 22. – № 1. – P. 67-73.
100. Chambers P. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. / Chambers P., Pringle C.R., Easton A.J. // *J Gen Virol.* – 1990. – № 12. – P. 3075-80.
101. Chandrashekar A. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. / Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., Tostanoski L.H., Yu J., Maliga Z., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Terry M., Wrijil L.M., Ducat S., Martinez D.R., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Pessaint L., Van Ry A., Greenhouse J., Taylor T., Blade K., Cook A.,

- Finneyfrock B., Brown R., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Abbink P., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kordana N., Li Z., Lifton M.A., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Schmidt A.G., Miller A.D., Baric R.S., Alter G., Sorger P.K., Estes J.D., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. // *Science*. – 2020. – Vol. 369. – № 6505. – P. 812-817.
102. Chang C.K. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. / Chang C.K., Sue S.C., Yu T.H., Hsieh C.M., Tsai C.K., Chiang Y.C. // *J Biomed Sci*. – 2006. – Vol. 13. – № 1. – P. 59-72.
103. Chang C.K. Transient oligomerization of the SARS-CoV N protein—implication for virus ribonucleoprotein packaging. / Chang C.K., Chen C.M.M., Chiang M.H., Hsu Y.L., Huang T.H. // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 5. – P. e65045.
104. Chen D. ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress. / Chen D., Zheng Q., Sun L., Ji M., Li Y., Deng H., Zhang H. // *Dev Cell*. – 2021. – Vol. 56. – № 23. – P. 3250-3263.
105. Chéneau C. Adenovirus-extracellular protein interactions and their impact on innate immune responses by human mononuclear phagocytes. / Chéneau C., Kremer E.J. // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 12. – P. 1351.
106. Chung, N.H.. Induction of Th1 and Th2 in the Protection against SARS-CoV-2 through Mucosal Delivery of an Adenovirus Vaccine Expressing an Engineered Spike Protein./ Chung, N.H., Chen, Y.C., Yang, S.J., Lin, Y.C., Dou, H.Y., Wang, L.H.C., Liao, C.L., Chow, Y.H. // *Vaccine* – 2022. – № 40. – P. 574–586.
107. Clements-Mann M.L. Immune responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 induced by canarypox expressing HIV-1MN gp120, HIV-1SF2 recombinant gp120, or both vaccines in seronegative adults. / Clements-Mann M.L., Weinhold K., Matthews T.J., Graham B.S., Gorse G.J., Keefer M.C., McElrath M.J., Hsieh R.H., Mestecky J., Zolla-Pazner S., Mascola J., Schwartz D., Siliciano R., Corey L., Wright P.F., Belshe R., Dolin R., Jackson S., Xu S., Fast P., Walker M.C., Stablein D., Excler J.L., Tartaglia J., Paoletti E., NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group // *J Infect Dis*. – 1998. – Vol. 177. – № 5. – P. 1230-46.

108. Cohen G. Immunogenicity and reactogenicity after heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and ChAdox1 nCov-19 (AZD1222) vaccines. / Cohen G., Jungsomsri P., Sangwongwanich J., Tawinprai K., Siripongboonsitti T., Porntharukchareon T., Wittayasak K., Thonwirak N., Soonklang K., Sornsamdang G., Auewarakul C., Mahanonda N. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2022. – Vol. 18. – № 5. – P. 2052525.
109. Collins N.D. Live oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine induces durable antibody response. / Collins N.D., Adhikari A., Yang Y., Kuschner R.A., Karasavvas N., Binn L.N., Walls S.D., Graf P.C.F., Myers C.A., Jarman R.G., Hang J. // *Vaccines.* – 2020. – Vol. 8. – № 3. – P. 411.
110. Cologna R. Identification of nucleocapsid binding sites within coronavirus-defective genomes. / Cologna R., Spagnolo J.F., Hogue B.G. // *Virology.* – 2000. – Vol. 277. – № 2. – P. 235–249.
111. Corbett K.S. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. / Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E., Francica J.R., Boyoglu-Barnum S., Werner A.P., Flach B., O'Connell S., Bock K.W., Minai M., Nagata B.M., Andersen H., Martinez D.R., Noe A.T., Douek N., Donaldson M.M., Nji N.N., Alvarado G.S., Edwards D.K., Flebbe D.R., Lamb E., Doria-Rose N.A., Lin B.C., Louder M.K., O'Dell S., Schmidt S.D., Phung E., Chang L.A., Yap C., Todd J.M., Pessaint L., Van Ry A., Browne S., Greenhouse J., Putman-Taylor T., Strasbaugh A., Campbell T.A., Cook A., Dodson A., Steingrebe K., Shi W., Zhang Y., Abiona O.M., Wang L., Pegu A., Yang E.S., Leung K., Zhou T., Teng I.T., Widge A., Gordon I., Novik L., Gillespie R.A., Loomis R.J., Moliva J.I., Stewart-Jones G., Himansu S., Kong W.P., Nason M.C., Morabito K.M., Ruckwardt T.J., Ledgerwood J.E., Gaudinski M.R., Kwong P.D., Mascola J.R., Carfi A., Lewis M.G., Baric R.S., McDermott A., Moore I.N., Sullivan N.J., Roederer M., Seder R.A., Graham B.S. // *N. Engl. J. Med.* – 2020b. – Vol. 586. – № 7830. – P. 1544-1555.
112. Corbett K.S. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. / Corbett K.S., Edwards D.K., Leist S.R., Abiona O.M., Boyoglu-Barnum S., Gillespie R.A., Himansu S., Schäfer A., Ziwawo C.T., DiPiazza A.T.,

- Dinnon K.H., Elbashir S.M., Shaw C.A., Woods A., Fritch E.J., Martinez D.R., Bock K.W., Minai M., Nagata B.M., Hutchinson G.B., Wu K., Henry C., Bahl K., Garcia-Dominguez D., Ma L., Renzi I., Kong W.P., Schmidt S.D., Wang L., Zhang Y., Phung E., Chang L.A., Loomis R.J., Altaras N.E., Narayanan E., Metkar M., Presnyak V., Liu C., Louder M.K., Shi W., Leung K., Yang E.S., West A., Gully K.L., Stevens L.J., Wang N., Wrapp D., Doria-Rose N.A., Stewart-Jones G., Bennett H., Alvarado G.S., Nason M.C., Ruckwardt T.J., McLellan J.S., Denison M.R., Chappell J.D., Moore I.N., Morabito K.M., Mascola J.R., Baric R.S., Carfi A., Graham B.S. // *Nature*. – 2000a. – Vol. 586. – № 7830. – P. 567-571.
113. Corman V.M. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. / Corman V.M., Muth D., Niemeyer D., Drosten C. // *Adv. Virus Res.* – 2018. – № 100. – P. 163-188.
114. Coughlan L. Factors which contribute to the immunogenicity of non-replicating adenoviral vectored vaccines. / Coughlan L. // *Front. Immunol* – 2020. – № 19. – P. 909.
115. Crosby C.M. Amplified and persistent immune responses generated by single-cycle replicating adenovirus vaccines. / Crosby C.M., Nehete P., Sastry K.J., Barry M.A. // *J Virol.* – 2015. – Vol. 89. – № 81. – P. 669-675.
116. Crosby C.M. IIIa deleted adenovirus as a single-cycle genome replicating vector. / Crosby C.M., Barry M.A. // *Virology.* – 2014. – № 462-463. – P. 158-165.
117. Crosby C.M. Transgene expression and host cell responses to replicationdefective, single-cycle, and replication-competent adenovirus vectors. / Crosby C.M., Barry M.A. // *Genes (Basel).* – 2017. – Vol. 8. – № 8. – P. 79.
118. Cui J. Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses. / Cui J., Li F., Shi Z.-L. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2019. – Vol. 17. – № 3. – P. 181-192.
119. Danthinne X. Production of first generation adenovirus vectors: a review. / Danthinne X, Imperiale MJ. // *Gene Ther.* – 2000. – Vol. 7. – № 20. – P. 1707-1714.
120. Day T.A. Lessons learned from HIV vaccine clinical efficacy trials. / Day T.A., Kublin J.G. // *Curr HIV Res.* – 2013. – Vol. 11. – № 6. – P. 441-9.

121. de Gruijl T. D. Intradermal delivery of adenoviral type-35 vectors leads to high efficiency transduction of mature, CD8⁺ T cell-stimulating skin-emigrated dendritic cells. / de Gruijl T.D., Ophorst O.J., Goudsmit J., Verhaagh S., Lougheed S.M., Radosevic K., Havenga M.J., Scheper R.J. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – № 4. – P. 2208-2215.
122. de Haan CA. The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. / de Haan C.A., de Wit M., Kuo L., Montalto-Morrison C., Haagmans B.L., Weiss S.R., Masters P.S., Rottier P.J. // *Virology.* – 2003. – Vol. 312. – № 2. – P. 395-406.
123. de Haan, C.A. Assembly of the coronavirus envelope: Homotypic interactions between the m proteins. / de Haan C.A., Vennema H., Rottier P.J. // *J Virol.* – 2000. – Vol. 74. – № 11. – P. 4967-4978.
124. Dea S. Identification of the structural proteins of turkey enteric coronavirus. / Dea S., Tijssen P. // *Arch. Virol.* – 1988. – Vol. 99. – № 3-4. – P. 173-186.
125. Delmas B. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. / Delmas B., Laude H. // *J. Virol.* – 1990. – Vol. 64. – № 11. – P. 5367-5375.
126. Dicks M.D. A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. / Dicks M.D., Spencer A.J., Edwards N.J., Wadell G., Bojang K., Gilbert S.C., Hill A.V., Cottingham M.G. // *PLoS One.* – 1990. – Vol. 7. – № 7. – P. e40385.
127. 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. / Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Tokarskaya E.A., Simakova Y.V., Egorova D.A., Scherbinin D.N., Tutykhina I.L., Lysenko A.A., Kostarnoy A.V., Gancheva P.G., Ozharovskaya T.A., Belugin B.V., Kolobukhina L.V., Pantyukhov VB, VB, V.B., Syromyatnikova S.I., Shatokhina I.V., Sizikova T.V.,

- Rumyantseva I.G., Andrus A.F., Boyarskaya N.V., Voytyuk A.N., Babira V.F., Volchikhina S.V., Kutaev D.A., Bel'skih A.N., Zhdanov K.V., Zakharenko S.M., Borisevich S.V., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2017. – Vol. 13. – № 3. – P. 613-620.
128. Dolzhikova IV. Immunogenicity and Protectivity of Sputnik V Vaccine in hACE2-Transgenic Mice against Homologous and Heterologous SARS-CoV-2 Lineages Including Far-Distanced Omicron BA.5. / Dolzhikova IV, Tukhvatulin AI, Grousova DM, Zorkov ID, Komyakova ME, Ilyukhina AA, Kovyrshina AV, Shelkov AY, Botikov AG, Samokhvalova EG, Reshetnikov D.A., Siniavin A.E., Savina D.M., Shcheblyakov D.V., Izhaeva F.M., Dzharullaeva A.S., Erokhova A.S., Popova O., Ozharovskaya T.A., Zrelkin D.I., Goldovskaya P.P., Semikhin A.S., Zubkova O.V., Nedorubov A.A., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. // *Vaccines.* – 2024. – Vol. 12. – № 10. – P. 1152.
129. Doronin K. Coagulation Factor X Activates Innate Immunity to Human Species C Adenovirus. / Doronin K., Flatt J.W., Di Paolo N.C., Khare R., Kalyuzhniy O., Acchione M., Sumida J.P., Ohto U., Shimizu T., Akashi-Takamura S., Miyake K., MacDonald J.W., Bammler T.K., Beyer R.P., Farin F.M., Stewart P.L., Shayakhmetov D.M. // *Science.* – 2012. – Vol. 338. – № 6108. – P. 795-798.
130. Doronin K. Tissuespecific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. / Doronin K., Kuppuswamy M., Toth K., Tollefson A.E., Krajcsi P., Krougliak V., Wold W.S. // *J Virol.* – 2001. – Vol. 75. – № 7. – P. 3314-3324.
131. Du R.H. Predictors of Mortality for Patients with COVID-19 Pneumonia Caused by SARS-CoV-2: A Prospective Cohort Study. / Du R.H., Liang L.R., Yang C.Q., Wang W., Cao T.Z., Li M., Guo G.Y., Du J., Zheng C.L., Zhu Q., Hu M., Li X.Y., Peng P., Shi H.Z. // *Eur. Respir. J.* – 2020. – Vol. 55. – № 5. – P. 2000524.
132. Du Toit A. Outbreak of a Novel Coronavirus. / Du Toit A. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2020. – Vol. 18. – № 3. – P. 123.
133. Dunachie S.J. Prime-boost strategies for malaria vaccine development. / Dunachie SJ, Hill AV. // *J Exp Biol.* – 2003. – Vol. 206. – № 21. – P. 3771-9.

134. Dunkle L.M. Efficacy and safety of NVX-CoV2373 in adults in the United States and Mexico. / Dunkle L.M., Kotloff K.L., Gay C.L., Áñez G., Adelglass J.M., Barrat Hernández A.Q., Harper W.L., Duncanson D.M., McArthur M.A., Florescu D.F., McClelland R.S., Garcia-Fragoso V., Riesenber R.A., Musante D.B., Fried D.L., Safirstein B.E., McKenzie M., Jeanfreau R.J., Kingsley J.K., Henderson J.A., Lane D.C., Ruíz-Palacios G.M., Corey L., Neuzil K.M., Coombs R.W., Greninger A.L., Hutter J., Ake J.A., Smith K., Woo W., Cho I., Glenn G.M., Dubovsky F.; 2019nCoV-301 Study Group. // *N Engl J Med.* – 2022. – Vol. 386. – № 6. – P. 531-543.
135. Egan M.A. Priming with plasmid DNAs expressing interleukin-12 and simian immunodeficiency virus gag enhances the immunogenicity and efficacy of an experimental AIDS vaccine based on recombinant vesicular stomatitis virus. / Egan M.A., Chong S.Y., Megati S., Montefiori D.C., Rose N.F., Boyer J.D., Sidhu M.K., Quiroz J., Rosati M., Schadeck E.B., Pavlakis G.N., Weiner D.B., Rose J.K., Israel Z.R., Udem S.A., Eldridge J.H. // *Aids Res Hum Retroviruses.* – 2005. – Vol. 21. – № 7. – P. 629-643.
136. Ella R. Efficacy, safety, and lot-to-lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152): interim results of a randomised, double-blind, controlled, phase 3 trial. / Ella R., Reddy S., Blackwelder W., Potdar V., Yadav P., Sarangi V., Aileni V.K., Kanungo S., Rai S., Reddy P., Verma S., Singh C., Redkar S., Mohapatra S., Pandey A., Ranganadin P., Gumashta R., Multani M., Mohammad S., Bhatt P., Kumari L., Sapkal G., Gupta N., Abraham P., Panda S., Prasad S., Bhargava B., Ella K., Vadrevu K.M.; COVAXIN Study Group. // *Lancet.* – 2021c. – Vol. 398. – № 10317. – P. 2173-2184.
137. Ella R. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial. / Ella R., Vadrevu K.M., Jogdand H., Prasad S., Reddy S., Sarangi V., Ganneru B., Sapkal G., Yadav P., Abraham P., Panda S., Gupta N., Reddy P., Verma S., Kumar Rai S., Singh C., Redkar S.V., Gillurkar C.S., Kushwaha J.S., Mohapatra S., Rao V., Guleria R., Ella K., Bhargava B. // *Lancet Infect Dis.* – 2021a. – Vol. 21. – № 5. – P.637-646.

138. Ella R. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: interim results from a double-blind, randomised, multicentre, phase 2 trial, and 3-month follow-up of a double-blind, randomised phase 1 trial. / Ella R., Reddy S., Jogdand H., Sarangi V., Ganneru B., Prasad S., Das D., Raju D., Praturi U., Sapkal G., Yadav P., Reddy P., Verma S., Singh C., Redkar S.V., Gillurkar C.S., Kushwaha J.S., Mohapatra S., Bhate A., Rai S., Panda S., Abraham P., Gupta N., Ella K., Bhargava B., Vadrevu K.M. // *Lancet Infect Dis.* – 2021b. – Vol. 21. – № 7. – P. 950-961.
139. Ewer K. A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine Boosted with MVA. / Ewer K., Rampling T., Venkatraman N., Bowyer G., Wright D., Lambe T., Imoukhuede E.B., Payne R., Fehling S.K., Strecker T., Biedenkopf N., Krahling V., Tully C.M., Edwards N.J., Bentley E.M., Samuel D., Labbe G., Jin J., Gibani M., Minhinnick A., Wilkie M., Poulton I., Lella N., Roberts R., Hartnell F., Bliss C., Sierra-Davidson K., Powlson J., Berrie E., Tedder R., Roman F., De Ryck I., Nicosia A., Sullivan N.J., Stanley D.A., Mbaya O.T., Ledgerwood J.E., Schwartz R.M., Siani L., Colloca S., Folgori A., Di Marco S., Cortese R., Wright E., Becker S., Graham B.S., Koup R.A., Levine M.M., Volkmann A., Chaplin P., Pollard A.J., Draper S.J., Ballou W.R., Lawrie A., Gilbert S.C., Hill A.V. // *N Engl J Med.* – 2016. – Vol. 374. – № 17. – P. 1635-1646.
140. Excler J.L. The prime-boost concept applied to HIV preventive vaccines. / Excler JL, Plotkin S. // *Aids.* – 1997. – Vol. 11. – P. S127-S137.
141. Fallaux F. Characterization of 911, a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. / Fallaux F.J., Kranenburg O., Cramer S.J., Houweling A., Van Ormondt H., Hoeben R.C., Van Der Eb A.J. // *Hum Gene Ther.* – 1996. – Vol. 7. – № 2. – P. 215-222.
142. Fallaux F. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replicationcompetent adenoviruses. / Fallaux F.J., Bout A., van der Velde I., van den Wollenberg D.J., Hehir K.M., Keegan J., Auger C., Cramer S.J., van Ormondt H., van der Eb A.J., Valerio D., Hoeben R.C. // *Hum Gene Ther.* – 1998. – Vol. 9. – № 13. – P. 1909-1917.

143. Felsenstein S. COVID19: Immunology and treatment options. / Felsenstein S., Herbert J.A., McNamara P.S., Hedrich C.M. // *Clin Immunol.* – 2020. – № 215. – P. 108448.
144. Feng L. An adenovirus-vectored COVID-19 vaccine confers protection from SARS-COV-2 challenge in rhesus macaques. / Feng L., Wang Q., Shan C., Yang C., Feng Y., Wu J., Liu X., Zhou Y., Jiang R., Hu P., Liu X., Zhang F., Li P., Niu X., Liu Y., Zheng X., Luo J., Sun J., Gu Y., Liu B., Xu Y., Li C., Pan W., Zhao J., Ke C., Chen X., Xu T., Zhong N., Guan S., Yuan Z., Chen L. // *Nat Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 4207.
145. Finn J.D. Persistence of transgene expression influences CD8⁺ T-cell expansion and maintenance following immunization with recombinant adenovirus. / Finn J.D., Bassett J., Millar J.B., Grinshtein N., Yang T.C., Parsons R., Eveleigh C., Wan Y., Parks R.J., Bramson J.L. // *J Virol.* – 2009. – Vol. 83. – № 23. – P. 12027-12036.
146. Flomenberg P. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. / Flomenberg P., Babbitt J., Drobyski W.R., Ash R.C., Carrigan D.R., Sedmak G.V., McAuliffe T., Camitta B., Horowitz M.M., Bunin N., Casper J.T. // *J Infect Dis.* – 1994. – Vol. 169. – № 4. – P. 775-781.
147. Folegatti P.M. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. / Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Belij-Rammerstorfer S., Bellamy D., Bibi S., Bittaye M., Clutterbuck E.A., Dold C., Faust S.N., Finn A., Flaxman A.L., Hallis B., Heath P., Jenkin D., Lazarus R., Makinson R., Minassian A.M., Pollock K.M., Ramasamy M., Robinson H., Snape M., Tarrant R., Voysey M., Green C., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J.; Oxford COVID Vaccine Trial Group. // *Lancet.* – 2020. – Vol. 396. – № 10249. – P. 467-478.
148. Forni D. Molecular evolution of human coronavirus genomes. / Forni D., Cagliani R., Clerici M., Sironi M. // *Trends Microbiol.* – 2017. – Vol. 25. – № 1. – P. 35-48.
149. Fu Y.Z. SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. / Fu Y.Z., Wang S.Y., Zheng Z.Q., Yi Huang

- Z.Q., Li W.W., Xu Z.S., Wang, Y.Y. // *Cell Mol Immunol.* – 2021. – Vol. 18. – № 3. – P. 613-620.
150. Fueyo J. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. / Fueyo J., Gomez-Manzano C., Alemany R., Lee P.S., McDonnell T.J., Mitlianga P., Shi Y.X., Levin V.A., Yung W.K., Kyritsis A.P. // *Oncogene.* – 2000. – Vol. 19. – № 1. – P. 2-12.
151. Ganneru B. Th1 skewed immune response of whole virion inactivated SARS CoV 2 vaccine and its safety evaluation. / Ganneru B., Jogdand H., Daram V.K., Das D., Molugu N.R., Prasad S.D., Kannappa S.V., Ella K.M., Ravikrishnan R., Awasthi A., Jose J., Rao P., Kumar D., Ella R., Abraham P., Yadav P.D., Sapkal G.N., Shete-Aich A., Desphande G., Mohandas S., Basu A., Gupta N., Vadrevu K.M. // *iScience.* – 2021. – Vol. 24. – № 4. – P. 102298.
152. Gao Q. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. / Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., Li Y., Zhu L., Wang N., Lv Z., Gao H., Ge X., Kan B., Hu Y., Liu J., Cai F., Jiang D., Yin Y., Qin C., Li J., Gong X., Lou X., Shi W., Wu D., Zhang H., Zhu L., Deng W., Li Y., Lu J., Li C., Wang X., Yin W., Zhang Y., Qin C. // *Science.* – 2020. – Vol. 369. – № 6499. – P. 77-81.
153. Garas M.N. Construction of a pIX-modified Adenovirus Vector Able to Effectively Bind to Nanoantibodies for Targeting. / Garas M.N., Tillib S.V., Zubkova O.V., Rogozhin V.N., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Logunov D.Y., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Esmagambetov I.B., Gribova I.Y., Bandelyuk A.S., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Acta Naturae.* – 2014. – Vol. 6. – № 2. – P. 95-105.
154. Gaydukova I. COVID-19 vaccination in patients with rheumatic diseases – results of 2,134 cases analysis. / Gaydukova I., Mazurov V., Inamova O., Gaydukova E. // *Ann Rheum Dis.* – 2022. – Vol. 81. – № 1. – P. 968.
155. Ge M. Fusion peptide from influenza hemagglutinin increases membrane surface order: an electron-spin resonance study. / Ge M., Freed J. // *Biophys J.* – 2009. – Vol. 96. – № 12. – P. 4925-4934.
156. Geisbert T.W. Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus

- challenge. / Geisbert T.W., Bailey M., Hensley L., Asiedu C., Geisbert J., Stanley D., Honko A., Johnson J., Mulangu S., Pau M.G., Custers J., Vellinga J., Hendriks J., Jahrling P., Roederer M., Goudsmit J., Koup R., Sullivan N.J. // *J Virol.* – 2011. – Vol. 85. – № 9. – P. 4222-4233.
157. Gherardi M.M. Prime–boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. / Gherardi M.M., Najera J.L., Perez-Jimenez E., Guerra S., Garcia-Sastre A., Esteban M. // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 77. – № 12. – P. 7048-7057.
158. Ghosh S. β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. / Ghosh S., Dellibovi-Ragheb T.A., Kerviel A., Pak E., Qiu Q., Fisher M., Takvorian P.M., Bleck C., Hsu V.W., Fehr A.R., Perlman S., Achar S.R., Straus M.R., Whittaker G.R., de Haan C.A.M., Kehrl J., Altan-Bonnet G., Altan-Bonnet N. // *Cell.* – 2020. – Vol. 183. – № 6. – P. 1520-1535.
159. Ginn S.L. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. / Ginn S.L., Amaya A.K., Alexander I.E., Edelstein M., Abedi M.R. // *J Gene Med.* – 2018. – Vol. 20. – № 5. – P. e3015.
160. Goepfert P.A. Phase 1 safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified Vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. / Goepfert P.A., Elizaga M.L., Sato A., Qin L., Cardinali M., Hay C.M., Hural J., DeRosa S.C., DeFawe O.D., Tomaras G.D., Montefiori D.C., Xu Y., Lai L., Kalams S.A., Baden L.R., Frey S.E., Blattner W.A., Wyatt L.S., Moss B., Robinson H.L.; National Institute of Allergy and Infectious Diseases HIV Vaccine Trials Network. // *J Infect Dis.* – 2011. – Vol. 203. – № 5. – P. 610-9.
161. Goepfert P.A. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine formulations in healthy adults: interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1–2, dose-ranging study. / Goepfert P.A., Fu B., Chabanon A.L., Bonaparte M.I., Davis M.G., Essink B.J., Frank I., Haney O., Janoszyk H., Keefer M.C., Koutsoukos M., Kimmel M.A., Masotti R., Savarino S.J., Schuerman L.,

- Schwartz H., Sher L.D., Smith J., Tavares-Da-Silva F., Gurunathan S., DiazGranados C.A., de Bruyn G. // *Lancet Infect Dis.* – 2021. – Vol. 21. – № 9. – P. 1257-1270.
162. Gonzalo R.M. Enhanced CD8 T cell response to HIV-1 Env by combined immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. / Gonzalo R.M., Rodriguez D., Garcia-Sastre A., Rodriguez J.R., Palese P., Esteban M., // *Vaccine.* – 1999. – Vol. 17. – № 7-8. – P. 887-892.
163. Gordeychuk I.V. Assessment of the Parameters of Adaptive Cell-Mediated Immunity in Naïve Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). / Gordeychuk I.V. Tukhvatulin, A.I., Petkov, S.P., Abakumov, M.A., Gulyaev, S.A., Tukhvatulina, N.M., Gulyaeva, T.V., Mikhaylov, M.I., Logunov, D.Y., & Isagulians, M.G. (2018). // *Acta naturae.* – 2018. – Vol. 10. – № 4. – P. 63-69.
164. Gordeychuk I.V. Safety and Immunogenicity of Inactivated Whole Virion COVID-19 Vaccine CoviVac in Clinical Trials in 18-60 and 60+ Age Cohorts. / Gordeychuk I.V., Kozlovskaya L.I., Siniugina A.A., Yagovkina N.V., Kuzubov V.I., Zakharov K.A., Volok V.P., Dodina M.S., Gmyl L.V., Korotina N.A., Theodorovich R.D., Ulitina Y.I., Vovk D.I., Alikova M.V., Kataeva A.A., Kalenskaya A.V., Solovjeva I.V., Tivanova E.V., Kondrasheva L.Y., Ploskireva A.A., Akimkin V.G., Subbotina K.A., Ignatyev G.M., Korduban A.K., Shustova E.Y., Bayurova E.O., Zhitkevich A.S., Avdoshina D.V., Piniaeva A.N., Kovpak A.A., Antonova L.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Ivin Y.Y., Sotskova S.E., Chernov K.A., Ipatova E.G., Korduban E.A., Ishmukhametov A.A. // *Viruses.* – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 1828.
165. Gordon D.E. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. / Gordon D.E., Jang G.M., Bouhaddou M., Xu J., Obernier K., White K.M., O'Meara M.J., Rezelj V.V., Guo J.Z., Swaney D.L., Tummino T.A., Hüttenhain R., Kaake R.M., Richards A.L., Tutuncuoglu B., Foussard H., Batra J., Haas K., Modak M., Kim M., Haas P., Polacco B.J., Braberg H., Fabius J.M., Eckhardt M., Soucheray M., Bennett M.J., Cakir M., McGregor M.J., Li Q., Meyer B., Roesch F., Vallet T., Mac Kain A., Miorin L., Moreno E., Naing Z.Z.C., Zhou Y., Peng S., Shi Y., Zhang Z., Shen W., Kirby I.T., Melnyk J.E., Chorba J.S., Lou K., Dai S.A., Barrio-Hernandez I., Memon D., Hernandez-Armenta C., Lyu J., Mathy

- C.J.P., Perica T., Pilla K.B., Ganesan S.J., Saltzberg D.J., Rakesh R., Liu X., Rosenthal S.B., Calviello L., Venkataramanan S., Liboy-Lugo J., Lin Y., Huang X.P., Liu Y., Wankowicz S.A., Bohn M., Safari M., Ugur F.S., Koh C., Savar N.S., Tran Q.D., Shengjuler D., Fletcher S.J., O'Neal M.C., Cai Y., Chang J.C.J., Broadhurst D.J., Klippsten S., Sharp P.P., Wenzell N.A., Kuzuoglu-Ozturk D., Wang H.Y., Trenker R., Young J.M., Caverio D.A., Hiatt J., Roth T.L., Rathore U., Subramanian A., Noack J., Hubert M., Stroud R.M., Frankel A.D., Rosenberg O.S., Verba K.A., Agard D.A., Ott M., Emerman M., Jura N., von Zastrow M., Verdin E., Ashworth A., Schwartz O., d'Enfert C., Mukherjee S., Jacobson M., Malik H.S., Fujimori D.G., Ideker T., Craik C.S., Floor S.N., Fraser J.S., Gross J.D., Sali A., Roth B.L., Ruggero D., Taunton J., Kortemme T., Beltrao P., Vignuzzi M., García-Sastre A., Shokat K.M., Shoichet B.K., Krogan N.J. // *Nature*. – 2020. – Vol. 583. – № 7816. – P. 459-468.
166. Graham B.S. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. / Graham B.S., Koup R.A., Roederer M., Bailer R.T., Enama M.E., Moodie Z., Martin J.E., McCluskey M.M., Chakrabarti B.K., Lamoreaux L., Andrews C.A., Gomez P.L., Mascola J.R., Nabel G.J.; Vaccine Research Center 004 Study Team. // *The Journal of infectious diseases*. – 2006. – Vol. 194. – № 12. – P.1650-60.
167. Graham F.L. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. / Graham F.L., Smiley J., Russel W.C., Nairn R. // *J Gen Virol*. – 1977. – Vol. 36. – № 1. – P. 59-74.
168. Gralinski L.E. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. / Gralinski L.E., Menachery V.D. // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 2. – P. 135.
169. Gray G. Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine. / Gray G., Buchbinder S., Duerr A. // *Current opinion in HIV and AIDS*. – 1977. – Vol. 5. – № 5. – P. 357-61.
170. Gray G.E. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-

- of-concept phase 2b study. / Gray G.E., Allen M., Moodie Z., Churchyard G., Bekker L.G., Nchabeleng M., Mlisana K., Metch B., de Bruyn G., Latka M.H., Roux S., Mathebula M., Naicker N., Ducar C., Carter D.K., Puren A., Eaton N., McElrath M.J., Robertson M., Corey L., Kublin J.G.; HVTN 503/Phambili study team. // *The Lancet infectious diseases*. – 2011. – Vol. 11. – № 7. – P. 507-15.
171. Greenhalgh T Management of post-acute covid-19 in primary care. / Greenhalgh T., Knight M., A'Court C., Buxton M., Husain L. // *BMJ*. – 2020. – Vol. 370. – P. m3026.
172. Greinacher A. Insights in ChAdOx1 nCoV-19 vaccineinduced immune thrombotic thrombocytopenia. / Greinacher A., Selleng K., Palankar R., Wesche J., Handtke S., Wolff M., Aurich K., Lalk M., Methling K., Völker U., Hentschker C., Michalik S., Steil L., Reder A., Schönborn L., Beer M., Franzke K., Büttner A., Fehse B., Stavrou E.X., Rangaswamy C., Mailer R.K., Englert H., Frye M., Thiele T., Kochanek S., Krutzke L., Siegerist F., Endlich N., Warkentin T.E., Renné T. // *Blood*. – 2021a. – Vol. 138. – № 22. – P. 2256-2268.
173. Greinacher A. Thrombotic thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 vaccination. / Greinacher A., Thiele T., Warkentin T.E., Weisser K., Kyrle P.A., Eichinger S. // *N. Engl. J. Med.* – 2021b. – Vol. 384. – № 22. – P. 2092-2101.
174. Guo L. Clinical Features Predicting Mortality Risk in Patients with Viral Pneumonia: the MuLBSTA Score. / Guo L., Wei D., Zhang X., Wu Y., Li Q., Zhou M., Qu J. // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 2752.
175. Gushchin V.A. Sputnik V protection from COVID-19 in people living with HIV under antiretroviral therapy. / Gushchin V.A., Tsyganova E.V., Ogarkova D.A., Adgamov R.R., Shcheblyakov D.V., Glukhoedova N.V., Zhilenkova A.S., Kolotii A.G., Zaitsev R.D., Logunov D.Y., Gintsburg A.L., Mazus A.I. // *EClinicalMedicine*. – 2022. – Vol. 46. – P. 101360.
176. Guy J.S. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. / Guy J.S., Breslin J.J., Breuhaus B., Vivrette S., Smith L.G. // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38. – № 12. – P. 4523-4526.

177. Häcker H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. / Häcker H., Vabulas R.M., Takeuchi O., Hoshino K., Akira S., Wagner H. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192. – № 4. – P. 595-600.
178. Halperin S.A. Final efficacy analysis, interim safety analysis, and immunogenicity of a single dose of recombinant novel coronavirus vaccine (adenovirus type 5 vector) in adults 18 years and older: An international, multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. / Halperin S.A., Ye L., MacKinnon-Cameron D., Smith B., Cahn P.E., Ruiz-Palacios G.M., Ikram A., Lanas F., Lourdes Guerrero M., Muñoz Navarro S.R., Sued O., Lioznov D.A., Dzutseva V., Parveen G., Zhu F., Leppan L., Langley J.M., Barreto L., Gou J., Zhu T.; CanSino COVID-19 Global Efficacy Study Group. // *Lancet.* – 2022. – Vol. 399. – № 10321. – P. 237-248
179. Hammond J.M. A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever. / Hammond J.M., Jansen E.S., Morrissy C.J., Goff W.V., Meehan G.C., Williamson M.M., Lenghaus C., Sproat K.W., Andrew M.E., Coupar B.E., Johnson M.A. // *Vet Microbiol.* – 2001. – Vol. 80. – № 2. – P. 101-19.
180. Harari A. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. / Harari A., Bart P.A., Stohr W., Tapia G., Garcia M., Medjitna-Rais E., Burnet S., Cellerai C., Erlwein O., Barber T., Moog C., Liljestrom P., Wagner R., Wolf H., Kraehenbuhl J.P., Esteban M., Heeney J., Frchette M.J., Tartaglia J., McCormack S., Babiker A., Weber J., Pantaleo G. // *J Exp Med.* – 2008. – Vol. 205. – № 1. – P. 63–77.
181. Hartenian E. The molecular virology of coronaviruses. / Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295. – № 37. – P. 12910-12934.
182. Heath P.T. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 vaccine. / Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., Boffito M., Browne D., Burns F., Chadwick D.R., Clark R., Cosgrove C., Galloway J., Goodman A.L., Heer A., Higham A., Iyengar S., Jamal A., Jeanes C., Kalra P.A., Kyriakidou C., McAuley D.F., Meyrick A., Minassian A.M.,

- Minton J., Moore P., Munsoor I., Nicholls H., Osanlou O., Packham J., Pretswell C.H., San Francisco Ramos A., Saralaya D., Sheridan R.P., Smith R., Soiza R.L., Swift P.A., Thomson E.C., Turner J., Viljoen M.E., Albert G., Cho I., Dubovsky F., Glenn G., Rivers J., Robertson A., Smith K., Toback S.; 2019nCoV-302 Study Group. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 385. – № 13. – P. 1172-1183.
183. Heidarzadeh A. Effectiveness of COVID-19 vaccines on hospitalization and death in Guilan, Iran: a test-negative case-control study. / Heidarzadeh A., Amini Moridani M., Khoshmanesh S., Kazemi S., Hajiaghazorgi M., Karami M. // *Int J Infect Dis.* – 2023. – Vol. 128. – P. 212-222.
184. Helmy Y.A. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. / Helmy Y.A., Fawzy M., Elasad A., Sobieh A., Kenney S.P., Shehata A.A. // *J Clin Med.* – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. 1225.
185. Henao-Restrepo A.M. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. / Henao-Restrepo A.M., Longini I.M., Egger M., Dean N.E., Edmunds W.J., Camacho A., Carroll M.W., Doumbia M., Draguez B., Duraffour S., Enwere G., Grais R., Gunther S., Hossmann S., Kondé M.K., Kone S., Kuisma E., Levine M.M., Mandal S., Norheim G., Riveros X., Soumah A., Trelle S., Vicari A.S., Watson C.H., Kéïta S., Kieny M.P., Røttingen J.A. // *Lancet.* – 2015. – Vol. 386. – № 9996. – P. 857-66.
186. Henao-Restrepo A.M. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). / Henao-Restrepo A.M., Camacho A., Longini I.M., Watson C.H., Edmunds W.J., Egger M., Carroll M.W., Dean N.E., Diatta I., Doumbia M., Draguez B., Duraffour S., Enwere G., Grais R., Gunther S., Gsell P.S., Hossmann S., Wattle S.V., Kondé M.K., Kéïta S., Kone S., Kuisma E., Levine M.M., Mandal S., Mauget T., Norheim G., Riveros X., Soumah A., Trelle S., Vicari A.S., Røttingen J.A., Kieny M.P. // *Lancet.* – 2017. – Vol. 389. – № 10068. – P. 505-518.

187. Ho T.C. The Effects of Heterologous Immunization with Prime-Boost COVID-19 Vaccination against SARS-CoV-2. / Ho T.C., Chen Y.A., Chan H.P., Chang C.C., Chuang K.P., Lee C.H., Yuan C.H., Tyan Y.C., Yang M.H. // *Vaccines (Basel)*. – 2021. – Vol. 9. – № 10. – P. 1163.
188. Hoffmann M. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. / Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. // *Mol. Cell*. – 2021. – Vol. 78. – № 4. – P. 779-784.
189. Hoffmann M. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. / Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 271-280.
190. Honda K. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. / Honda K., Yanai H., Mizutani T., Negishi H., Shimada N., Suzuki N., Ohba Y., Takaoka A., Yeh W.C., Taniguchi T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – № 43. – P. 15416-15421.
191. Hsieh C.L. Structure-based design of prefusion-stabilized SARSCoV-2 spikes. / Hsieh C.L., Goldsmith J.A., Schaub J.M., DiVenere A.M., Kuo H.C., Javanmardi K., Le K.C., Wrapp D., Lee A.G., Liu Y., Chou C.W., Byrne P.O., Hjorth C.K., Johnson N.V., Ludes-Meyers J., Nguyen A.W., Park J., Wang N., Amengor D., Lavinder J.J., Ippolito G.C., Maynard J.A., Finkelstein I.J., McLellan J.S. // *Science*. – 2020. – Vol. 369. – № 6510. – P. 1501-1505.
192. Hu B. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. / Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. // *Nat Rev Microbiol*. – 2021. – Vol. 19. – № 3. – P. 141-154.
193. Hu S.L. Neutralizing antibodies against HIV-1 BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1 (BRU) envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160. / Hu S.L., Klaniecki J., Dykers T., Sridhar P., Travis B.M. // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 1991. – Vol. 75. – № 7. – P. 615-620.

194. Hu S.L. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. / Hu S.L., Abrams K., Barber G.N., Moran P., Zarleng J.M., Langlois A.J., Kuller L., Morton W.R., Benveniste R.E. // *Science*. – 1992. – Vol. 255. – № 5043. – P. 456-459.
195. Hur S. Double-Stranded RNA Sensors and Modulators in Innate Immunity. / Hur S. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2019. – Vol. 37. – P. 349-375.
196. Hurst K.R. Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex. / Hurst K.R., Koetzner C.A., Masters P.S. // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87. – № 16. – P. 9159-9172.
197. Hutnick N.A. Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive. / Hutnick N.A., Carnathan D., Demers K., Makedonas G., Ertl H.C., Betts M.R. // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 8. – P. 1932-1941.
198. Hwang J. Comparison of vaccine-induced thrombotic events between ChAdOx1 nCoV-19 and Ad26.COV.2.S vaccines. / Hwang J., Lee S.B., Lee S.W., Lee M.H., Koyanagi A., Jacob L., Tizaoui K., Yon D.K., Shin J.I., Smith L. // *J Autoimmun.* – 2021. – Vol. 122. – P. 102681.
199. Iacobelli-Martinez M. Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46 utilizing adenoviruses. / Iacobelli-Martinez M, Nemerow GR. // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81. – № 3. – P. 1305-12.
200. Iampietro M.J. Immunogenicity and Cross-Reactivity of Rhesus Adenoviral Vectors. / Iampietro M.J., Larocca R.A., Provine N.M., Abbink P., Kang Z.H., Bricault C.A., Barouch D.H. // *J Virol.* – 2018. – Vol. 92. – № 11. – P. e00159-18.
201. Inoue H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. / Inoue H., Nojima H., Okayama H. // *Gene*. – 1990. – Vol. 96. – № 1. – P. 23-28.
202. Islamov R.R. Gene-modified leucoconcentrate for personalized ex vivo gene therapy in a mini pig model of moderate spinal cord injury. / Islamov R.R., Bashirov F.V., Sokolov M.E., Izmailov A.A., Fadeev F.O., Markosyan V.A., Davleeva M.A., Zubkova O.V., Smarov M.M., Logunov D.Y., Naroditskyi B.S., Salafutdinov I.I.,

- Rizvanov A.A., Turaev R.G. // *Neural Regen Res.* – 2021. – Vol. 16. – № 2. – P. 357-361.
203. Isnardi C.A. An Argentinean cohort of patients with rheumatic and immune-mediated diseases vaccinated for SARS-CoV-2: the SAR-CoVAC Registry-protocol and preliminary data. / Isnardi C.A., Schneeberger E.E., Kreimer J.L., Luna P.C., Echeverría C., Roberts K., de la Vega M.C., Virasoro B.M., Landi M., Quintana R., Exeni M.E.D., Kogan N., Petkovic I., Pereira D., De Los Ángeles Correa M., Zelaya M.D., Tissera Y., Elkin M.S.G., Pisoni C.N., Alonso C., Cogo A.K., Cosatti M.A., García L., Retamozo C., de Los Ángeles Severina M., Nieto R.E., Rosemffet M., Mussano E., Bertoli A., Savio V.G., Cosentino V., Pons-Estel G.J. // *Clin Rheumatol.* – 2022. – Vol. 41. – № 10. – P. 3199-3209.
204. Jackson L.A. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 - preliminary report. / Jackson L.A., Anderson E.J., Roupael N.G., Roberts P.C., Makhene M., Coler R.N., McCullough M.P., Chappell J.D., Denison M.R., Stevens L.J., Pruijssers A.J., McDermott A., Flach B., Doria-Rose N.A., Corbett K.S., Morabito K.M., O'Dell S., Schmidt S.D., Swanson P.A. 2nd, Padilla M., Mascola J.R., Neuzil K.M., Bennett H., Sun W., Peters E., Makowski M., Albert J., Cross K., Buchanan W., Pikaart-Tautges R., Ledgerwood J.E., Graham B.S., Beigel J.H.; mRNA-1273 Study Group. // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol. 383. – № 20. – P. 1920-1931.
205. Jain S. Messenger RNA-Based Vaccines: Past, Present, and Future Directions in the Context of the COVID-19 Pandemic. / Jain S., Venkataraman A., Wechsler M.E., Peppas N.A. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2021. – Vol. 179. – P. 114000.
206. Jara A. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chile. / Jara A., Undurraga E.A., González C., Paredes F., Fontecilla T., Jara G., Pizarro A., Acevedo J., Leo K., Leon F., Sans C., Leighton P., Suárez P., García-Escorza H., Araos R. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 385. – № 10. – P. 875-84.
207. Jiang F. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). / Jiang F., Deng L., Zhang L., Cai Y., Cheung C. W., Xia Z. // *J. Gen. Intern. Med.* – 2020. – Vol. 35. – № 5. – P. 1545-1549.

208. Jin Z. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. / Jin Z., Du X., Xu Y., Deng Y., Liu M., Zhao Y., Zhang B., Li X., Zhang L., Peng C., Duan Y., Yu J., Wang L., Yang K., Liu F., Jiang R., Yang X., You T., Liu X., Yang X., Bai F., Liu H., Liu X., Guddat L.W., Xu W., Xiao G., Qin C., Shi Z., Jiang H., Rao Z., Yang H. // *Nature*. – 2020. – Vol. 582. – № 7811. – P. 289-293.
209. Kaech S.M. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. / Kaech S.M., Tan J.T., Wherry E.J., Konieczny B.T., Surh C.D., Ahmed R. // *Nat. Immunol.* – 2003. – Vol. 4. – № 12. – P. 1191-1198.
210. Kanegae Y. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. / Kanegae Y., Makimura M., Saito I. // *Jpn J Med Sci Biol.* – 1994. – Vol. 47. – № 3. – P. 157-66.
211. Kang S. Crystal structure of SARSCoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. / Kang S., Yang M., Hong Z., Zhang L., Huang Z., Chen X., He S., Zhou Z., Zhou Z., Chen Q., Yan Y., Zhang C., Shan H., Chen S. // *Acta Pharm Sin B.* – 2020. – Vol. 10. – № 7. – P. 1228-1238.
212. Kardani K. Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits. / Kardani K, Bolhassani A, Shahbazi S. // *Vaccine.* – 2016. – Vol. 34. – № 4. – P. 413-423.
213. Kashani N.R. Molecular and Clinical Investigation of COVID-19: From Pathogenesis and Immune Responses to Novel Diagnosis and Treatment. / Kashani N.R., Azadbakht J., Ehteram H., Kashani H.H., Rajabi-Moghadam H., Ahmad E., Nikzad H., Hosseini E.S. // *Front Mol Biosci.* – 2022. – Vol. 19. – № 9. – P. 770775.
214. Kawai T. Interferon- α induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. / Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. // *Nat. Immunol.* – 2004. – Vol. 5. – № 10. – P. 1061–1068.
215. Keech C. Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. / Keech C., Albert G., Cho I., Robertson A., Reed P., Neal S., Pledsted J.S., Zhu M., Cloney-Clark S., Zhou H., Smith G., Patel N., Frieman M.B., Haupt R.E.,

- Logue J., McGrath M., Weston S., Piedra P.A., Desai C., Callahan K., Lewis M., Price-Abbott P., Formica N., Shinde V., Fries L., Lickliter J.D., Griffin P., Wilkinson B., Glenn G.M. // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol. 383. – № 24. – P. 2320–2332.
216. Kerstetter L.J. Adenoviral vectors as vaccines for emerging avian influenza viruses. / Kerstetter L.J., Buckley S., Bliss C.M., Coughlan L. // *Front Immunol.* – 2020. – № 11. – P. 607333.
217. Kim L. Safety and immunogenicity of an oral tablet norovirus vaccine, a phase I randomized, placebo-controlled trial. / Kim L., Liebowitz D., Lin K., Kasperek K., Pasetti M.F., Garg S.J., Gottlieb K., Trager G., Tucker S.N. // *JCI Insight.* – 2018. – Vol. 3. – № 13. – P. e121077.
218. Kirchdoerfer R.N. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. / Kirchdoerfer R.N., Wang N., Pallesen J., Wrapp D., Turner H.L., Cottrell C.A., Corbett K.S., Graham B.S., McLellan J.S., Ward A.B. // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 15701.
219. Klein S. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. / Klein S., Cortese M., Winter S.L., Wachsmuth-Melm M., Neufeldt C.J., Cerikan B., Stanifer M.L., Boulant S., Bartenschlager R., Chlanda P. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 5885.
220. Knoops K. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. / Knoops K., Kikkert M., Worm S.H., Zevenhoven-Dobbe J.C., van der Meer Y., Koster A.J., Mommaas A.M., Snijder E.J. // *PLoS Biol.* – 2008. – Vol. 6. – № 9. – P. e226.
221. Kochanek S. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. / Kochanek S., Clemens P.R., Mitani K., Chen H.H., Chan S., Caskey C.T. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – Vol. 93. – № 12. – P. 5731–5736.
222. Kon E. Principles for Designing an Optimal mRNA Lipid Nanoparticle Vaccine. / Kon E., Elia U., Peer D. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2022. – Vol. 73. – P. 329–336.

223. Koneru B. Adenoviral infections in pediatric liver transplant recipients. / Koneru B., Jaffe R., Esquivel C.O., Kunz R., Todo S., Iwatsuki S., Starzl T.E. // JAMA. – 1987. – Vol. 258. – № 4. – P. 489–492.
224. Kopecky-Bromberg S.A. 7a protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cellular protein synthesis and activates p38 mitogen-activated protein kinase. / Kopecky-Bromberg S.A, Martinez-Sobrido L., Palese P. // J Virol. – 2006. – Vol. 80. – № 2. – P. 785-93.
225. Korobova Z.R. Changes in Anti-SARS-CoV-2 IgG Subclasses over Time and in Association with Disease Severity. / Korobova Z.R., Zueva E.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Liubimova N.E., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Savin T.V., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. // Viruses. – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. 941.
226. Koup R.A. Priming immunization with DNA augments immunogenicity of recombinant adenoviral vectors for both HIV-1 specific antibody and T-cell responses. / Koup R.A., Roederer M., Lamoreaux L., Fischer J., Novik L., Nason M.C., Larkin B.D., Enama M.E., Ledgerwood J.E., Bailer R.T., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S.; VRC 009 Study Team; VRC 010 Study Team. // PloS one. – 2010. – Vol. 5. – № 2. – P. e9015.
227. Kozlovskaya L.I., Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. / Kozlovskaya L.I., Piniaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., Mefyod K.M., Prokosheva L.S., Sibirkina A.S., Tarasova Y.Y., Bayurova E.O., Gancharova O.S., Illarionova V.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Moysenovich A.M., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Gmyl L.V., Ipatova E.G., Kirpichnikov M.P., Egorov A.M., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A. // Emerg Microbes Infect. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 1790-1806.
228. Kruglov A.A. Inactivated whole virion vaccine protects K18-hACE2 Tg mice against the Omicron SARS-CoV-2 variant via cross-reactive T cells and nonneutralizing antibody responses. / Kruglov A.A., Bondareva M.A., Gogoleva

- V.S., Semin I.K., Astrakhantseva I.V., Zvartsev R., Lunin A.S., Apolokhov V.D., Shustova E.Y., Volok V.P., Ustyugov A.A., Ishmukhametov A.A., Nedospasov S.A., Kozlovskaya L.I., Drutskaya M.S. // *Eur J Immunol.* – 2024. – Vol. 54. – № 3. – P. e2350664.
229. Krutzke L. Process-related impurities in the ChAdOx1 nCov-19 vaccine. / Krutzke L, Roesler R, Wiese S, Kochanek S. // *Elife.* – 2022. – Vol. 11. – P. e78513.
230. Kumar M. Antisense RNA: Function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. / Kumar M., Carmichael G.G. // *Microbiology and Molecular Biology.* – 1998. – Vol. 62. – № 4. – P. 1415–1434.
231. Kung Y.A. Molecular virology of SARS-CoV-2 and related coronaviruses. / Kung Y.A., Lee K.M., Chiang H.J., Huang S.Y., Wu C.J., Shih S.R. // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2022. – Vol. 86. – № 2. – P. e0002621.
232. Kuo L. Analyses of coronavirus assembly interactions with interspecies membrane and nucleocapsid protein chimeras. / Kuo L., Hurst-Hess K.R., Koetzner C.A., Masters P.S. // *J Virol.* – 2016. – Vol. 90. – № 9. – P. 4357–4368.
233. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / Laemmli U.K. // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680–5.
234. Laha S. Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. / Laha S., Chakraborty J., Das S., Manna S.K., Biswas S., Chatterjee R. // *Infect Genet Evol.* – 2020. – Vol. 85. – P. 104445.
235. Lai M.M. The molecular biology of coronaviruses. / Lai M.M., Cavanagh D. // *Adv Vir Res.* – 1997. – Vol. 48. – P. 1–100.
236. Lam E. Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. / Lam E., Stein S., Falck-Pedersen E. // *J Virol.* – 2014. – Vol. 88. – № 2. – P. 974–81.
237. Lam T.T. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. / Lam T.T., Jia N., Zhang Y.W., Shum M.H., Jiang J.F., Zhu H.C., Tong Y.G., Shi Y.X., Ni X.B., Liao Y.S., Li W.J., Jiang B.G., Wei W., Yuan T.T., Zheng K., Cui X.M., Li J., Pei G.Q., Qiang X., Cheung W.Y., Li L.F., Sun F.F., Qin S., Huang J.C.,

- Leung G.M., Holmes E.C., Hu Y.L., Guan Y., Cao W.C. // *Nature*. – 2020. – Vol. 583. – № 7815. – P. 282–285.
238. Lapa D. Retention of Neutralizing Response against SARS-CoV-2 Omicron Variant in Sputnik V-Vaccinated Individuals. / Lapa D., Grousova D.M., Matusali G., Meschi S., Colavita F., Bettini A., Gramigna G., Francalancia M., Garbuglia A.R., Girardi E., Puro V., Antinori A., Kovyrshina A.V., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Gushchin V.A., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Vaia F., Gintsburg A.L. // *Vaccines (Basel)*. – 2022. – Vol. 10. – № 5. – P. 817.
239. Lasaro M.O. New insights on adenovirus as vaccine vectors. / Lasaro M.O., Ertl H.C. // *Mol Ther*. – 2009. – Vol. 17. – № 8. – P. 1333–1339.
240. Laude H. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. / Laude H., Gelfi J., Lavenant L., Charley B. // *J Virol*. – 1992. – Vol. 66. – № 2. – P. 743–749.
241. Lauer S.A. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. / Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R., Azman A.S., Reich N.G., Lessler J. // *Ann Int Med*. – 2020. – Vol. 172. – № 9. – P. 577–582.
242. Launay O. Heterologous prime boost COVID 19 vaccination. / Launay O., Thill P. // *Infect Dis Now*. – 2022. – Vol. 52. – № 8S. – P. S7-S8.
243. Le Gars M. Impact of preexisting anti-adenovirus 26 humoral immunity on immunogenicity of the Ad26.COV2.S coronavirus disease 2019 vaccine. / Le Gars M., Sadoff J., Struyf F., Heerwegh D., Truyers C., Hendriks J., Gray G., Grinsztejn B., Goepfert P.A., Schuitemaker H., Douoguih M. // *J Infect Dis*. – 2022. – Vol. 226. – № 6. – P. 979-982.
244. Lee C.S. Adenovirus-mediated gene delivery: potential applications for gene and cellbased therapies in the new era of personalized medicine. / Lee C.S., Bishop E.S., Zhang R., Yu X., Farina E.M., Yan S., Zhao C., Zheng Z., Shu Y., Wu X., Lei J., Li Y., Zhang W., Yang C., Wu K., Wu Y., Ho S., Athiviraham A., Lee M.J., Wolf J.M., Reid R.R., He T.C. // *Genes Dis*. – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. 43–63.

245. Leen A.M. Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8⁺ T cells. / Leen A.M., Sili U., Vanin E.F., Jewell A.M., Xie W., Vignali D., Piedra P.A., Brenner M.K., Rooney C.M. // *Blood*. – 2004. – Vol. 104. – № 8. – P. 2432–2440.
246. Lemckert A.A. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. / Lemckert A.A., Sumida S.M., Holterman L., Vogels R., Truitt D.M., Lynch D.M., Nanda A., Ewald B.A., Gorgone D.A., Lifton M.A., Goudsmit J., Havenga M.J., Barouch D.H. // *J Virol*. – 2005. – Vol. 79. – № 15. – P. 9694-701.
247. Li F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: A decade of structural studies. / Li F. // *J. Virol*. – 2015. – Vol. 89. – № 4. – P. 1954–1964.
248. Li F. Structure of SARS coronavirus spike receptorbinding domain complexed with receptor. / Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. // *Science*. – 2005. – Vol. 309. – № 5742. – P. 1864–1868.
249. Li P. Effect of polymorphism in *Rhinolophus affinis* ACE2 on entry of SARS-CoV-2 related bat coronaviruses. / Li P., Hu J., Liu Y., Ou X., Mu Z., Lu X., Zan F., Cao M., Tan L., Dong S., Zhou Y., Lu J., Jin Q., Wang J., Wu Z., Zhang Y., Qian Z. // *PLoS Pathog*. – 2023. – Vol. 19. – № 1. – P. e1011116.
250. Li S. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8⁺ T-cell-mediated protective immunity against malaria. / Li S., Rodrigues M., Rodrigues D., Rodrigues J.R., Esteban M., Palese P., Nussenzweig R.S., Zavala F. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 1993. – Vol. 90. – № 11. – P. 5214–5218.
251. Li W. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. / Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. // *Nature*. – 2003. – Vol. 426. – № 6965. – P. 450–454.

252. Li X. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. / Li X., Zai J., Zhao Q., Nie Q., Li Y., Foley B.T., Chaillon A. // *J. Med. Virol.* – 2020. – Vol. 92. – № 6. – P. 602–611.
253. Liang W. Cancer Patients in SARS-CoV-2 Infection: A Nationwide Analysis in China. / Liang W., Guan W., Chen R., Wang W., Li J., Xu K., Li C., Ai Q., Lu W., Liang H., Li S., He J. // *Lancet Oncol.* – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 335–337.
254. Liao Y. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. / Liao Y., Yuan Q., Torres J., Tam J.P., Liu D.X. // *Virology.* – 2006. – Vol. 349. – № 2. – P. 264–275.
255. Liebowitz D. Efficacy, immunogenicity, and safety of an oral influenza vaccine: a placebo-controlled and active-controlled phase 2 human challenge study. / Liebowitz D., Gottlieb K., Kolhatkar N.S., Garg S.J., Asher J.M., Nazareno J., Kim K., McIlwain D.R., Tucker S.N. // *Lancet Infect Dis.* – 2020. – Vol. 20. – № 4. – P. 435–444.
256. Lin S. Crystal structure of SARS-CoV-2 nsp10 bound to nsp14-ExoN domain reveals an exoribonuclease with both structural and functional integrity. / Lin S., Chen H., Chen Z., Yang F., Ye F., Zheng Y., Yang J., Lin X., Sun H., Wang L., Wen A., Dong H., Xiao Q., Deng D., Cao Y., Lu G. // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49. – № 9. – P. 5382–5392.
257. Liu J. Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. / Liu J., O'Brien K.L., Lynch D.M., Simmons N.L., La Porte A., Riggs A.M., Abbink P., Coffey R.T., Grandpre L.E., Seaman M.S., Landucci G., Forthal D.N., Montefiori D.C., Carville A., Mansfield K.G., Havenga M.J., Pau M.G., Goudsmit J., Barouch D.H. // *Nature.* – 2009. – Vol. 457. – № 7225. – P. 87-91.
258. Liu J. Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. / Liu J., Ewald B.A., Lynch D.M., Denholtz M., Abbink P., Lemckert A.A., Carville A., Mansfield K.G., Havenga M.J., Goudsmit J., Barouch D.H. // *J Virol.* – 2020. – Vol. 82. – № 10. – P. 4844-4852.

259. Liu J. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic T-lymphocyte epitopes. / Liu J., Sun Y., Qi J., Chu F., Wu H., Gao F., Li T., Yan J., Gao G.F. // *J Infect Dis.* – 2010. – Vol. 202. – № 8. – P. 1171–1180.
260. Liu L. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. / Liu L., Wei Q., Lin Q., Fang J., Wang H., Kwok H., Tang H., Nishiura K., Peng J., Tan Z., Wu T., Cheung K.W., Chan K.H., Alvarez X., Qin C., Lackner A., Perlman S., Yuen K.Y., Chen Z. // *JCI Insight.* – 2019. – Vol. 4. – № 4. – P. e123158.
261. Liu L. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. / Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J.F., Sahi V., Figueroa A., Guo X.V., Cerutti G., Bimela J., Gorman J., Zhou T., Chen Z., Yuen K.Y., Kwong P.D., Sodroski J.G., Yin M.T., Sheng Z., Huang Y., Shapiro L., Ho D.D. // *Nature.* – 2020. – Vol. 584. – № 7821. – P. 450-456.
262. Liu T. NF- κ B signaling in inflammation. / Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. // *Signal Transduct Target Ther.* – 2020. – № 2. – P. 17023.
263. Lo Y.S. Oligomerization of the carboxyl terminal domain of the human coronavirus 229E nucleocapsid protein. / Lo Y.S., Lin S.Y., Wang S.M., Wang C.T., Chiu Y.L., Huang T.H. // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 587. – № 2. – P. 120–127.
264. Locker J.K. Membrane assembly of the triple-spanning coronavirus M protein. Individual transmembrane domains show preferred orientation. / Locker J.K., Rose J.K., Horzinek M.C., Rottier P.J. // *J Biol Chem.* – 1992. – Vol. 267. – № 30. – P. 21911–21918.
265. Logue J. Immunogenicity and protection of a variant nanoparticle vaccine that confers broad neutralization against SARS-CoV-2 variants. / Logue J., Johnson R.M., Patel N., Zhou B., Maciejewski S., Foreman B., Zhou H., Portnoff A.D., Tian J.H., Rehman A., McGrath M.E., Haupt R.E., Weston S.M., Baracco L., Hammond H., Guebre-Xabier M., Dillen C., Madhangi M., Greene A.M., Massare M.J., Glenn G.M., Smith G., Frieman M.B. // *Nat Commun.* – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 1130.

266. Logunov D.Y. Identification of HI-like loop in celo adenovirus fiber for incorporation of receptor binding motifs. / Logunov D.Y., Zubkova O.V., Karyagina-Zhulina A.S., Shuvalova E.A., Karpov A.P., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Alyapkina Y.S., Grezina N.M., Zinovieva N.A., Ernst L.K., Gintsburg A.L. Naroditsky B.S. // *J Virol.* – 2007. – Vol. 81. – № 18. – P. 9641–9652.
267. 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. / Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Lancet.* – 2021. – Vol. 397. – № 10275. – P. 671-681.
268. 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 / Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Lancet.* – 2020. – Vol. 396. – № 10255. – P. 887-897.
269. Logunov D.Y. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous rVSV- and rAd5-vectored Ebola vaccine: a randomized controlled multicenter clinical trial in the Republic of Guinea and Russia. / Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Boiro M.Y., Kovyrshina A.V., Dzharullaeva A.S., Erokhova A.S., Grousova D.M., Tukhvatulin A.I., Izhaeva F.M., Simakova Y.V., Ordzhonikidze M.K., Lubenets

- N.L., Zubkova O.V., Scheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Shmarov M.M., Semikhin A.S., Tukhvatulina N.M., Shcherbinin D.N., Tutykhina I.L., Prokhorov G.S., Khovaev A.A., Demidova T.N., Malishev N.A., Merkulova L.N., Voronina O.L., Fedyakina I.T., Kisteneva L.B., Kolobukhina L.V., Mishin D.V., Elakov A.L., Ermolova E.I., Krasnoslobodtsev K.G., Larichev V.F., Kruzhkova I.S., Burmistrov E.M., Sheremet A.B., Tokarskaya E.A., Gromov A.V., Reshetnikov D.A., Fisun A.I., Kotiv B.N., Ovchinnikov D.V., Ivchenko E.V., Zhdanov K.V., Zakharenko S.M., Solovev A.N., Ivanov A.M., Sukachev V.S., Gudkov R.V., Maltsev O.V., Gabdrakhmanov I.A., Barsukov A.V., Vashchenkov V.V., Demianenko N.I., Ignatev S.B., Asiamov K.V., Kirichenko N.N., Liubimov A.V., Volkov I.I., Kriukov E.V., Bazarnov N.K., Kolodiaznaia V.A., Kolomoets E.V., Syromyatnikova S.I., Chifanov D.E., Andrus A.F., Kutaev D.A., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Front Immunol.* – 2025. – № 16. – P. 1487039.
270. Loré K. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells are susceptible to recombinant adenovirus vectors and stimulate polyfunctional memory T cell responses. / Loré K., Adams W.C., Havenga M.J., Precopio M.L., Holterman L., Goudsmit J., Koup R.A. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – № 3. – P. 1721–1729.
271. Lowenstein P.R. Inflammation and adaptive immune responses to adenoviral vectors injected into the brain: Peculiarities, mechanisms, and consequences. / Lowenstein P.R., Castro M.G. // *Gene Ther.* – 2003. – Vol. 10. – № 11. – P. 946–954.
272. Lu S. Combination DNA plus protein HIV vaccines. / Lu S. // *Springer Semin Immunopathol.* – 2006. – Vol. 28. – № 3. – P. 255–265.
273. Lu W. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. / Lu W., Zheng B.J., Xu K., Schwarz W., Du L., Wong C.K., Chen J., Duan S., Deubel V., Sun B. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103. – № 33. – P. 12540–12545.
274. Lukassen S. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. / Lukassen S., Chua R.L., Trefzer T., Kahn N.C., Schneider M.A., Muley T., Winter H., Meister M., Veith C., Boots A.W.,

- Hennig B.P., Kreuter M., Conrad C., Eils R. // *EMBO J.* – 2020. – Vol. 39. – № 10. – P. e105114.
275. Luo S. Prime-boost vaccination of mice and rhesus macaques with two novel adenovirus vectored COVID-19 vaccine candidates. / Luo S., Zhang P., Liu B., Yang C., Liang C., Wang Q., Zhang L., Tang X., Li J., Hou S., Zeng J., Fu Y., Allain J.P., Li T., Zhang Y., Li C. // *Emerg Microbes Infect.* – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 1002-1015.
276. Lyons A. A double-blind, placebo-controlled study of the safety and immunogenicity of live, oral type 4 and type 7 adenovirus vaccines in adults. / Lyons A., Longfield J., Kuschner R., Straight T., Binn L., Seriwatana J., Reitstetter R., Froh I.B., Craft D., McNabb K., Russell K., Metzgar D., Liss A., Sun X., Towle A., Sun W. // *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26. – № 23. – P. 2890-2898.
277. Machamer C.E. A specific transmembrane domain of a coronavirus E1 glycoprotein is required for its retention in the Golgi region. / Machamer C.E., Rose J.K. // *J Cell Biol.* – 1987. – Vol. 105. – № 3. – P. 1205–1214.
278. Macnaughton M.R. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. / Macnaughton M.R., Davies H.A., Nermut M.V. // *J. Gen. Virol.* – 1987. – Vol. 39. – № 3. – P. 546-549.
279. Magnusson S.E. Matrix-MTM adjuvant enhances immunogenicity of both protein- and modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines in mice. / Magnusson S.E., Altenburg A.F., Bengtsson K.L., Bosman F., de Vries R.D., Rimmelzwaan G.F., Stertman L. // *Immunol Res.* – 2018. – Vol. 66. – № 2. – P. 224–233.
280. Maizel J.V. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. / Maizel J.V., White D.O., Scharff M.D. // *Virology.* – 1968. – Vol. 36. – № 1. – P. 115–25.
281. Makitalo B. Enhanced cellular immunity and systemic control of SHIV infection by combined parenteral and mucosal administration of a DNA prime/MVA boost vaccine regimen. / Mäkitalo B., Lundholm P., Hinkula J., Nilsson C., Karlén K., Mörner A., Sutter G., Erfle V., Heeney J.L., Wahren B., Biberfeld G., Thorstensson R. // *J Gen Virol.* – 2004. – Vol. 85. – № 8. – P. 2407–19.

282. Malone B. Structural basis for backtracking by the SARS-CoV-2 replication–transcription complex. / Malone B., Chen J., Wang Q., Llewellyn E., Choi Y.J., Olinares P.D.B., Cao X., Hernandez C., Eng E.T., Chait B.T., Shaw D.E., Landick R., Darst S.A., Campbell E.A. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – Vol. 118. – № 19. – P. e2102516118.
283. Marquez-Martinez S. Cell entry and innate sensing shape adaptive immune responses to adenovirus-based vaccines. / Marquez-Martinez S., Vijayan A., Khan S., Zahn R. // *Curr Opin Immunol.* – 2023. – № 810. – P. 102282.
284. Marsh G.A. ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine candidate significantly reduces SARS-CoV-2 shedding in ferrets. / Marsh G.A., McAuley A.J., Au G.G., Riddell S., Layton D., Singanallur N.B., Layton R., Payne J., Durr P.A., Bender H., Barr J.A., Bingham J., Boyd V., Brown S., Bruce M.P., Burkett K., Eastwood T., Edwards S., Gough T., Halpin K., Harper J., Holmes C., Horman W.S.J., van Vuren P.J., Lowther S., Maynard K., McAuley K.D., Neave M.J., Poole T., Rootes C., Rowe B., Soldani E., Stevens V., Stewart C.R., Suen W.W., Tachedjian M., Todd S., Trinidad L., Walter D., Watson N., Drew T.W., Gilbert S.C., Lambe T., Vasan S.S. // *NPJ Vaccines.* – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 67.
285. Martín-González N. Adenovirus major core protein condenses DNA in clusters and bundles, modulating genome release and capsid internal pressure. / Martín-González N., Hernando-Pérez M., Condezo G.N., Pérez-Illana M., Šiber A., Reguera D., Ostapchuk P., Hearing P., San Martín C., de Pablo P.J. // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47. – № 17. – P. 9231-9242.
286. Mascellino M.T. Overview of the main anti-sars-cov-2 vaccines: mechanism of action, efficacy and safety. / Mascellino M.T., Di Timoteo F., De Angelis M., Oliva A. // *Infect Drug Resist.* – 2021. – № 14. – P. 3459–3476.
287. Mast T.C. International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. / Mast T.C., Kierstead L., Gupta S.B., Nikas A.A., Kallas E.G., Novitsky V., Mbewe B., Pitisuttithum P., Schechter

- M., Vardas E., Wolfe N.D., Aste-Amezaga M., Casimiro D.R., Coplan P., Straus W.L., Shiver J.W. // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – № 4. – P. 950–7.
288. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. / Masters P.S. // *Adv Virus Res*. – 2006. – № 66. – P. 193–292.
289. Mateus J. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. / Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., Burger Z.C., Rawlings S.A., Smith D.M., Phillips E., Mallal S., Lammers M., Rubiro P., Quiambao L., Sutherland A., Yu E.D., da Silva Antunes R., Greenbaum J., Frazier A., Markmann A.J., Premkumar L., de Silva A., Peters B., Crotty S., Sette A., Weiskopf D. // *Science*. – 2020. – Vol. 370. – № 6512. – P. 89-94.
290. Matsuyama S. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. / Matsuyama S., Nao N., Shirato K., Kawase M., Saito S., Takayama I., Nagata N., Sekizuka T., Katoh H., Kato F., Sakata M., Tahara M., Kutsuna S., Ohmagari N., Kuroda M., Suzuki T., Kageyama T., Takeda M. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2020. – Vol. 117. – № 13. – P. 7001–7003.
291. Matz K.M. Ebola vaccine trials: progress in vaccine safety and immunogenicity. / Matz K.M., Marzi A., Feldmann H. // *Expert Rev Vaccines*. – 2019. – Vol. 18. – № 12. – P. 1229–1242.
292. McBride R. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. / McBride R., van Zyl M., Fielding B.C. // *Viruses*. – 2014. – Vol. 6. – № 8. – P. 2991–3018.
293. McCoy K. Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. / McCoy K., Tatsis N., Koriath-Schmitz B., Lasaro M.O., Hensley S.E., Lin S.W., Li Y., Giles-Davis W., Cun A., Zhou D., Xiang Z., Letvin N.L., Ertl H.C. // *J Virol*. – 2007. – Vol. 81. – № 12. – P. 6594–604.
294. McGonagle D. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. / McGonagle D., Sharif K., O'Regan A., Bridgewood C. // *Autoimmun Rev*. – 2020. – Vol. 19. – № 6. – P. 102537.

295. McIlwain D.R. Human influenza virus challenge identifies cellular correlates of protection for oral vaccination. / McIlwain D.R., Chen H., Rahil Z., Bidoki N. H., Jiang S., Bjornson Z., Kolhatkar N.S., Martinez C.J., Gaudillière B., Hedou J., Mukherjee N., Schürch C.M., Trejo A., Affrime M., Bock B., Kim K., Liebowitz D., Aghaeepour N., Tucker S.N., Nolan G.P. // *Cell Host Microbe*. – 2021. – Vol. 29. – № 12. – P. 1828–1837.
296. McMichael A. Another HIV vaccine failure: where to next? / McMichael A., Picker L.J., Moore J.P., Burton D.R. // *Nat Med*. – 2013. – Vol. 19. – № 12. – P. 1576–7.
297. Mendonça L. Correlative multi-scale cryo-imaging unveils SARSCoV-2 assembly and egress. / Mendonça L., Howe A., Gilchrist J.B., Sheng Y., Sun D., Knight M.L., Zanetti-Domingues L.C., Bateman B., Krebs A.S., Chen L., Radecke J., Li V.D., Ni T., Kounatidis I., Koronfel M.A., Szykiewicz M., Harkiolaki M., Martin-Fernandez M.L., James W., Zhang P. // *Nat Commun*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 4629.
298. Meng H. CT imaging and clinical course of asymptomatic cases with COVID-19 pneumonia at admission in Wuhan, China. / Meng H., Xiong R., He R., Lin W., Hao B., Zhang L., Lu Z., Shen X., Fan T., Jiang W., Yang W., Li T., Chen J., Geng Q. // *J Infect*. – 2020. – Vol. 81. – № 1. – P. e33-e39.
299. Meng M. DNA prime and peptide boost immunization protocol encoding the *Toxoplasma gondii* GRA4 induces strong protective immunity in BALB/c mice. / Meng M., Zhou A., Lu G., Wang L., Zhao G., Han Y., Zhou H., Cong H., Zhao Q., Zhu X.Q., He S. // *BMC Infect Dis*. – 2013. – Vol. 13. – P. 494.
300. Mercado N.B. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. / Mercado N.B., Zahn R., Wegmann F., Loos C., Chandrashekar A., Yu J., Liu J., Peter L., McMahan K., Tostanoski L.H., He X., Martinez D.R., Rutten L., Bos R., van Manen D., Vellinga J., Custers J., Langedijk J.P., Kwaks T., Bakkers M.J.G., Zuijdsgeest D., Rosendahl Huber S.K., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Hoffman E., Jacob-Dolan C., Kirilova M., Li Z., Lin Z., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nampanya F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Patel S., Ventura J.D., Verrington K.,

- Wan H., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Strasbaugh A., Cabus M., Brown R., Cook A., Zouantchangadou S., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Cai Y., Chen B., Schmidt A.G., Reeves R.K., Baric R.S., Lauffenburger D.A., Alter G., Stoffels P., Mammen M., Van Hoof J., Schuitemaker H., Barouch D.H. // *Nature*. – 2020. – Vol. 586. – № 7830. – P. 583–588.
301. Michalik S. Comparative analysis of ChAdOx1 nCoV-19 and Ad26.COV2.S SARS-CoV-2 vector vaccines. / Michalik S., Siegerist F., Palankar R., Franzke K., Schindler M., Reder A., Seifert U., Cammann C., Wesche J., Steil L., Hentschker C., Gesell-Salazar M., Reisinger E., Beer M., Endlich N., Greinacher A., Völker U. // *Haematologica*. – 2022. – Vol. 107. – № 4. – P. 947-957.
302. Milligan I.D. Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26- and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial. / Milligan I.D., Gibani M.M., Sewell R., Clutterbuck E.A., Campbell D., Plested E., Nuthall E., Voysey M., Silva-Reyes L., McElrath M.J., De Rosa S.C., Frahm N., Cohen K.W., Shukarev G., Orzabal N., van Duijnhoven W., Truysers C., Bachmayer N., Splinter D., Samy N., Pau M.G., Schuitemaker H., Luhn K., Callendret B., Van Hoof J., Douoguih M., Ewer K., Angus B., Pollard A.J., Snape M.D. // *Jama*. – 2016. – Vol. 315. – № 15. – P. 1610-23.
303. Mohandas S. Immunogenicity and protective efficacy of BBV152, whole virion inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidates in the Syrian hamster model. / Mohandas S., Yadav P.D., Shete-Aich A., Abraham P., Vadrevu K.M., Sapkal G., Mote C., Nyayanit D., Gupta N., Srinivas VK., Kadam M., Kumar A., Majumdar T., Jain R., Deshpande G., Patil S., Sarkale P., Patil D., Ella R., Prasad S.D., Sharma S., Ella K.M., Panda S., Bhargava B. // *iScience*. – 2021. – Vol. 24. – № 2. – P. 102054.
304. Morelli A.E. Recombinant adenovirus induces maturation of dendritic cells via an NF-kappaB-dependent pathway. / Morelli A.E., Larregina A.T., Ganster R.W., Zahorchak A.F., Plowey J.M., Takayama T., Logar A.J., Robbins P.D., Falo L.D., Thomson A.W. // *J Virol*. – 2000. – Vol. 74. – № 20. – P. 9617–9628.
305. Mullard A. COVID-19 vaccine development pipeline gears up. / Mullard A. // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – № 10239. – P. 1751–1752.

306. Mutua G. Randomized clinical trial examining safety and immunogenicity of heterologous prime-boost Ebola vaccines, Ad26.ZEBOV and MVABN-Filo: 12-month data from Nairobi, Kenya. / Mutua G., Anzala O., Luhn K., Robinson C., Bockstal V., Anumendem D., Douoguih M. // *J Infect Dis.* – 2019. – Vol. 220. – № 1. – P. 57–67.
307. Nakaya Y. Enhanced cellular immune responses to SIV Gag by immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. / Nakaya Y., Zheng H., García-Sastre A. // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21. – № 17. – P. 2097 – 2106.
308. Nalbandian A. Post-Acute COVID-19 Syndrome. / Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M.V., McGroder C., Stevens J.S., Cook J.R., Nordvig A.S., Shalev D., Sehrawat T.S., Ahluwalia N., Bikdeli B., Dietz D., Der-Nigoghossian C., Liyanage-Don N., Rosner G.F., Bernstein E.J., Mohan S., Beckley A.A., Seres D.S., Choueiri T.K., Uriel N., Ausiello J.C., Accili D., Freedberg D.E., Baldwin M., Schwartz A., Brodie D., Garcia C.K., Elkind M.S.V., Connors J.M., Bilezikian J.P., Landry D.W., Wan E.Y. // *Nat. Med.* – 2021. – Vol. 27. – № 4. – P. 601–615.
309. Nance K.D. Modifications in an Emergency: The Role of N1-Methylpseudouridine in COVID-19 Vaccines. / Nance K.D., Meier J.L. // *ACS Cent. Sci.* – 2021. – Vol. 7. – № 5. – P. 748–756.
310. Nanda A. Immunogenicity of recombinant fiber-chimeric adenovirus serotype 35 vector-based vaccines in mice and rhesus monkeys. / Nanda A., Lynch D.M., Goudsmit J., Lemckert A.A., Ewald B.A., Sumida S.M., Truitt D.M., Abbink P., Kishko M.G., Gorgone D.A., Lifton M.A., Shen L., Carville A., Mansfield K.G., Havenga M.J., Barouch D.H. // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – № 22. – P. 14161–14168.
311. Nascimento I.P. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. / Nascimento I.P., Leite L.C.C. // *Braz J Med Biol Res.* – 2012. – Vol. 45. – № 12. – P. 1102–11.
312. Nelson G.W., Stohlman S.A., Tahara S.M. High affinity interaction between nucleocapsid protein and leader/intergenic sequence of mouse hepatitis virus RNA. /

- Nelson G.W., Stohlman S.A., Tahara S.M. // *J. Gen. Virol.* – 2000. – Vol. 81. – № 1. – P. 181–188.
313. Nemerow G.R. Structure of human adenovirus. / Nemerow G.R., Stewart P.L., Reddy V.S. // *Curr Opin Virol.* – 2012. – Vol. 2. – № 2. – P. 115–21.
314. Neuman B.W. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. / Neuman B.W., Kiss G., Kunding A.H., Bhella D., Baksh M.F., Connelly S., Droese B., Klaus J.P., Makino S., Sawicki S.G., Siddell S.G., Stamou D.G., Wilson I.A., Kuhn P., Buchmeier M.J. // *J Struct Biol.* – 2011. – Vol. 174. – № 1. – P. 11–22.
315. Nguyen T.T. Reactogenicity and immunogenicity of heterologous prime-boost immunization with COVID-19 vaccine. / Nguyen T.T., Quach T.H.T., Tran T.M., Phuoc H.N., Nguyen H.T., Vo T.K., Vo G.V. // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – Vol. 174. – P. 112650.
316. Nieto-Torres J.L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. / Nieto-Torres J.L., DeDiego M.L., Verdía-Báguena C., Jimenez-Guardeño J.M., Regla-Nava J.A., Fernandez-Delgado R., Castaño-Rodríguez C., Alcaraz A., Torres J., Aguilera VOL.M., Enjuanes L. // *PLoS Pathog.* – 2014. – VOL. 10. – № 5. – P. e1004077.
317. Nkolola J.P. Engineering RENTA, a DNA prime-MVA boost HIV vaccine tailored for Eastern and Central Africa. / Nkolola JP, Wee EG, Im EJ, Jewell CP, Chen N, Xu XN, McMichael AJ, Hanke T. // *Gene Ther.* – 2004. – VOL. 11. – № 13. – P. 1068–80.
318. Normark J. Heterologous ChAdOx1 nCoV-19 and mRNA-1273 Vaccination. / Normark J., Vikström L., Gwon Y.-D., Persson I.L., Edin A., Björnell T., Dernstedt A., Christ W., Tevell S., Evander M., Klingström J., Ahlm C., Forsell M. // *N Eng J Med.* – 2021. – VOL. 385. – № 11. – P. 1049-1051.
319. Olive M. The Adenovirus Capsid Protein Hexon Contains a Highly Conserved Human CD4+T-Cell Epitope. / Olive M., Eisenlohr L., Flomenberg N., Hsu S., Flomenberg P. // *Hum. Gene Ther.* – 2002. – Vol. 13. – № 10. – P. 1167–1178.

320. Ophorst O.J. Immunogenicity and protection of a recombinant human adenovirus serotype 35-based malaria vaccine against *Plasmodium yoelii* in mice. / Ophorst O.J., Radosević K., Havenga M.J., Pau M.G., Holterman L., Berkhout B., Goudsmit J., Tsuji M. // *Infect Immun.* – 2006. – Vol. 74. – № 1. – P. 313-20.
321. Ou X. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. / Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D., Ren L., Guo L., Guo R., Chen T., Hu J., Xiang Z., Mu Z., Chen X., Chen J., Hu K., Jin Q., Wang J., Qian Z. // *Nat. Commun.* – 2020. – VOL. 11. – № 1. – P. 1620.
322. Oudshoorn D. Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp3–4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. / Oudshoorn D., Rijs K., Limpens R.W.A.L., Groen K., Koster A.J., Snijder E.J., Kikkert M., Bárcena M. // *mBio.* – 2017. – Vol. 8. – № 6. – P. e01658-17.
323. Palacios R. Double-blind, randomized, placebo-controlled phase III clinical trial to evaluate the efficacy and safety of treating healthcare professionals with the adsorbed COVID-19 (inactivated) vaccine manufactured by sinovac - PROFISCOV: a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. / Palacios R., Patiño E.G., de Oliveira Piorelli R., Conde M.T.R.P., Batista A.P., Zeng G., Xin Q., Kallas E.G., Flores J., Ockenhouse C.F., Gast C. // *Trials.* – 2020. – Vol. 21. – № 1. – P. 853.
324. Pallesen J. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. / Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L., Cottrell C.A., Becker M.M., Wang L., Shi W., Kong W.P., Andres E.L., Kettenbach A.N., Denison M.R., Chappell J.D., Graham B.S., Ward A.B., McLellan J.S. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 114. – № 35. – P. E7348-E7357.
325. Paris R.M. Prime-boost immunization with poxvirus or adenovirus vectors as a strategy to develop a protective vaccine for HIV-1. / Paris R.M., Kim J.H., Robb M.L., Michael N.L. // *Expert Rev Vaccines.* – 2010. – Vol. 9. – № 9. – P. 1055–69.

326. Parks R.J. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. / Parks R.J., Chen L., Anton M., Sankar U., Rudnicki M.A., Graham F.L. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – Vol. 93. – № 24. – P. 13565-13570.
327. Parthasarathy K. Structural flexibility of the pentameric SARS coronavirus envelope protein ion channel. / Parthasarathy K., Ng L., Lin X., Liu D.X., Pervushin K., Gong X., Torres J. // *Biophys J.* – 2008. – V. 95. – № 6. – P. L39–41.
328. Patel J.R. Infection of a calf with the enteric coronavirus strain Paris. / Patel J.R., Davies H.A., Edington N., Laporte J., Macnaughton M.R. // *Arch. Virol.* – 1982. – Vol. 73. – № 3-4. – P. 319–327.
329. Peiris J.S. The severe acute respiratory syndrome. / Peiris J.S., Yuen K.Y., Osterhaus A.D., Stohr K. // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – № 25. – P. 2431–41.
330. Penaloza-MacMaster P. Alternative serotype adenovirus vaccine vectors elicit memory T cells with enhanced anamnestic capacity compared to Ad5 vectors. / Penaloza-MacMaster P., Provine N.M., Ra J., Borducchi E.N., McNally A., Simmons N.L., Iampietro M.J., Barouch D.H. // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87. – № 3. – P. 1373–1384.
331. Peters W. Oral administration of an adenovirus vector encoding both an avian influenza A hemagglutinin and a TLR3 ligand induces antigen specific granzyme B and IFN- γ T cell responses in humans. / Peters W., Brandl J.R., Lindbloom J.D., Martinez C.J., Scallan C.D., Trager G.R., Tingley D.W., Kabongo M.L., Tucker S.N. // *Vaccine* . – 2013. – Vol. 31. – № 13. – P. 1752–1758.
332. Petit C.M. Genetic analysis of the SARS-coronavirus spike glycoprotein functional domains involved in cell-surface expression and cell-to-cell fusion. / Petit C.M., Melancon J.M., Chouljenko V.N., Colgrove R., Farzan M., Knipe D.M., Kousoulas K.G. // *Virology.* – 2005. – Vol. 341. – № 2. – P. 215-230.
333. Pillai V.K. Different patterns of expansion, contraction and memory differentiation of HIV-1 Gag-specific CD8 T cells elicited by adenovirus type 5 and modified vaccinia Ankara vaccines. / Pillai V.K., Kannanganat S., Penaloza-Macmaster P.,

- Chennareddi L., Robinson H.L., Blackwell J., Amara R.R. // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – № 33. – P. 5399–5406.
334. Polack F.P. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. / Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez Marc G., Moreira E.D., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Roychoudhury S., Koury K., Li P., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W.Jr., Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Jansen K.U., Gruber W.C.; C4591001 Clinical Trial Group. // *N Engl J Med*. – 2020. – Vol. 383. – № 27. – P. 2603–2615.
335. Pollet J. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. / Pollet J., Chen W.H., Strych U. // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2021. – Vol. 170. – P. 71–82.
336. Prompetchara E. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: lessons learned from SARS and MERS epidemic. / Prompetchara E., Ketloy C., Palaga T. // *Asian Pac J Allergy Immunol*. – 2020. – V. 38. – № 1. – P. 1–9.
337. Qin C. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. / Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.S. // *Clin Infect Dis*. – 2020. – Vol. 71. – № 15. – P. 762–8.
338. Ragab D. The COVID-19 cytokine storm; what we know so far. / Ragab D., Salah Eldin H., Taeimah M., Khattab R., Salem R. // *Front Immunol*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1446.
339. Rajah M.M. The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. / Rajah M.M., Bernier A., Buchrieser J., Schwartz O. // *J Mol Biol*. – 2022. – Vol. 434. – № 6. – P. 167280.
340. Ramasamy M.N. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. / Ramasamy M.N., Minassian A.M., Ewer K.J., Flaxman A.L., Folegatti P.M., Owens D.R., Voysey M., Aley P.K., Angus B., Babbage G., Belij-Rammerstorfer S., Berry L., Bibi S., Bittaye M., Cathie K., Chappell H., Charlton S., Cicconi P., Clutterbuck E.A., Colin-Jones R., Dold C.,

- Emary K.R.W., Fedosyuk S., Fuskova M., Gbesemete D., Green C., Hallis B., Hou M.M., Jenkin D., Joe C.C.D., Kelly E.J., Kerridge S., Lawrie A.M., Lelliott A., Lwin M.N., Makinson R., Marchevsky N.G., Mujadidi Y., Munro A.P.S., Pacurar M., Plested E., Rand J., Rawlinson T., Rhead S., Robinson H., Ritchie A.J., Ross-Russell A.L., Saich S., Singh N., Smith C.C., Snape M.D., Song R., Tarrant R., Themistocleous Y., Thomas K.M., Villafana T.L., Warren S.C., Watson M.E.E., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Faust S.N., Pollard A.J.; Oxford COVID Vaccine Trial Group. // *Lancet*. – 2021. – Vol. 396. – № 10267. – P. 1979-1993.
341. Ramshaw I.A. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. / Ramshaw I.A., Ramsay A.J. // *Immunol Today*. – 2000. – Vol. 21. – № 14. – P. 163–5.
342. Reimer J.M. Matrix-M™ adjuvant induces local recruitment, activation and maturation of central immune cells in absence of antigen. / Reimer J.M., Karlsson K.H., Lövgren-Bengtsson K., Magnusson S.E., Fuentes A., Stertman L. // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 7. – P. e41451.
343. Reyes-Sandoval A. Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. / Reyes-Sandoval A., Fitzgerald J.C., Grant R., Roy S., Xiang Z.Q., Li Y., Gao G.P., Wilson J.M., Ertl H.C. // *J. Virol*. – 2004. – Vol. 78. – № 14. – P. 7392-7399.
344. Richardson S. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. / Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W.; the Northwell COVID-19 Research Consortium; Barnaby D.P., Becker L.B., Chelico J.D., Cohen S.L., Cookingham J., Coppa K., Diefenbach M.A., Dominello A.J., Duer-Hefele J., Falzon L., Gitlin J., Hajizadeh N., Harvin T.G., Hirschwerk D.A., Kim E.J., Kozel Z.M., Marrast L.M., Mogavero J.N., Osorio G.A., Qiu M., Zanos T.P. // *JAMA*. – 2020. – Vol. 383. – № 10. – P. 2052-2059.

345. Rodriguez-Morales A.J. History is repeating itself: Probable zoonotic spillover as the cause of the 2019 novel Coronavirus Epidemic. / Rodriguez-Morales A.J., Bonilla-Aldana D.K., Balbin-Ramon G.J., Rabaan A.A., Sah R., Paniz-Mondolfi A., Pagliano P., Esposito S. // *Infez Med.* – 2020. – Vol. 28. – № 1. – P. 3–5.
346. Romano M. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. / Romano M., Ruggiero A., Squeglia F., Maga G., Berisio R. // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 1267.
347. Rossi G.A. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. / Rossi G.A., Sacco O., Mancino E., Cristiani L., Midulla F. // *Infection.* – 2020. – Vol. 48. – № 5. – P. 665-669.
348. Rottier P. Assembly in vitro of a spanning membrane protein of the endoplasmic reticulum: the E1 glycoprotein of coronavirus mouse hepatitis virus A59. / Rottier P., Brandenburg D., Armstrong J., van der Zeijst B., Warren G. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1984. – Vol. 81. – № 5. – P. 1421–1425.
349. Rubenwolf S. Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. / Rubenwolf S., Schütt H., Nevels M., Wolf H., Dobner T. // *J Virol.* – 1997. – Vol. 71. – № 2. – P. 1115-23.
350. Rux J.J. Adenovirus structure. / Rux J.J., Burnett R.M. // *Hum Gene Ther.* – 2004. – Vol. 15. – № 12. – P. 1167-76.
351. Rux J.J., Burnett R.M. Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon. / Rux J.J., Burnett R.M. // *Mol Ther.* – 2000. – Vol. 1. – № 1. – P.18–30.
352. Sadoff J. Final Analysis of Efficacy and Safety of Single-Dose Ad26.COV2.S. / Sadoff J., Gray G., Vandebosch A., Cárdenas V., Shukarev G., Grinsztejn B., Goepfert P.A., Truyers C., Van Dromme I., Spiessens B., Vingerhoets J., Custers J., Scheper G., Robb M.L., Treanor J., Ryser M.F., Barouch D.H., Swann E., Marovich M.A., Neuzil K.M., Corey L., Stoddard J., Hardt K., Ruiz-Guiñazú J., Le Gars M., Schuitemaker H., Van Hoof J., Struyf F., Douoguih M.; ENSEMBLE Study Group. // *N Engl J Med.* – 2022. – Vol. 386. – № 9. – P. 847-860.

353. Sadoff J. Safety and efficacy of single-dose Ad26.COV2.S vaccine against Covid-19. / Sadoff J., Gray G., Vandebosch A., Cárdenas V., Shukarev G., Grinsztejn B., Goepfert P.A., Truyers C., Fennema H., Spiessens B., Offergeld K., Scheper G., Taylor K.L., Robb M.L., Treanor J., Barouch D.H., Stoddard J., Ryser M.F., Marovich M.A., Neuzil K.M., Corey L., Cauwenberghs N., Tanner T., Hardt K., Ruiz-Guiñazú J., Le Gars M., Schuitemaker H., Van Hoof J., Struyf F., Douoguih M.; ENSEMBLE Study Group. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 384. – № 23. – P. 2187–2201.
354. Sanjuán R. Viral Mutation Rates. / Sanjuán R., Nebot M.R., Chirico N., Mansky L.M., Belshaw R. // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84. – № 19. – P. 9733–9748.
355. Sapkota B. Heterologous prime-boost strategies for COVID-19 vaccines. / Sapkota B., Saud B., Shrestha R., Al-Fahad D., Sah R., Shrestha S., Rodriguez-Morales A.J. // *J Travel Med.* – 2022. – VOL. 29. – № 3. – P. taab191.
356. Saville J.W. Three-Dimensional Visualization of Viral Structure, Entry, and Replication Underlying the Spread of SARS-CoV-2. / Saville J.W., Berezuk A.M., Srivastava S.S., Subramaniam S. // *Chem Rev.* – 2022. – Vol. 122. – № 17. – P. 14066-14084.
357. Sawicki S.G. A Contemporary View of Coronavirus Transcription. / Sawicki S.G., Sawicki D.L., Siddell S.G. // *J Virol.* – 2007. – Vol. 81. – № 1. – P. 20–29.
358. Sayedahmed E.E. Adenoviral vector-based vaccine platforms for developing the next generation of influenza vaccines. / Sayedahmed E.E., Elkashif A., Alhashimi M., Sambhara S., Mittal S.K. // *Vaccines (Basel).* – 2020. – Vol. 8. – № 4. – P. 574.
359. Sayedahmed E.E. Current use of adenovirus vectors and their production methods. / Sayedahmed E.E., Kumari R., Mittal S.K. // *Methods Mol Biol.* – 2019. – № 1937. – P. 155–175.
360. Schroth-Diez B. The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. / Schroth-Diez B., Ludwig K., Baljinnyam B., Kozerski C., Huang Q., Herrmann A. // *Biosci Rep.* – 2020. – Vol. 20. – № 6. – P. 571-595.

361. Schultz N.H. Thrombosis and thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 vaccination. / Schultz N.H., Sørvoll I.H., Michelsen A.E., Munthe L.A., Lund-Johansen F., Ahlen M.T., Wiedmann M., Aamodt A.H., Skattør T.H., Tjønnfjord G.E., Holme P.A. // *N Engl J Med.* – 2021 – Vol. 384. – № 22. – P. 2124-2130.
362. Scully M. Pathologic antibodies to platelet factor 4 after ChAdOx1 nCoV-19 vaccination. / Scully M., Singh D., Lown R., Poles A., Solomon T., Levi M., Goldblatt D., Kotoucek P., Thomas W., Lester W. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 384. – № 23. – P. 2202-2211.
363. Seaman M.S. Multiclade human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broad cellular and humoral immunity in rhesus monkeys. / Seaman M.S., Xu L., Beaudry K., Martin K.L., Beddall M.H., Miura A., Sambor A., Chakrabarti B.K., Huang Y., Bailer R., Koup R.A., Mascola J.R., Nabel G.J., Letvin N.L. // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79. – № 5. – P. 2956–2963.
364. Shang J. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. / Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2020. – Vol. 117. – № 21. – P. 11727–11734.
365. Shang J. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. / Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. // *Nature.* – 2020. – № 7807. – P. 221–224.
366. Shashkova E.V. Targeting Interferon-alpha increases antitumor efficacy and reduces hepatotoxicity of E1A-mutated spread-enhanced oncolytic adenovirus. / Shashkova EV, Spencer JF, Wold WS and Doronin K // *Mol Ther.* – 2020. – Vol. 15. – № 3. – P. 598–607.
367. Shiver J.W. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. / Shiver J.W., Emini E.A. // *Annu Rev Med.* – 2004. – Vol. 55. – P. 355-372.
368. Sironi M. SARS-CoV-2 and COVID-19: a genetic, epidemiological, and evolutionary perspective. / Sironi M., Hasnain S.E., Rosenthal B., Phan T., Luciani F., Shaw M.A., Sallum M.A., Mirhashemi M.E., Morand S., González-Candelas F.;

- Editors of Infection, Genetics and Evolution. // *Infect Genet Evol.* – 2020 – Vol. 84. – P. 104384.
369. Skowronski D.M. Two-dose SARS-CoV-2 vaccine effectiveness with mixed schedules and extended dosing intervals: test-negative design studies from British Columbia and Quebec, Canada. / Skowronski D.M., Setayeshgar S., Febriani Y., Ouakki M., Zou M., Talbot D., Prystajek N., Tyson J.R., Gilca R., Brousseau N., Deceuninck G., Galanis E., Fjell C.D., Sbihi H., Fortin E., Barkati S., Sauvageau C., Naus M., Patrick D.M., Henry B., Hoang L.M.N., De Wals P., Garenc C., Carignan A., Drolet M., Jassem A.N., Sadarangani M., Brisson M., Krajden M., De Serres G. // *Clin Infect Dis.* – 2022. – Vol. 75. – № 11. – P. 1980-1992.
370. Smith C.A. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. / Smith C.A., Woodruff L.S., Rooney C., Kitchingman G.R. // *Hum Gene Ther.* – 1998. – Vol. 9. – № 10. – P. 1419–1427.
371. Snijder E.J. A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. / Snijder E.J., Limpens R.W.A.L., de Wilde A.H., de Jong A.W.M., Zevenhoven-Dobbe J.C., Maier H.J., Faas F.F.G.A., Koster A.J., Bárcena M. // *PLoS Biol.* – 2020. – Vol. 18. – № 6. – P. e3000715.
372. Sridhar S. Safety and immunogenicity of an AS03-adjuvanted SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine (CoV2 preS dTM) in healthy adults: interim findings from a phase 2, randomised, dose-finding, multicentre study. / Sridhar S., Joaquin A., Bonaparte M.I., Bueso A., Chabanon A.L., Chen A., Chicz R.M., Diemert D., Essink B.J., Fu B., Grunenber N.A., Janoszyk H., Keefer M.C., Rivera M.D.M., Meng Y., Michael N.L., Munsiff S.S., Ogbuagu O., Raabe V.N., Severance R., Rivas E., Romanyak N., Roupheal N.G., Schuerman L., Sher L.D., Walsh S.R., White J., von Barbier D., de Bruyn G., Canter R., Grillet M.H., Keshtkar-Jahromi M., Koutsoukos M., Lopez D., Masotti R., Mendoza S., Moreau C., Ceregido M.A., Ramirez S., Said A., Tavares-Da-Silva F., Shi J., Tong T., Treanor J., Diazgranados C.A., Savarino S. // *Lancet Infect Dis.* – 2022. – Vol. 22. – № 5. – P. 636-648.

373. Stephenson K.E. New concepts in HIV-1 vaccine development. / Stephenson K.E., D’Couto H.T., Barouch D.H. // *Curr Opin Immunol.* – 2016. – Vol. 41. – P. 39–46.
374. Sturman L.S. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. / Sturman L.S., Holmes K.V., Behnke J. // *J Virol.* – 1980. – Vol. 33. – № 1. – P. 449–462.
375. Su S. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. / Su S., Wong G., Shi W., Liu J., Lai A.C.K., Zhou J., Liu W., Bi Y., Gao G.F. // *Trends Microbiol.* – 2016. – Vol. 24. – № 6. – P. 490–502.
376. Sullivan N.J. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. / Sullivan N.J., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Xu L., Yang Z.Y., Roederer M., Koup R.A., Jahrling P.B., Nabel G.J. // *Nature.* – 2003. – Vol. 424. – № 6949. – P. 681–684.
377. Sullivan N.J. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. / Sullivan N.J., Sanchez A., Rollin P.E., Yang Z.Y., Nabel G.J. // *Nature.* – 2000. – Vol. 408. – № 6812. – P. 605–609.
378. Sumida S.M. Neutralizing antibodies and CD8⁺ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. / Sumida SM, Truitt DM, Kishko MG, Arthur JC, Jackson SS, Gorgone DA, Lifton MA, Koudstaal W, Pau MG, Kostense S, Havenga MJ, Goudsmit J, Letvin NL, Barouch DH. // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78. – № 6. – P. 2666–2673.
379. Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. / Sun L., Wu J., Du F., Chen X., Chen Z.J. // *Science.* – 2013. – Vol. 339. – № 6121. – P. 786–791.
380. Sungnak W. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. / Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, Talavera-López C, Maatz H, Reichart D, Sampaziotis F, Worlock KB, Yoshida M, Barnes JL; HCA Lung Biological Network. // *Nat Med.* – 2020. – Vol. 26. – № 5. – P. 681–687.
381. Surjit M. The nucleocapsid protein of the SARS coronavirus is capable of self-association through a C-terminal 209 amino acid interaction domain. / Surjit M., Liu

- B., Kumar P., Chow V.T., Lal S.K. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – Vol. 317. – № 4. – P. 1030–1036.
382. Tai W. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. / Tai W., He L., Zhang X., Pu J., Voronin D., Jiang S., Zhou Y., Du L. // *Cell Mol Immunol.* – 2020. – Vol. 17. – № 6. – P. 613–620.
383. Tan W.G. Comparative analysis of simian immunodeficiency virus gag-specific effector and memory CD8⁺ T cells induced by different adenovirus vectors. / Tan W.G., Jin H.T., West E.E., Penaloza-MacMaster P., Wieland A., Zilliox M.J. // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87. – № 3. – P. 1359–1372.
384. Tang J. Adenovirus hexon T-cell epitope is recognized by most adults and is restricted by HLA DP4, the most common class II allele. / Tang J., Olive M., Champagne K., Flomenberg N., Eisenlohr L., Hsu S., Flomenberg P. // *Gene Ther.* – 2004. – Vol. 11. – № 18. – P. 1408–1415.
385. Tanriover M.D. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. / Tanriover M.D., Doğanay H.L., Akova M., Güner H.R., Azap A., Akhan S., Köse Ş., Erdiñç F.Ş., Akalın E.H., Tabak Ö.F., Pullukçu H., Batum Ö., Şimşek Yavuz S., Turhan Ö., Yıldırım M.T., Köksal İ., Taşova Y., Korten V., Yılmaz G., Çelen M.K., Altın S., Çelik İ., Bayındır Y., Karaoğlan İ., Yılmaz A., Özkul A., Gür H., Unal S.; CoronaVac Study Group. // *Lancet.* – 2021. – Vol. 398. – № 10296. – P. 213–222.
386. Tapia M.D. Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. / Tapia M.D., Sow S.O., Lyke K.E., Haidara F.C., Diallo F., Doumbia M., Traore A., Coulibaly F., Kodio M., Onwuchekwa U., Szein M.B., Wahid R., Campbell J.D., Kieny M.P., Moorthy V., Imoukhuede E.B., Rampling T., Roman F., De Ryck I., Bellamy A.R., Dally L., Mbaya O.T., Ploquin A., Zhou Y., Stanley D.A., Bailer R., Koup R.A., Roederer M.,

- Ledgerwood J., Hill A.V.S., Ballou W.R., Sullivan N., Graham B., Levine M.M. // *Lancet Infect Dis.* – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 31–42.
387. Tatsis N. A CD46-binding chimpanzee adenovirus vector as a vaccine carrier. / Tatsis N., Blejer A., Lasaro M.O., Hensley S.E., Cun A., Tesema L., Li Y., Gao G.P., Xiang Z.Q., Zhou D., Wilson J.M., Ertl H.C. // *Mol. Ther.* – 2007. – Vol. 15. – № 3. – P. 608-617.
388. Tatsis N. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8+ T cells: implications for their use as vaccines. / Tatsis N., Fitzgerald J.C., Reyes-Sandoval A., Harris-McCoy K.C., Hensley S.E., Zhou D., Lin S.W., Bian A., Xiang Z.Q., Iparraguirre A., Lopez-Camacho C., Wherry E.J., Ertl H.C. // *Blood.* – 2007. – Vol. 110. – № 6. – P. 1916-1923.
389. Tavakolpour S. Lymphopenia during the COVID-19 infection: what it shows and what can be learned. / Tavakolpour S., Rakhshandehroo T., Wei E.X., Rashidian M. // *Immunol Lett.* – 2020. – Vol. 225. – P. 31-32.
390. Teigler J.E. Vaccination with adenovirus serotypes 35, 26, and 48 elicits higher levels of innate cytokine responses than adenovirus serotype 5 in rhesus monkeys. / Teigler J.E., Iampietro M.J., Barouch D.H. // *J Virol.* – 2012. – Vol. 86. – № 183. – P. 9590–9598.
391. Thomas S.J. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine through 6 Months. / Thomas S.J., Moreira E.D. Jr, Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez Marc G., Polack F.P., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Xu X., Roychoudhury S., Koury K., Bouguermouh S., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W. Jr, Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Yang Q., Liberator P., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Gruber W.C., Jansen K.U.; C4591001 Clinical Trial Group. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 385. – № 19. – P. 1761–1773.
392. Tian J.H. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. / Tian J.H., Patel N., Haupt R., Zhou H., Weston S., Hammond H., Logue J., Portnoff A.D., Norton J., Guebrenx M., Zhou B., Jacobson K., Maciejewski S., Khatoon R., Wisniewska M.,

- Moffitt W., Kluepfel-Stahl S., Ekechukwu B., Papin J., Boddapati S., Jason Wong C., Piedra P.A., Frieman M.B., Massare M.J., Fries L., Bengtsson K.L., Stertman L., Ellingsworth L., Glenn G., Smith G. // *Nat Commun.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 372.
393. Tostanoski L.H. Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. / Tostanoski L.H., Wegmann F., Martinot A.J., Loos C., McMahan K., Mercado N.B., Yu J., Chan C.N., Bondoc S., Starke C.E., Nekorchuk M., Busman-Sahay K., Piedra-Mora C., Wrijil L.M., Ducat S., Custers J., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Lin Z., Mahrokhian S.H., Nampanya F., Nityanandam R., Pessaint L., Porto M., Ali V., Benetiene D., Tevi K., Andersen H., Lewis M.G., Schmidt A.G., Lauffenburger D.A., Alter G., Estes J.D., Schuitemaker H., Zahn R., Barouch D.H. // *Nat Med.* – 2020. – Vol. 26. – № 11. – P. 1694–1700.
394. Tsuchiya Y. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of Ad26.COV2.S: Results of a phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled COVID-19 vaccine trial in Japan. / Tsuchiya Y., Tamura H., Fujii K., Numaguchi H., Toyozumi K., Liu T., Le Gars M., Cárdenas V., Eto T. // *Vaccine.* – 2023. – Vol. 41. – № 9. – P. 1602-1610.
395. Tukhvatulin A.I. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine "Sputnik Light" for prevention of coronavirus infection in healthy adults. / Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaia T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zubkova T.G., Zakharov K.A., Vasilyuk V.B., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. // *Lancet Reg Health Eur.* – 2021. – Vol. 11. – P. 100241.
396. Tukhvatulin A.I. Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-

- human primates. / Tukhvatulin A.I., Gordeychuk I.V., Dolzhikova I.V., Dzharullaeva A.S., Krasina M.E., Bayurova E.O., Grousova D.M., Kovyrshina A.V., Kondrashova A.S., Avdoshina D.V., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Illarionova V.V., Zorkov I.D., Iliukhina A.A., Shelkov A.Y., Botikov A.G., Erokhova A.S., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Zubkova O.V., Tokarskaya E.A., Savina D.M., Vereveyko Y.R., Ungur A.S., Naroditsky B.S., Ishmukhametov A.A., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. // *Emerg Microbes Infect.* – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. 2229-2247.
397. Tukhvatulin, A.I. Safety and immunogenicity of rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine against SARS-CoV-2 in healthy adolescents: an open-label, non-randomized, multicenter, phase 1/2, dose-escalation study. / Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Kovyrshina A.V., Zubkova O.V., Zorkov I.D., Iliukhina A.A., Shelkov A.Y., Erokhova A.S., Popova O., Ozharovskaia T.A., Zrelkin D.I., Izhaeva F.M., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Tokarskaya E.A., Nikitenko N.A., Lubenets N.L., Khadorich E.A., Gushchin V.A., Borzakova S.N., Vlasova A.V., Osmanov I.M., Gorev V.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L.// *Front Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1228461.
398. Turner J.S. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. / Turner J.S., Kim W., Kalaidina E., Goss C.W., Rauseo A.M., Schmitz A.J., Hansen L., Haile A., Klebert M.K., Pusic I., O'Halloran J.A., Presti R.M., Ellebedy A.H. // *Nature.* – 2021. – Vol. 595. – № 7867. – P. 421–425.
399. van Doremalen N. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. / van Doremalen N., Lambe T., Spencer A., Belij-Rammerstorfer S., Purushotham J.N., Port J.R., Avanzato V.A., Bushmaker T., Flaxman A., Ulaszewska M., Feldmann F., Allen E.R., Sharpe H., Schulz J., Holbrook M., Okumura A., Meade-White K., Pérez-Pérez L., Edwards N.J., Wright D., Bissett C., Gilbride C., Williamson B.N., Rosenke R., Long D., Ishwarbhai A., Kailath R., Rose L., Morris S., Powers C., Lovaglio J., Hanley P.W., Scott D., Saturday G., de Wit E., Gilbert S.C., Munster V.J. // *Nature.* – 2020. – Vol. 586. – № 7830. – P. 578–582.

400. van Oostrum J. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. / van Oostrum J, Burnett RM. // *J Virol.* – 1985. – Vol. 56. – № 2. – P. 439-448.
401. Venkatagopalan P. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. / Venkatagopalan P., Daskalova S.M., Lopez L.A., Dolezal K.A., Hogue B.G. // *Virology.* – 2015. – Vol. 478. – P. 75–85.
402. Venkatraman N. Safety and immunogenicity of a heterologous prime-boost Ebola virus vaccine regimen - ChAd3-EBO-Z followed by MVA-EBO-Z in healthy adults in the UK and Senegal. / Venkatraman N., Ndiaye B.P., Bowyer G., Wade D., Sridhar S., Wright D., Powlson J., Ndiaye I., Dièye S., Thompson C., Bakhoum M., Morter R., Capone S., Del Sorbo M., Jamieson S., Rampling T., Datto M., Roberts R., Poulton I., Griffiths O., Ballou W.R., Roman F., Lewis D.J.M., Lawrie A., Imoukhuede E., Gilbert S.C., Dieye T.N., Ewer K.J., Mboup S., Hill A.V.S. // *J Infect Dis.* – 2019. – Vol. 219. – № 8. – P. 1187-1197.
403. Verdiá-Báguena C. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. / Verdiá-Báguena C., Nieto-Torres J.L., Alcaraz A., DeDiego M.L., Torres J., Aguilera V.M., Enjuanes L. // *Virology.* – 2012. – Vol. 432. – № 2. – P. 485–494.
404. Verma S.K.. Influence of Th1 Versus Th2 Immune Bias on Viral, Pathological, and Immunological Dynamics in SARS-CoV-2 Variant-Infected Human ACE2 Knock-in Mice. / Verma S.K., Ana-Sosa-Batiz F., Timis J., Shafee N., Maule E., Pinto P.B.A., Conner C., Valentine K.M., Cowley D.O., Miller R., Elong Ngonu A., Tran L., Varghese K., Dos Santos Alves R.P., Hastie K.M., Sapphire E.O., Webb D.R., Jarnagin K., Kim K., Shresta S. // *EBioMedicine.* – 2024. –№ 108. – P. 105361.
405. Vinner L. Immunogenicity in Mamu-A*01 rhesus macaques of a CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope from the primary isolate DSTO-GD-047413 (Bx08) after synthetic DNA prime and recombinant adenovirus 5 boost. / Vinner L., Wee E.G., Patel S. // *J Gen Virol.* – 2003. – Vol. 84. – № 1. – P. 203–13.
406. Vokó Z. Nationwide effectiveness of five SARS-CoV-2 vaccines in Hungary-the HUN-VE study. / Vokó Z., Kiss Z., Surján G., Surján O., Barcza Z., Pályi B., Formanek-Balku E., Molnár G.A., Herczeg R., Gyenesei A., Miseta A., Kollár L.,

- Wittmann I., Müller C., Kásler M. // *Clin Microbiol Infect.* – 2022. – Vol. 28. – № 3. – P. 398-404.
407. 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. / Voysey M., Clemens S.A.C., Madhi S.A., Weckx L.Y., Folegatti P.M., Aley P.K., Angus B., Baillie V.L., Barnabas S.L., Bhorat Q.E., Bibi S., Briner C., Cicconi P., Collins A.M., Colin-Jones R., Cutland C.L., Darton T.C., Dheda K., Duncan C.J.A., Emary K.R.W., Ewer K.J., Fairlie L., Faust S.N., Feng S., Ferreira D.M., Finn A., Goodman A.L., Green C.M., Green C.A., Heath P.T., Hill C., Hill H., Hirsch I., Hodgson S.H.C., Izu A., Jackson S., Jenkin D., Joe C.C.D., Kerridge S., Koen A., Kwatra G., Lazarus R., Lawrie A.M., Lelliott A., Libri V., Lillie P.J., Mallory R., Mendes A.V.A., Milan E.P., Minassian A.M., McGregor A., Morrison H., Mujadidi Y.F., Nana A., O'Reilly P.J., Padayachee S.D., Pittella A., Plested E., Pollock K.M., Ramasamy M.N., Rhead S., Schwarzbald A.V., Singh N., Smith A., Song R., Snape M.D., Sprinz E., Sutherland R.K., Tarrant R., Thomson E.C., Török M.E., Toshner M., Turner D.P.J., Vekemans J., Villafana T.L., Watson M.E.E., Williams C.J., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J.; Oxford COVID Vaccine Trial Group. // *Lancet.* – 2021. – Vol. 397. – № 10269. – P. 99–111.
408. Wacharapluesadee S. Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. / Wacharapluesadee S., Tan C.W., Maneorn P., Duengkae P., Zhu F., Joyjinda Y., Kaewpom T., Chia W.N., Ampoot W., Lim B.L., Worachotsueptrakun K., Chen V.C., Sirichan N., Ruchisrisarod C., Rodpan A., Noradechanon K., Phaichana T., Jantararat N., Thongnumchaima B., Tu C., Cramer G., Stokes M.M., Hemachudha T., Wang LF. // *Nat Commun.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 972.
409. Walls A.C. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. / Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Velesler D. // *Cell.* – 2020. – Vol. 181. – № 2. – P. 281–292.

410. Walsh E.E. Safety and immunogenicity of two RNA-based COVID-19 vaccine candidates. / Walsh E.E., Frenck R.W. Jr, Falsey A.R., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Neuzil K., Mulligan M.J., Bailey R., Swanson K.A., Li P., Koury K., Kalina W., Cooper D., Fontes-Garfias C., Shi P.Y., Türeci Ö., Tompkins K.R., Lyke K.E., Raabe V., Dormitzer P.R., Jansen K.U., Şahin U., Gruber W.C. // *N Engl J Med.* – 2020. – Vol. 383. – № 25. – P. 2439–2450.
411. Wang H. Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. / Wang H., Zhang Y., Huang B., Deng W., Quan Y., Wang W., Xu W., Zhao Y., Li N., Zhang J., Liang H., Bao L., Xu Y., Ding L., Zhou W., Gao H., Liu J., Niu P., Zhao L., Zhen W., Fu H., Yu S., Zhang Z., Xu G., Li C., Lou Z., Xu M., Qin C., Wu G., Gao G.F., Tan W., Yang X. // *Cell.* – 2020. – Vol. 182. – № 3. – P. 713-721.
412. Wang Q. Second-generation adenovirus vectors. / Wang Q., Finer M.H. // *Nat Med.* – 1996. – Vol. 2. – № 6. – P. 714-716.
413. Wang X. Comparative analysis of the impact of 40 adenovirus types on dendritic cell activation and CD8⁺ T cell proliferation capacity for the identification of favorable immunization vector candidates. / Wang X., Hetzel M., Zhang W., Ehrhardt A., Bayer W. // *Front Immunol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1286622.
414. Wang Y. Coronaviruses: An Updated Overview of Their Replication and Pathogenesis. / Wang Y., Grunewald M., Perlman S. // *Methods Mol Biol.* – 2020. – Vol. 2203. – P. 1-29.
415. Wang Y.T. Spiking Pandemic Potential: Structural and Immunological aspects of SARS-CoV2. / Wang Y.T., Landeras-Bueno S., Hsieh L.E., Terada Y., Kim K., Ley K., Shresta S., Saphire E.O., Regla-Nava J.A. // *Trends in Microbiol.* – 2020. – Vol. 28. – № 8. – P. 605–618.
416. Warkentin T.E. VIPIT versus VITT: what's in a name? / Warkentin T.E., Pai M. // *Thromb Res.* – 2021. – Vol. 207. – P. 158–160.
417. Weiss S.R. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. / Weiss S.R., Navas-Martin S. // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2005. – Vol. 69. – № 4. – P. 635–664.

418. Widge A.T. Durability of responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccination. / Widge A.T., Roupheal N.G., Jackson L.A., Anderson E.J., Roberts P.C., Makhene M., Chappell J.D., Denison M.R., Stevens L.J., Pruijssers A.J., McDermott A.B., Flach B., Lin B.C., Doria-Rose N.A., O'Dell S., Schmidt S.D., Neuzil K.M., Bennett H., Leav B., Makowski M., Albert J., Cross K., Edara V.V., Floyd K., Suthar M.S., Buchanan W., Luke C.J., Ledgerwood J.E., Mascola J.R., Graham B.S., Beigel J.H.; mRNA-1273 Study Group. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 384. – № 1. – P. 80–82.
419. Wiersinga W.J. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). / Wiersinga W.J., Rhodes A., Cheng A.C., Peacock S.J., Prescott H.C. // *JAMA.* – 2020. – Vol. 324. – № 8. – P. 782.
420. Winberg G. Structural polypeptides of adenovirus type 16 incomplete particles. / Winberg G., Wadell G. // *J Virol.* – 1977. – Vol. 22. – № 2. – P. 389-401.
421. Wolff G. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. / Wolff G., Limpens R.W.A.L., Zevenhoven-Dobbe J.C., Laugks U., Zheng S., de Jong A.W.M., Koning R.I., Agard D.A., Grünewald K., Koster A.J., Snijder E.J., Bárcena M. // *Science.* – 2020. – Vol. 369. – № 6509. – P. 1395–1398.
422. Woo P.C. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. / Woo P.C., Lau S.K., Lam C.S., Lau C.C., Tsang A.K., Lau J.H., Bai R., Teng J.L., Tsang C.C., Wang M., Zheng B.J., Chan K.H., Yuen K.Y. // *J Virol.* – 2012. – Vol. 86. – № 7. – P. 3995–4008.
423. Wootton S.K. Phosphorylation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. / Wootton S.K., Rowland R.R., Yoo D. // *J Virol.* – 2002. – Vol. 76. – № 20. – P. 10569–10576.
424. Wrapp D. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. / Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. // *Science.* – 2020. – Vol. 367. – № 6483. – P. 1260-1263.

425. Wu C. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. / Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S., Huang H., Zhang L., Zhou X., Du C., Zhang Y., Song J., Wang S., Chao Y., Yang Z., Xu J., Zhou X., Chen D., Xiong W., Xu L., Zhou F., Jiang J., Bai C., Zheng J., Song Y. // *JAMA Intern. Med.* – 2020a. – Vol. 180. – № 7. – P. 934–943.
426. Wu L. Open-label phase I clinical trial of Ad5-EBOV in Africans in China. / Wu L., Zhang Z., Gao H., Li Y., Hou L., Yao H., Wu S., Liu J., Wang L., Zhai Y., Ou H., Lin M., Wu X., Liu J., Lang G., Xin Q., Wu G., Luo L., Liu P., Shentu J., Wu N., Sheng J., Qiu Y., Chen W., Li L. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2017. – Vol. 13. – № 9. – P. 2078-2085.
427. Wu S. A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. / Wu S., Zhong G., Zhang J., Shuai L., Zhang Z., Wen Z., Wang B., Zhao Z., Song X., Chen Y., Liu R., Fu L., Zhang J., Guo Q., Wang C., Yang Y., Fang T., Lv P., Wang J., Xu J., Li J., Yu C., Hou L., Bu Z., Chen W. // *Nat Commun.* – 2020b. – Vol. 11. – № 1. – P. 4081.
428. Xia S. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. / Xia S., Zhang Y., Wang Y., Wang H., Yang Y., Gao G.F., Tan W., Wu G., Xu M., Lou Z., Huang W., Xu W., Huang B., Wang H., Wang W., Zhang W., Li N., Xie Z., Ding L., You W., Zhao Y., Yang X., Liu Y., Wang Q., Huang L., Yang Y., Xu G., Luo B., Wang W., Liu P., Guo W., Yang X. // *Lancet Infect Dis.* – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 39-51.
429. Xiao D.A.T. Profile of specific antibodies to SARS-CoV2: the first report. / Xiao D.A.T., Gao D.C., Zhang D.S. // *J Infect.* – 2020a. – Vol. 81. – № 1. – P. 147–178.
430. Xiao K. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. / Xiao K., Zhai J., Feng Y., Zhou N., Zhang X., Zou J.J., Li N., Guo Y., Li X., Shen X., Zhang Z., Shu F., Huang W., Li Y., Zhang Z., Chen R.A., Wu Y.J., Peng S.M., Huang M., Xie W.J., Cai Q.H., Hou F.H., Chen W., Xiao L., Shen Y. // *Nature.* – 2020b. – Vol. 583. – № 7815. – P. 286–289.

431. Xiong Y. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. / Xiong Y., Liu Y., Cao L., Wang D., Guo M., Jiang A., Guo D., Hu W., Yang J., Tang Z., Wu H., Lin Y., Zhang M., Zhang Q., Shi M., Liu Y., Zhou Y., Lan K., Chen Y. // *Emerg Microbes Infect.* – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 761–770.
432. Yadav P.D. Immunogenicity and protective efficacy of inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidate, BBV152 in rhesus macaques. / Yadav P.D., Ella R., Kumar S., Patil D.R., Mohandas S., Shete A.M., Vadrevu K.M., Bhati G., Sapkal G., Kaushal H., Patil S., Jain R., Deshpande G., Gupta N., Agarwal K., Gokhale M., Mathapati B., Metkari S., Mote C., Nyayanit D., Patil D.Y., Sai Prasad B.S., Suryawanshi A., Kadam M., Kumar A., Daigude S., Gopale S., Majumdar T., Mali D., Sarkale P., Baradkar S., Gawande P., Joshi Y., Fulari S., Dighe H., Sharma S., Gunjekar R., Kumar A., Kalele K., Srinivas V.K., Gangakhedkar R.R., Ella K.M., Abraham P., Panda S., Bhargava B. // *Nat Commun.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 1386.
433. Yadav T. Recombinant vaccines for COVID-19. / Yadav T., Srivastava N., Mishra G., Dhama K., Kumar S., Puri B., Saxena S.K. // *Hum Vaccines Immunother.* – 2020. – Vol. 16. – № 12. – P. 2905–2912.
434. Yan R. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. / Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. // *Science.* – 2020. – Vol. 367. – № 6485. – P. 1444–1448.
435. Yang D. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. / Yang D., Leibowitz J.L. // *Virus Res.* – 2015. – Vol. 206. – P. 120–133.
436. Yang T.C. The CD8⁺ T cell population elicited by recombinant adenovirus displays a novel partially exhausted phenotype associated with prolonged antigen presentation that nonetheless provides long-term immunity. / Yang T.C., Millar J., Groves T., Grinshtein N., Parsons R., Takenaka S., Wan Y., Bramson J.L. // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176. – № 1. – P. 200–210.
437. Yang Y. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. / Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E., Gonczol E., Wilson J.M. // *Proc Natl Acad Sci.* – 1994b. – Vol. 91. – № 10. – P. 4407–4411.

438. Yang Y. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. / Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Gonczol E., Engelhardt J.F., Wilson J.M. // *Nat Genet.* – 1994a. – Vol. 7. – № 3. – P. 362–369.
439. Ye Q. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. / Ye Q., Wang B., Mao J. // *J Infect.* – 2020a. – Vol. 80. – № 6. – P. 607–613.
440. Ye Z.W. Zoonotic origins of human coronaviruses. / Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. // *Int J Biol Sci.* – 2020. – Vol. 16. – № 10. – P. 1686–1697.
441. Yi Y. COVID-19: what has been learned and to be learned about the novel coronavirus disease. / Yi Y., Lagniton P.N.P., Ye S., Li E., Xu R.H. // *Int J Biol Sci.* – 2020. – Vol. 16. – № 10. – P. 1753–1766.
442. Yılmaz E. New Hopes in Vaccine Technology: mRNA Vaccines. / Yılmaz E. // *Mikrobiyol Bul.* – 2021. – Vol. 55. – № 2. – P. 265–284.
443. Yocum A. Thrombotic thrombocytopenic purpura after Ad26.COVS-2 Vaccination. / Yocum A., Simon E.L. // *Am J Emerg Med.* – 2021. – Vol. 49. – P. 441.
444. Yong SJ. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. / Yong SJ. // *Infect Dis (Lond).* – 2021. – Vol. 53. – № 10. – P. 737-754.
445. Yu I.M. Crystal structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein dimerization domain reveals evolutionary linkage between corona- and arteriviridae. / Yu I.M., Oldham M.L., Zhang J., Chen J. // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281. – № 25. – P. 17134-17139.
446. Yu X. Cryo-EM structure of human adenovirus D26 reveals the conservation of structural organization among human adenoviruses. / Yu X., Veasler D., Campbell M.G., Barry M.E., Asturias F.J., Barry M.A., Reddy V.S. // *Sci Adv.* – 2017. – Vol. 3. – № 5. – P. e1602670.
447. Yuan Y. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. / Yuan Y., Cao D., Zhang Y., Ma J., Qi

- J., Wang Q., Lu G., Wu Y., Yan J., Shi Y., Zhang X., Gao G.F. // *Nat. Commun.* – 2017. – № 8. – P. 15092.
448. Zagury D. A group specific anamnestic immune reaction against HIV-1 induced by a candidate vaccine against AIDS. / Zagury D., Bernard J., Cheynier R., Desportes I., Leonard R., Fouchard M., Reveil B., Ittele D., Lurhuma Z., Mbayo K., Wane J., Salaun J.J., Goussard B., Dechazal L., Burny A., Nara P., Gallo R.C. // *Nature.* – 1988. – Vol. 332. – № 6166. – P. 728–731.
449. Zhang B. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. / Zhang B., Zhou X., Zhu C., Song Y., Feng F., Qiu Y., Feng J., Jia Q., Song Q., Zhu B., Wang J. // *Front Mol Biosci.* – 2020a. – № 7. – P. 157.
450. Zhang J. Membrane heist: Coronavirus host membrane remodeling during replication. / Zhang J., Lan Y., Sanyal S. // *Biochimie.* – 2020c. – № 179. – P. 229–236.
451. Zhang T. Probable pangolin origin of SARSCoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. / Zhang T., Wu Q., Zhang Z. // *Curr. Biol.* – 2020b. – Vol. 30. – № 7. – P. 1346–1351.
452. Zhang Z. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. / Zhang Z., Nomura N., Muramoto Y., Ekimoto T., Uemura T., Liu K., Yui M., Kono N., Aoki J., Ikeguchi M., Noda T., Iwata S., Ohto U., Shimizu T. // *Nat Commun.* – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 4399.
453. Zhao W. Heterologous prime-boost regimens with HAdV-5 and NDV vectors elicit stronger immune responses to Ebola virus than homologous regimens in mice. / Zhao W., Zhang P., Bai S., Lv M., Wang J., Chen W., Yu Q., Wu J. // *Arch Virol.* – 2021. – Vol. 166. – № 12. – P. 3333–3341.
454. Zhou F. Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a Retrospective Cohort Study. / Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395. – № 10229. – P. 1054–1062.

455. Zhou M. The infectious bronchitis virus nucleocapsid protein binds RNA sequences in the 3' terminus of the genome. / Zhou M., Williams A.K., Chung S.I., Wang L., Collisson E.W. // *Virology*. – 1996. – Vol. 217. – № 1. – P. 191–199.
456. Zhu F.C. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, doubleblind, placebo-controlled, phase 2 trial. / Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., Huang J.Y., Jiang T., Hou L.H., Li J.X., Yang B.F., Wang L., Wang W.J., Wu S.P., Wang Z., Wu X.H., Xu J.J., Zhang Z., Jia S.Y., Wang B.S., Hu Y., Liu J.J., Zhang J., Qian X.A., Li Q., Pan H.X., Jiang H.D., Deng P., Gou J.B., Wang X.W., Wang X.H., Chen W. // *Lancet*. – 2020a. – Vol. 396. – № 10249. – P. 479–488.
457. Zhu F.C. Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. / Zhu F.C., Hou L.H., Li J.X., Wu S.P., Liu P., Zhang G.R., Hu Y.M., Meng F.Y., Xu J.J., Tang R., Zhang J.L., Wang W.J., Duan L., Chu K., Liang Q., Hu J.L., Luo L., Zhu T., Wang J.Z., Chen W. // *Lancet* . – 2015. – Vol. 385. – № 19984. – P. 2272-2279.
458. Zhu F.C. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. / Zhu F.C., Li Y.H., Guan X.H., Hou L.H., Wang W.J., Li J.X., Wu S.P., Wang B.S., Wang Z., Wang L., Jia S.Y., Jiang H.D., Wang L., Jiang T., Hu Y., Gou J.B., Xu S.B., Xu J.J., Wang X.W., Wang W., Chen W. // *Lancet*. – 2020b. – Vol. 395. – № 10240. – P. 1845-1854.
459. Zhu J. A critical role for type I IFN-dependent NK cell activation in innate immune elimination of adenoviral vectors in vivo. / Zhu J., Huang X., Yang Y. // *Mol. Ther.* – 2008. – Vol. 16. – № 7. – P. 1300–1307.
460. Zhu J. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. / Zhu J, Huang X, Yang Y. // *J Virol*. – 2007. – Vol. 81. – № 7. – P. 3170–3180.
461. Zhu N. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. / Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R.,

- Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W.; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. // *N Engl J Med.* – 2020c. – Vol. 382. – № 8. – P. 727–33.
462. Ziebuhr J. The coronavirus replicase. / Ziebuhr J. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2005. – № 287. – P. 57-94.
463. Ziebuhr J. The coronavirus replicase: insights into a sophisticated enzyme machinery. / Ziebuhr J. // *Adv Exp Med Biol.* – 2006. – № 581. – P. 3-11.
464. Zinzula L. High-resolution structure and biophysical characterization of the nucleocapsid phosphoprotein dimerization domain from the COVID-19 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. / Zinzula L., Basquin J., Bohn S., Beck F., Klumpe S., Pfeifer G., Nagy I., Bracher A., Hartl F.U., Baumeister W. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2021. – № 538. – P. 54–62.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Паспорта штаммов рекомбинантных аденовирусов

	<p>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России</p> <p>Государственная Коллекция Вирусов</p> <p>123098, Москва, ул. Гамалеи, 16. Тел.: (499) 1903060, (499) 2777820 Факс.: (499) 2777819 http://www.viruscollection.ru E-mail: info@viruscollection.ru</p>
<h2>ПАСПОРТ ШТАММА</h2>	
<p>1. Наименование штамма: штамм “rAd26-S-CoV2”, вируса Human Adenovirus D, род <i>Mastadenovirus</i>, семейство <i>Adenoviridae</i>.</p>	
<p>2. Родословная штамма: Штамм получен в лаборатории иммунобиотехнологии методами геной инженерии в 2020 году (15.03.2020).</p>	
<p>3. Номер в коллекции ГКВ: 2942</p>	
<p>4. Количество пассажей: 2</p>	
<p>5. Характеристика штамма (культуральные, молекулярно-генетические свойства). Размножается в клетках HEK293 при температуре 36±1°C в течение 40-72 часов. Генетически подтвержден методом полногеномного секвенирования. Активность штамма 1,3x10⁷ TCID₅₀/мл.</p>	
<p>6. Назначение штамма: Возможно использование штамма в качестве кандидатного вакцинного препарата для профилактики новой коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.</p>	
<p>7. Дополнительные сведения о штамме: Штамм экспрессирует S-белок коронавируса SARS-CoV-2. Штамм репликативно-дефектный, получен на основе рекомбинантного аденовируса 26 серотипа, с делетированными E1 и E3 областями, и заменой открытой рамки считывания 6/7 (ORF6/7) на ORF6/7 аденовируса человека 5 серотипа.</p>	
<p>Заместитель директора ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России</p>	<p>Д.Ю.Логунов</p>
	



Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Государственная Коллекция Вирусов

123098, Москва, ул. Гамалеи, 16. Тел.: (499) 1903060, (499) 2777820 Факс.: (499) 2777819
http://www.viruscollection.ru E-mail: info@viruscollection.ru

ПАСПОРТ ШТАММА

1. **Наименование штамма:** штамм "rAd5-S-CoV2", вируса Human Adenovirus C, род *Mastadenovirus*, семейство *Adenoviridae*.
2. **Родословная штамма:** Штамм получен в лаборатории иммунобиотехнологии методами геной инженерии в 2020 году (06.03.2020).
3. **Номер в коллекции ГКВ:** 2941
4. **Количество пассажей:** 2
5. **Характеристика штамма** (культуральные, молекулярно-генетические свойства). Размножается в клетках HEK293 при температуре $36\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 40-72 часов. Генетически подтвержден методом полногеномного секвенирования. Активность штамма $2,4 \times 10^7$ TCID₅₀/мл.
6. **Назначение штамма:** Возможно использование штамма в качестве кандидатного вакцинного препарата для профилактики новой коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.
7. **Дополнительные сведения о штамме:** Штамм экспрессирует S-белок коронавируса SARS-CoV-2. Штамм репликативно-дефектный, получен на основе рекомбинантного аденовируса 5 серотипа с делетированными E1 и E3 областями.

Заместитель директора
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России



Д.Ю.Логунов

Приложение Б. Разрешения на проведение клинических исследований


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РАЗРЕШЕНИЕ № 241
на проведение клинических исследований
от 16 июня 2020 г.

Настоящим разрешается проведение клинических исследований
Гам-КОВИД-Вак
(комбинированная лекторная вакцина для профилактики коронавирусной
инфекции, вызванной новым вирусом SARS-CoV-2)
(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения:
разработчик лекарственного препарата ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России (филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России), Россия, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: раствор для внутримышечного введения 0,5 мл/доза,
компонент 1 (флакон) + компонент 2 (флакон)

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: № 02-Гам-КОВИД-Вак-2020 «Открытое
исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного
препарата «Гам-КОВИД-Вак» раствор для внутримышечного введения при
участии здоровых добровольцев»

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: изучение безопасности, переносимости и иммуногенности
лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак» при участии здоровых
добровольцев.

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: с 16.06.2020 по 31.12.2020

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: 43 человека

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения: согласно приложению №1 на 1 л.

Данное разрешение действительно в течение всего срока проведения клинических исследований.

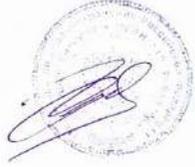
008691

Приложение № 1
к Разрешению на проведение
клинического исследования
№ 241 от 16.06.2020 г.

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения:

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, филиал №7, 105229, г. Москва, Госпитальная площадь, д. 3 (141306, Московская обл., г. Сергиев Посад-6, ул. Новая, д. 4)

Директор Департамента государственного регулирования обращения лекарственных средств


Ф.А. Романов


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РАЗРЕШЕНИЕ № 566
на проведение клинических исследований
от 13 октября 2020 г.

Настоящим разрешается проведение клинических исследований
Гам-КОВИД-Вак
**(Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной
инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2)**
(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения:
**разработчик лекарственного препарата ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России (филиал «Медгамалд» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России), Россия, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.**

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: **раствор для внутримышечного введения, компонент I - 0,5 мл/доза + компонент II - 0,5 мл/доза.**

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **№ 05- Гам-КОВИД-Вак-2020 «Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак», раствор для внутримышечного введения, при участии добровольцев в возрастной группе старше 60 лет».**

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **изучение безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Гам-КОВИД-Вак», у здоровых добровольцев в возрасте старше 60 лет.**

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **с 13.10.2020 по 31.12.2021 г.**

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: **150 человек (из них рандомизированных 110).**

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения: **согласно приложению № 1 на 1 л.**

Данное разрешение действительно в течение всего срока проведения
клинических исследований.

009138

Приложение № 1
к Разрешению на проведение
клинического исследования
№ 566 от 13.10.2020 г.

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения:

1. федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, 121359, г. Москва, ул. Маршала Тимошенко, д. 15.

Директор Департамента
государственного регулирования
обращения лекарственных средств

Ф.А. Романов




МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РАЗРЕШЕНИЕ № 450
на проведение клинических исследований
от 25 августа 2020 г.

Настоящим разрешается проведение клинических исследований

Гам-КОВИД-Вак
**(Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной
инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2)**
(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения:

разработчик лекарственного препарата ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (филиал «Медгамаль» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), Россия, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: раствор для внутримышечного введения, компонент I - 0,5 мл/доза + компонент II - 0,5 мл/доза.

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: № 04-Гам-КОВИД-Вак-2020 «Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое многоцентровое клиническое исследование эффективности, иммуногенности и безопасности комбинированной векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак в параллельных группах в профилактике коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2».

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: оценка эффективности, иммуногенности и безопасности комбинированной векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак в параллельных группах.

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: с 25.08.2020 по 31.12.2022 г.

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: 40000 человек (из них рандомизированных 39000).

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения: согласно приложению № 1 на 1 л.

Данное разрешение действительно в течение всего срока проведения клинических исследований. **008982**

Приложение № 1
к Разрешению на проведение
клинического исследования
№ 450 от 25.08.2020 г.

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения:

1. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 220 Департамента здравоохранения города Москвы», 123022, г. Москва, ул. Загорьева, д. 27;
2. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 62 Департамента здравоохранения города Москвы», 125167, г. Москва, ул. Красноармейская, д. 18;
3. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени М.П. Кончаловского Департамента здравоохранения города Москвы», 124489, г. Москва, г. Зеленоград, Каштановая аллея, д. 2, стр. 1;
4. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 2 Департамента здравоохранения города Москвы», 117556, г. Москва, ул. Фруктовая, д. 12;
5. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская поликлиника № 212 Департамента здравоохранения города Москвы», 119620, г. Москва, Солнцевский пр-т, д. 11А;
6. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Консультативно-диагностическая поликлиника № 121 Департамента здравоохранения города Москвы», 117042, г. Москва, Южнобутовская ул., д. 87;
7. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени М.Е. Жадкевича Департамента здравоохранения города Москвы», 121374, г. Москва, Можайское шоссе, д. 14.

Врио директора Департамента государственного регулирования обращения лекарственных средств


К.М. Сакамян



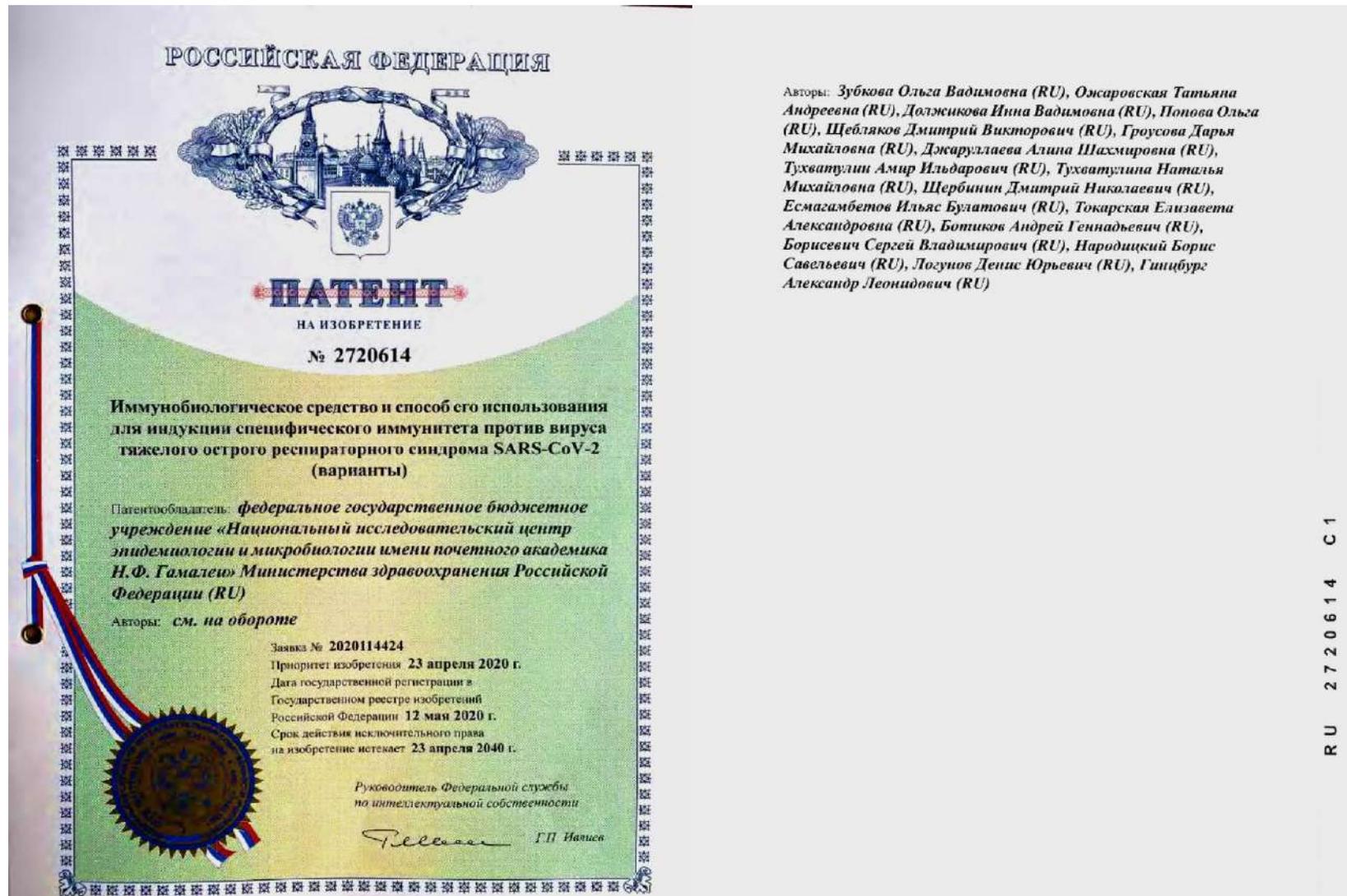
Приложение В. Регистрационные удостоверения

 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	
Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для медицинского применения	
<u>ЛП-006395</u> (номер регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	
Наименование держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (Филиал "Медгамал" федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации) (ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России (Филиал "Медгамал" ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России), Россия
Адрес местонахождения держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
Дата государственной регистрации лекарственного препарата	11.08.2020
Срок действия регистрационного удостоверения лекарственного препарата	01.01.2021
Дата внесения изменений в регистрационное удостоверение лекарственного препарата (дата замены регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	выдано впервые
Информация о зарегистрированном лекарственном препарате:	
Торговое наименование	Гам-КОВИД-Вак Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2
Международное непатентованное, или группировочное, или химическое наименование	Вакцина для профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)
Лекарственная форма	раствор для внутримышечного введения
Дозировка	компонент I - 0.5 мл/доза + компонент II 0.5 мл/доза
033091	

 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	
Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для медицинского применения	
ЛП-006395 (номер регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	
Наименование держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России (филиал "Медгамал" ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России), Россия
Адрес местонахождения держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18
Дата государственной регистрации лекарственного препарата	11.08.2020
Срок действия регистрационного удостоверения лекарственного препарата	31.12.2025
Дата внесения изменений в регистрационное удостоверение лекарственного препарата (дата замены регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	10.10.2022
Информация о зарегистрированном лекарственном препарате:	
Торговое наименование	Гам-КОВИД-Вак Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2
Международное непатентованное, или группировочное, или химическое наименование	Вакцина для профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)
Лекарственная форма	раствор для внутримышечного введения
Дозировка	компонент I-0.5 мл/доза+компонент II-0.5 мл/доза
Качественный состав и количественный состав действующих веществ и качественный состав вспомогательных веществ <i>Компонент I:</i> рекомбинантные аденовирусные частицы 26 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 $(1.0 \pm 0.5) \times 10^{11}$ частиц, вспомогательные вещества (трис(гидроксиметил)аминометан, натрия хлорид, сахараза, полисорбат 80, магния хлорида гексагидрат, ЭДТА динатриевая соль дигидрат, этанол 95 %, вода для инъекций); <i>Компонент II:</i> рекомбинантные аденовирусные частицы 5 серотипа, содержащие ген белка S вируса SARS-CoV-2 $(1.0 \pm 0.5) \times 10^{11}$ частиц, вспомогательные вещества (трис(гидроксиметил)аминометан, натрия хлорид, сахараза, полисорбат 80, магния хлорида гексагидрат, ЭДТА динатриевая соль дигидрат, этанол 95 %, вода для инъекций)	
Форма выпуска (лекарственная форма, дозировка, первичная упаковка, количество лекарственной формы в первичной)	раствор для внутримышечного введения, компонент I - 0.5 мл/доза (флакон) 0.5 мл (1 доза) x 1/5/10 (пачка картонная);

044107

Приложение Г. Патенты





Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна
Андреевна (RU), Должикова Инна Вадимовна (RU), Попова Ольга
(RU), Щепляков Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья
Михайловна (RU), Джаруллаева Алина Шахмировна (RU),
Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина Наталья
Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU),
Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU), Токарская Елизавета
Александровна (RU), Ботиков Андрей Геннадьевич (RU), Ерохова
Алина Сергеевна (RU), Ижсаева Фатима Магометовна (RU),
Семихин Александр Сергеевич (RU), Борисевич Сергей
Владимирович (RU), Народицкий Борис Савельевич (RU), Лозунов
Денис Юрьевич (RU), Гиницбург Александр Леонидович (RU)*



Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна Андреевна (RU), Должикова Инна Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Щербляков Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU), Джаруллаева Алина Шахмировна (RU), Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина Наталья Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU), Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU), Токарская Елизавета Александровна (RU), Ботиков Андрей Геннадьевич (RU), Ерохова Алина Сергеевна (RU), Никитенко Наталья Анатольевна (RU), Семихин Александр Сергеевич (RU), Борисевич Сергей Владимирович (RU), Народицкий Борис Савельевич (RU), Лозунов Денис Юрьевич (RU), Гинцбург Александр Леонидович (RU)*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2743962

Средство для индукции специфического иммунитета против вируса
тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в
лиофилизированной форме (варианты)

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна Андреевна
(RU), Должикова Инна Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Щепляков
Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU), Джаруллаева
Алина Шахмировна (RU), Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина
Наталья Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU),
Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU)* (продолжение см. на обороте)

Заявка № 2021103101

Приоритет изобретения **10 февраля 2021 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **01 марта 2021 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **10 февраля 2041 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*



ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 0e02a5cf8c10b1a6f59a40a2f98092e7a118
Владелец **Ильяс Григорий Петрович**
Действителен с 15.11.2021 по 15.01.2035

Г.П. Излиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2743963

Средство для индукции специфического иммунитета против вируса
тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 в жидкой форме
(варианты)

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна Андреевна
(RU), Должикова Инна Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Щепляков
Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU), Джаруллаева
Алина Шахмировна (RU), Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина
Наталья Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU),
Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU) (продолжение см. на обороте)*

Заявка № 2021103099

Приоритет изобретения 09 февраля 2021 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 01 марта 2021 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 09 февраля 2041 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 0x02A5CFB0CB1ACF994402F08092E9A118
Владелец: **Ивлиев Григорий Петрович**
Действителен с 15.01.2021 по 15.01.2035

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2745307

Способ очистки рекомбинантного аденовируса 26 серотипа
(Ad26)

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Костарной Алексей Викторович (RU), Кондратьев Алексей Владимирович (RU), Ганчева Петя Ганчева (RU), Смирнова Нина Сергеевна (RU), Ожировская Татьяна Андреевна (RU), Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Семихин Александр Сергеевич (RU), Саморукова Александра Владимировна (RU), Логунов Денис Юрьевич (RU), Гиццбург Александр Леопидович (RU)*

Заявка № 2020139437

Приоритет изобретения 01 декабря 2020 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 23 марта 2021 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 01 декабря 2040 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат: 0a22450fbc00e1ac8f9a40a2f08092e9a118
Владелец: **Ивлиев Григорий Петрович**
Действителен с 16.01.2021 по 15.01.2035

Г.П. Ивлиев





Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна Андреевна (RU), Должикова Инна Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Шебляков Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU), Джаруллаева Алина Шахмировна (RU), Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина Наталья Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU), Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU), Токарская Елизавета Александровна (RU), Ботиков Андрей Геннадьевич (RU), Ерохова Алина Сергеевна (RU), Ижаева Фатима Магомедовна (RU), Никитенко Наталья Анатольевна (RU), Лубец Надежда Леопидовна (RU), Семихин Александр Сергеевич (RU), Чернецов Владимир Александрович (RU), Крюков Евгений Владимирович (RU), Бабира Владимир Федорович (RU), Кутасев Дмитрий Анатольевич (RU), Логина Светлана Юрьевна (RU), Народицкий Борис Савельевич (RU), Лозунов Денис Юрьевич (RU), Гилицбург Александр Леопидович (RU)*

КУ 2744444 С1



Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна Андреевна (RU), Должикова Ирина Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Шебляков Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU), Джаруллаева Алина Шахмировна (RU), Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина Наталья Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU), Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU), Токарская Елизавета Александровна (RU), Ботиков Андрей Геннадьевич (RU), Ерохова Алина Сергеевна (RU), Ижаева Фатима Магомедовна (RU), Никитенко Наталья Анатольевна (RU), Лубец Надежда Леонидовна (RU), Семихин Александр Сергеевич (RU), Народицкий Борис Савельевич (RU), Логунов Денис Юрьевич (RU), Гинцбург Александр Леонидович (RU), Чернецов Владимир Александрович (RU), Крюков Евгений Владимирович (RU), Бабира Владимир Федорович (RU), Кутаев Дмитрий Анатольевич (RU), Логинова Светлана Юрьевна (RU)*

ПО И
107
55
С
—
2
2
Г
С
(
)
RU 2744442



Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна Андреевна (RU), Должикова Инна Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Щедляков Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU), Джаруллаева Алина Шахмировна (RU), Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина Наталья Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU), Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU), Токарская Елизавета Александровна (RU), Ботиков Андрей Геннадьевич (RU), Ерохова Алина Сергеевна (RU), Ижсаева Фатима Магомедовна (RU), Никитенко Наталья Анатольевна (RU), Лубенец Надежда Леонидовна (RU), Семихин Александр Сергеевич (RU), Народицкий Борис Савельевич (RU), Логунов Денис Юрьевич (RU), Гинцбург Александр Леонидович (RU), Борисевич Сергей Владимирович (RU), Чернецов Владимир Александрович (RU), Крюков Евгений Владимирович (RU), Бабира Владимир Федорович (RU), Кутаев Дмитрий Анатольевич (RU), Логинова Светлана Яковлевна (RU)*



Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская
Татьяна Андреевна (RU), Должикова Инна Вадимовна
(RU), Попова Ольга (RU), Зрелкин Денис Игоревич (RU),
Воронина Дарья Владимировна (RU), Щедляков Дмитрий
Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU),
Джаруллаева Алина Шахмировна (RU), Тухватулин
Амир Ильдарович (RU), Тухватулина Наталья
Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU),
Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU), Токарская
Елизавета Александровна (RU), Ботиков Андрей
Геннадьевич (RU), Ерохова Алина Сергеевна (RU),
Ижаева Фатима Магомедовна (RU), Никитенко
Наталья Анатольевна (RU), Лубенец Надежда
Леопидовна (RU), Семихин Александр Сергеевич (RU),
Народицкий Борис Савельевич (RU), Логунов Денис
Юрьевич (RU), Гицбург Александр Леопидович (RU),
Борисевич Сергей Владимирович (RU), Чернецов
Владимир Александрович (RU), Крюков Евгений
Владимирович (RU), Бабира Владимир Федорович (RU),
Кутаев Дмитрий Анатольевич (RU), Логинова Светлана
Яковлевна (RU)*



Авторы: *Зубкова Ольга Вадимовна (RU), Ожаровская Татьяна Андреевна (RU), Должикова Инна Вадимовна (RU), Попова Ольга (RU), Зрелкин Денис Игоревич (RU), Воронина Дарья Владимировна (RU), Шебляков Дмитрий Викторович (RU), Гроусова Дарья Михайловна (RU), Джаруллаева Алина Шахмировна (RU), Тухватулин Амир Ильдарович (RU), Тухватулина Наталья Михайловна (RU), Щербинин Дмитрий Николаевич (RU), Есмагамбетов Ильяс Булатович (RU), Токарская Елизавета Александровна (RU), Ботиков Андрей Геннадьевич (RU), Ерохова Алина Сергеевна (RU), Исаева Фатима Магомедовна (RU), Никитенко Наталья Анатольевна (RU), Лубенец Надежда Леонидовна (RU), Семихин Александр Сергеевич (RU), Гуцин Владимир Алексеевич (RU), Народицкий Борис Савельевич (RU), Логунов Денис Юрьевич (RU), Гинцбург Александр Леонидович (RU), Борисевич Сергей Владимирович (RU), Чернецов Владимир Александрович (RU), Крюков Евгений Владимирович (RU), Бабира Владимир Федорович (RU), Кутаев Дмитрий Анатольевич (RU), Логинова Светлана Яковлевна (RU)*

Приложение Ж. Дипломы

